

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA FLORESTAL**

Jéssica Emilia Rabuske

***Trichoderma asperellum* NO MANEJO DE DOENÇAS E NA PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE
NOGUEIRA-PECÃ**

Santa Maria, RS
2021

Jéssica Emilia Rabuske

***Trichoderma asperellum* NO MANEJO DE DOENÇAS E NA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS DE NOGUEIRA-PECÃ**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Engenharia Florestal**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS
2021

Rabuske, Jéssica Emilia
Trichoderma asperellum NO MANEJO DE DOENÇAS E NA
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE NOGUEIRA-PECÃ /
Jéssica Emilia Rabuske.- 2021.
174 p.; 30 cm

Orientador: Marlove Fátima Brião Muniz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2021

1. Podridão de raízes 2. Cancro do tronco 3. Compostos
orgânicos voláteis I. Brião Muniz, Marlove Fátima II.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

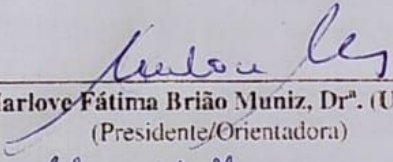
Declaro, JÉSSICA EMILIA RABUSKE, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

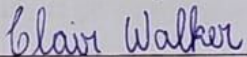
Jéssica Emilia Rabuske

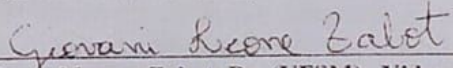
Trichoderma asperellum NO MANEJO DE DOENÇAS E NA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS DE NOGUEIRA-PECÃ

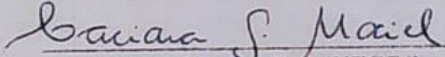
Tese apresentada ao Curso de Doutorado do
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Florestal, Universidade Federal de Santa Maria/RS
(UFSM), como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutora em Engenharia Florestal

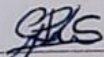
Aprovada em 24 de maio de 2021:


Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a. (UFSM) - Videoconferência
(Presidente/Orientadora)


Clair Walker, Dr^a. (UEL) - Videoconferência


Giovani Leone Zabet, Dr. (UFSM) - Videoconferência


Caciara Gonzatto Maciel, Dr^a. (UFGRS) - Videoconferência


Gerusa Pauli Kist Steffen, Dr^a. (DDPA) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força para superar todos os desafios.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal pelo acolhimento e oportunidades oferecidas, bem como a todos os professores que fizeram parte da minha formação.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de doutorado, sem ela a realização desse trabalho teria sido muito difícil.

À professora Dr^a Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação e confiança em meu trabalho, pelos aprendizados e contribuições para o meu crescimento profissional e pessoal.

À banca avaliadora, Dr^a Clair Walker, Dr^a Caciara Gonzatto Maciel, Dr^a Gerusa Pauli Kist Steffen, Dr. Giovanni Leone Zobot, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese.

Aos professores, Dr. Márcio Mazutti e Dr^a Marília Lazarotto, por aceitarem participar como membros suplentes.

Ao professor Dr. Márcio Mazutti e à equipe do Laboratório Biotech Factory do Departamento de Engenharia Química, pela disponibilidade e parceria.

Agradeço a todas as pessoas que me acolheram na Argentina, principalmente aos professores Mariana Sisterna, Juan Girotti e Paulina Moya, pela ajuda nos trabalhos. Agradeço também a Paulina Moya e Sebastian Galiano pela amizade.

Aos meus pais, Danilo José Rabuske e Maria Rohsmann Rabuske, minha irmã Aline Maria Rabuske, aos meus sobrinhos e a toda minha família, pelo apoio, alegria e amor incondicional.

Ao meu namorado Thiarles Brun, pelo apoio nos momentos difíceis, pela compreensão, amor, carinho e por participar na realização desse trabalho. Agradeço também a família Brun, que se tornou minha família também, pelo carinho e apoio.

À equipe de trabalho do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, agradeço pela disponibilidade e auxílio no desenvolvimento dos experimentos, pela troca de conhecimentos, pela parceria e amizade. Agradeço imensamente aos colegas Janaina Sarzi, Lucas Savian, Clair Walker, Jéssica Rolim, Vanessa Alba e Márcia Gabriel, por serem a família que encontrei durante o doutorado em Santa Maria e que vou guardar para sempre no meu coração.

Agradeço a todos os bolsistas de iniciação científica, em especial a Laís Martello, pelo auxílio durante a realização dos experimentos e pela dedicação de todos.

Aos amigos que estiveram comigo nesse período, agradeço pelo carinho, amizade e apoio para seguir sempre em frente, até o fim!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1 REFERÊNCIAS	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 <i>Carya illinoensis</i>	24
2.2 FAMÍLIA <i>Botryosphaeriaceae</i>	25
2.3 GÊNERO <i>Fusarium</i>	27
2.4 GÊNERO <i>Trichoderma</i>	28
2.5 <i>Trichoderma</i> spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS	30
2.6 IMPORTÂNCIA DE METABÓLITOS FÚNGICOS	32
2.7 FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOPRODUTOS ..	34
2.8 A ENZIMA QUITINASE.....	36
2.9 REFERÊNCIAS	37
3 CAPÍTULO I - <i>Trichoderma asperellum</i> NO BIOCONTROLE <i>in vitro</i> DE <i>Lasiodiplodia theobromae</i> E <i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i>	49
3.1 INTRODUÇÃO	50
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.2.1 Localização de realização dos experimentos e origem dos isolados fúngicos	52
3.2.2 Caracterização molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	53
3.2.3 Caracterização morfológica dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	54
3.2.4 Avaliação do pareamento de culturas.....	54
3.2.5 Avaliação de metabólitos voláteis.....	55
3.2.6 Otimização da fermentação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	56
3.2.7 Ação de metabólitos não voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na inibição do crescimento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> e <i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i>	57
3.2.8 Determinação da atividade da enzima quitinase	58
3.2.9 Análise cromatográfica dos compostos presentes nos filtrados de cultura dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	58
3.2.10 Procedimento estatístico	59
3.3 RESULTADOS	60
3.3.1 Caracterização molecular e morfológica dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. .	60
3.3.2 Avaliação do pareamento de culturas.....	63
3.3.3 Avaliação de metabólitos voláteis.....	64

3.3.4 Metabólitos não voláteis dos isolados de <i>Trichoderma asperellum</i> na inibição do crescimento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> e <i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i>	66
3.3.5 Atividade da enzima quitinase	69
3.3.6 Análise cromatográfica dos compostos presentes no filtrado de cultura dos isolados de <i>Trichoderma asperellum</i>	71
3.4 DISCUSSÃO	73
3.5 CONCLUSÃO	76
3.6 REFERÊNCIAS	77
4 CAPÍTULO II - AÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Trichoderma asperellum</i> E DE METABÓLITOS BIOATIVOS EM PATÓGENOS DO GÊNERO <i>Fusarium</i> spp.....	83
4.1 INTRODUÇÃO	84
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
4.2.1 Origem dos isolados fúngicos.....	85
4.2.2 Pareamento de culturas.....	86
4.2.3 Ação de metabólitos voláteis	87
4.2.4 Ação de metabólitos não voláteis.....	87
4.2.5 Procedimento estatístico	89
4.3 RESULTADOS.....	90
4.3.1 Pareamento de culturas.....	90
4.3.2 Metabólitos voláteis	92
4.3.3 Metabólitos não voláteis	93
4.4 DISCUSSÃO	99
4.5 CONCLUSÃO	101
4.6 REFERÊNCIAS	102
5 CAPÍTULO III – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE <i>Trichoderma asperellum</i> E AÇÃO SOBRE <i>Fusarium graminearum</i>.....	105
5.1 INTRODUÇÃO	106
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	107
5.2.1 Local de realização dos trabalhos e origem dos isolados fúngicos.....	107
5.2.2 Extração e identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs).....	108
5.3 RESULTADOS.....	109
5.3.1 Metabólitos voláteis	110
5.3.2 Identificação de compostos orgânicos voláteis de <i>Fusarium graminearum</i> e de <i>Trichoderma asperellum</i>	110

5.3.3 Interação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Trichoderma asperellum</i> vs <i>Fusarium graminearum</i>	113
5.4 DISCUSSÃO	116
5.5 CONCLUSÃO	120
5.6 REFERÊNCIAS	120
6 CAPÍTULO IV - <i>Trichoderma asperellum</i> NO CONTROLE DE CANCRO DO TRONCO EM <i>Carya illinoensis</i>	125
6.1 INTRODUÇÃO	126
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	127
6.2.1 Local de realização dos experimentos, origem e caracterização dos microrganismos	127
6.2.2 Produção dos filtrados de cultura de <i>Trichoderma asperellum</i>	128
6.2.3 Produção das mudas, preparo do inóculo e inoculação do patógeno.....	128
6.2.4 Experimento 1 - Aplicação dos tratamentos via parte aérea	129
6.2.5 Experimento 2 - Aplicação dos tratamentos no substrato	129
6.2.6 Avaliação dos experimentos	130
6.2.7 Procedimento estatístico	131
6.3 RESULTADOS	131
6.3.1 Experimento 1 - Aplicação via parte aérea.....	131
6.3.2 Experimento 2 - Aplicação dos tratamentos no substrato	135
6.4 DISCUSSÃO	138
6.5 CONCLUSÃO	142
6.6 REFERÊNCIAS	142
7 CAPÍTULO V - AÇÃO <i>in vivo</i> DE <i>Trichoderma asperellum</i> E FILTRADOS DE CULTURA SOBRE <i>Fusarium equiseti</i>	145
7.1 INTRODUÇÃO	146
7.2 MATERIAL E MÉTODOS	147
7.2.1 Local de realização dos experimentos, origem e caracterização dos isolados	147
7.2.2 Origem das sementes e superação de dormência	148
7.2.3 Obtenção dos filtrados de cultura de <i>Trichoderma asperellum</i>	148
7.2.4 Produção de inóculo do patógeno	149
7.2.5 Incorporação dos isolados de <i>Trichoderma asperellum</i> e de filtrados de cultura ao substrato para controle de <i>Fusarium equiseti</i>	149
7.2.6 Microbiolização de sementes para o controle de <i>Fusarium equiseti</i>	149
7.2.7 Condução e avaliação dos experimentos	150
7.2.8 Análise estatística.....	151

7.3 RESULTADOS	151
7.3.1 Incorporação dos tratamentos de controle biológico ao substrato para controle de <i>Fusarium equiseti</i>	151
7.3.2 Microbiolização de sementes para o controle de <i>Fusarium equiseti</i>	158
7.4 DISCUSSÃO	163
7.5 CONCLUSÃO	166
7.6 REFERÊNCIAS	166
8 DISCUSSÃO GERAL	169
9 CONCLUSÕES	173
10 Referências	174

RESUMO

***Trichoderma asperellum* NO MANEJO DE DOENÇAS E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE NOGUEIRA-PECÃ**

AUTORA: JÉSSICA EMILIA RABUSKE
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], é uma espécie nativa da América do Norte e foi introduzida no Brasil por volta de 1900 e atualmente, está difundida pela região sul do país, principalmente no Rio Grande do Sul. Entre as doenças que afetam a cultura, estão a podridão de raízes e o cancro do tronco, sendo que não existem registros de formas de controle para as mesmas. O controle de fitopatógenos por meio do controle biológico vem se tornando uma forma mais sustentável ambientalmente e economicamente de manejo de doenças em plantas. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de isolados de *Trichoderma asperellum*, bem como de seus filtrados de cultura, no controle de patógenos causadores de podridão de raízes e de cancro do tronco. A ação antagônica de *T. asperellum* sobre os patógenos foi avaliada por pareamento de culturas, metabólitos voláteis e metabólitos não-voláteis. A enzima quitinase foi quantificada e os compostos produzidos pelo antagonista em meio líquido foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram identificados e quantificados os compostos produzidos por *Fusarium graminearum* e pelos diferentes isolados de *T. asperellum*. Após os experimentos *in vitro*, os tratamentos que apresentaram os melhores resultados, foram elegidos para os testes *in vivo* em casa de vegetação. Foram desenvolvidos dois experimentos, tanto para avaliação do controle do cancro do tronco como para a podridão de raízes. Para o cancro do tronco, o primeiro experimento foi realizado aspergindo-se, a parte aérea das plantas com suspensão de esporos de dois isolados de *T. asperellum* e com os filtrados de cultura destes e no segundo, o substrato foi umedecido com os mesmos tratamentos. Transcorridos 14 dias, foi realizada a inoculação do patógeno *Lasiodiplodia theobromae* por meio de ferimento no tronco. No controle da podridão de raízes, para o primeiro experimento, inicialmente, 14 dias antes da instalação, o substrato de cultivo foi umedecido, com uma suspensão de esporos de dois isolados de *T. asperellum* e com os filtrados de cultura, e no segundo, as sementes de noqueira-pecã foram microbiolizadas com a suspensão de esporos e com os filtrados de cultura, e no momento da instalação do experimento, para ambos, foram incorporados grãos de milho previamente colonizados por *Fusarium equiseti*. Para todos os experimentos foram avaliados o comprimento e o diâmetro da parte aérea, massa fresca da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz, incidência e severidade da doença. Para os experimentos com *F. equiseti*, também foi avaliada a emergência. Os isolados de *T. asperellum* produziram quitinase e compostos com potencial de biocontrole, que agindo sinergicamente, diminuíram o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *in vitro*. Em todos os experimentos *in vivo*, no geral, quando se utilizou a suspensão de esporos de *T. asperellum* e os filtrados de cultura, obteve-se incremento nos parâmetros de crescimento em relação ao tratamento inoculado com o patógeno sem o uso dos mesmos. Os tratamentos com as suspensões de esporos ou com os filtrados de cultura diminuíram a incidência e a severidade do cancro do tronco e da podridão de raízes em mudas de noqueira-pecã, sendo que o melhor tratamento variou com a forma de aplicação.

Palavras-chave: Podridão de raízes. Cancro do tronco. Compostos orgânicos voláteis.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) (Wangenh.) K. Koch possui porte arbóreo com até 40 m de altura, os indivíduos da espécie são perenes, caducifólios e monóicos. Segundo Sparks (1992) a planta possui fase vegetativa, reprodutiva e senescência, com período de dormência vegetativa, em que praticamente não há crescimento. As plantas da espécie são nativas da América do Norte, desde os Estados Unidos até o Sul do México, crescendo naturalmente na beira de rios. No Brasil, a espécie foi introduzida em 1900 e atualmente é cultivada comercialmente desde a região Sul até o Estado de Minas Gerais, sendo o Rio Grande do Sul o estado com a maior produção do País (VÁZQUEZ, 2016; IBGE, 2018).

A madeira da espécie apresenta boas propriedades, contudo no Brasil, o cultivo da noqueira-pecã visa a produção de nozes, que são consumidas devido aos atributos nutricionais das mesmas, principalmente as características relacionadas a redução da concentração de colesterol, ação antioxidante, prevenção de doenças cardíacas, ação antibacteriana, anticâncer, anti-inflamatória, antioxidante e antiviral (ATANASOV et al., 2018; GONG et al., 2017; FLORES-MARTÍNEZ et al., 2016; JIA et al., 2018; SMERIGLIO et al., 2017).

Em cultivos homogêneos de noqueira-pecã é comum observar sintomas relacionados a ação de fitopatógenos fúngicos, dentre as doenças destacam-se a “sarna”, causada por espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* (WALKER et al., 2016), a mancha foliar, causada por *Pestalotiopsis* spp. (LAZAROTTO et al., 2014a), a podridão de raízes (LAZAROTTO et al., 2014b), causada por *Fusarium* spp., e o cancro do tronco causado por *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum* e *Pseudofusicoccum kimberleyense* (ROLIM et al., 2020). A podridão de raízes e o cancro do tronco, causam sintomas muito graves que podem levar as plantas atacadas a morte (ROLIM et al., 2020; LAZAROTTO et al., 2014b).

Entre os patógenos que causam a podridão de raízes estão *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium graminearum*, e em plântulas foram observados sintomas de estrangulamento do colo causados por esses fungos. Além disso atacam as raízes sendo comum a presença de sintomas reflexos caracterizados pela murcha e necrose foliar. Devido à alta agressividade, esses patógenos podem ocasionar perdas de mudas em viveiros comerciais, e no campo as mudas atacadas apresentam crescimento inicial reduzido (LAZAROTTO et al., 2014b).

Inicialmente, *Lasiodiplodia subglobosa* foi descrito como patógeno causador do cancro do tronco em noqueira-pecã (POLETTTO et al., 2016), posteriormente Rolim et al. (2020), identificaram outras espécies pertencentes a família Botryosphaeriaceae associadas ao sintoma

em noqueira-pecã, sendo elas *Neofusicoccum parvum* e *Pseudofusicoccum kimberleyense*. Os sintomas observados são o intumescimento da casca e a formação de cancrios que são caracterizados pelo desenvolvimento de protuberâncias formadas pela casca em volta do tronco, além disso podem ocorrer fendilhamentos longitudinais no tronco, e em casos mais graves, as plantas atacadas podem morrer devido a doença (ROLIM et al., 2020).

Por serem muito agressivos, o controle desses fitopatógenos se torna uma prática imprescindível para a produção de mudas de qualidade, para o bom estabelecimento das plantas no campo e para a manter a produtividade do pomar. Contudo, para espécies de porte arbóreo, o manejo de doenças nem sempre é uma prática fácil de ser realizada, e acrescenta-se a isso que, até o momento, não há registro de fungicidas químicos para uso na cultura da Nogueira-pecã. Também, o uso de produtos químicos sem o acompanhamento técnico pode causar uma série de problemas como contaminação ambiental, o desequilíbrio da biota natural do solo, gerando linhagens resistentes dos microrganismos patogênicos, diminuição da população de microrganismos responsáveis pela ciclagem de nutrientes e antagonistas (BOUBAKRI et al., 2015).

O controle biológico surge como uma forma sustentável e viável de controle de algumas doenças, e entre os microrganismos benéficos estudados estão diversas espécies de *Trichoderma*, que têm sido usados como agentes ativos em formulações de biocontrole e biofertilizantes (YASSIN et al., 2021; ESLAHI et al., 2021; JI et al., 2021). Esses fungos agem diretamente para enfrentar os patógenos, seja diretamente por mecanismos como micoparasitismo, competição e antibiose (VINALE et al., 2008), ou indiretamente, por indução de mecanismos de defesa, como pelas vias de resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) (MAYO et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Existem várias formas de utilização dos fungos do gênero *Trichoderma* no controle biológico, dentre elas estão os produtos comerciais disponíveis no mercado e obtenção dos microrganismos presentes na rizosfera das plantas de noqueira-pecã. Posteriormente deve-se comprovar a eficiência dos biocontroladores em patógenos de espécies florestais em experimentos *in vitro*, que necessitam de menos tempo e espaço, selecionando os melhores tratamentos para comprovar o resultado *in vivo*.

Trichoderma spp. age de diversas formas sobre os fitopatógenos, uma delas é através da produção de substâncias com potencial fungicida ou indução de resistência pelas substâncias produzidas por fungos do gênero *Trichoderma* atuando diretamente no crescimento das plantas e tornando-a menos suscetível ao ataque de fitopatógenos. Segundo Machado (2012) o controle biológico enfrenta alguns entraves para a utilização, entre eles destaca-se o processo de registro

que segue os mesmos procedimentos de um produto químico, e como os produtos à base de microrganismos apresentam menor período de armazenamento, com condições específicas de armazenamento, dificuldades da estabilidade da formulação, possível incompatibilidade entre ingredientes gerando dificuldades na aplicação *in vivo*.

Assim algumas metodologias ligadas a bioprocessos tem potencial de deixar a formulação mais eficiente, sem necessariamente manter o microrganismo vivo, otimizando as potencialidades dos bioprodutos gerados, tanto no controle de fitopatógenos quanto na promoção de crescimento das plantas. Esses bioprodutos podem ser produzidos a baixo custo e em grandes quantidades, tendo maior facilidade de aplicação *in vivo* (VINALE et al., 2008).

Uma metodologia muito utilizada para obtenção de bioprodutos é a fermentação submersa. Nesse caso, o microrganismo é cultivado em meio líquido com controle total de todos os parâmetros envolvidos no processo, neste ocorre a formação de estruturas de crescimento e reprodução, além de liberação pelos microrganismos de substâncias e enzimas no meio, que podem ser empregadas para os mais diversos fins, entre eles a indução de resistência, controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento de plantas (REZENDE et al., 2020).

Dessa forma, na presente pesquisa foram realizados cinco estudos, organizados em capítulos, conforme descrição a seguir. No capítulo I, objetivou-se obter e identificar isolados de *Trichoderma* spp. associados a rizosfera de *Carya illionensis*, bem como averiguar a ação de isolados de *Trichoderma* spp. no controle *in vitro* de fungos causadores de cancro do tronco, e identificar os compostos com potencial fungicida produzidos por *Trichoderma* spp. em meio de cultivo líquido. No capítulo II, objetivou-se avaliar a ação dos isolados de *Trichoderma asperellum* no controle *in vitro* de *Fusarium* spp., por meio do pareamento de culturas, por metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis. No capítulo III, buscou-se avaliar a ação antagônica dos metabólitos voláteis liberados por três isolados de *T. asperellum* contra *Fusarium graminearum* e identificar os compostos orgânicos voláteis que fazem parte dos metabólitos de *Trichoderma asperellum* e *Fusarium graminearum* cultivados isoladamente ou em confronto. No capítulo IV, buscou-se aferir a ação de dois isolados de *T. asperellum* e dos seus filtrados de cultura no controle de *Lasiodiplodia theobromae* *in vivo* e também avaliar o efeito dos isolados de *T. asperellum* e dos seus filtrados de cultura na promoção do crescimento de mudas de noqueira-pecã. Finalmente, no capítulo V, objetivou-se avaliar a ação de dois isolados de *Trichoderma asperellum* e dos filtrados de cultura obtidos destes no controle de *F. equiseti* *in vivo* avaliar os isolados de *T. asperellum* e dos filtrados de cultura obtidos destes na promoção de emergência e crescimento de mudas de noqueira-pecã.

1.1 REFERÊNCIAS

- ATANASOV, A. G. et al. Pecan nuts: A review of reported bioactivities and health effects. **Trends in food science & technology**, v. 71, p. 246-257, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.019>>. Acesso em: 12 nov. 2020.
- CONG Y.; FAN H.; MA Q.; LU Y.; XU L., ZHANG P.; CHEN K. Mixed culture fermentation between *Rhizopus nigricans* and *Trichoderma pseudokoningii* to control cucumber *Fusarium* wilt. **Crop Protection** v. 124, 104857, Oct. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104857>>. Acesso em: 20 out. 2020.
- ESLAHI, N. et al. The profile change of defense pathways in *Phaseolus vulgaris* L. by biochemical and molecular interactions of *Trichoderma harzianum* transformants overexpressing a chimeric chitinase. **Biological Control**, v. 152, p. 104304, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104304>>. Acesso em: 13 mar. 2021.
- FLORES-MARTINEZ, H. et al. Process optimization for the extraction of antioxidants from Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) by the response surface methodology (RSM) approach. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 15, n. 3, p. 773-785, 2016. Disponível em: <<http://rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/1034>>. Acesso em: 13 nov. 2020.
- IBGE. Lavoura Agrícola Municipal 2015 - Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. Disponível: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2014/default_xls.shtm >. Acesso em: 17 jul. 2019.
- JI, S. et al. *Trichoderma* biofertilizer (mixTroTha) mediates *Malus sieversii* resistance to *Alternaria alternata*. **Biological Control**, v. 156, p. 104539, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104539>>. Acesso em: 17 mar. 2021.
- JIA, X. et al. Dynamic changes in phenolics and antioxidant capacity during pecan (*Carya illinoensis*) kernel ripening and its phenolics profiles. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 435, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/23/2/435/htm>>. Acesso em: 09 jun. 2020.
- LAZAROTTO, M et al. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 6, p. 440-448, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2014000600440&script=sci_arttext>. Acesso em: 30 jun. 2020.
- LAZAROTTO, M. et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9390–9402, Nov. 2014. Disponível em: <<https://www.geneticsmr.org/articles/morphological-and-molecular-characterization-of-fusarium-spp-pathogenic-to-pecan-tree-in-brazil.pdf>>. Acesso em: 04 Jul. 2020.
- MAYO, S. et al. Development of a qPCR strategy to select bean genes involved in plant defense response and regulated by the *Trichoderma velutinum*–*Rhizoctonia solani* interaction. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1109, 2016.

REZENDE, L. C. de et al. Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 36, v. 113, p. 1-14, Jul. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-020-02882-7>> Acesso em: 12 jun. 2020.

ROLIM J. M. et al. First report of stem canker caused by *Neofusicoccum parvum* and *Pseudofusicoccum kimberleyense* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 3067, Sep. 2020. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-01-20-0082-PDN>>. Acesso em: 26 nov. 2020. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0082-PDN>.

SMERIGLIO, A. et al. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1244-1262, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.13630>. Acesso em: 17 set. 2020.

YASSIN, M. T. et al. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* strains against some fusarial pathogens causing stalk rot disease of maize, in vitro. **Journal of King Saud University-Science**, p. 101363, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101363>. Disponível em: 13 mar. 2021.

VÁZQUEZ, N.C.R.; LÓPEZ, R.U. Retos y oportunidades para el aprovechamiento de la Nuez pecanera in México. Centro de Investigación y Asistencia in Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). 2016. 124 p. Acesso em: 13 set. 2020.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 80-86, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmp.2008.05.005>>. Acesso em: 17 set. 2020.

WALKER C. et al. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.3, 2016. Disponível em: < DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.1503871>>. Acesso em: 17 dez. 2020.

WELLS, L. Pecan. America's Native Nut tree. University of Alabama Press. 2017. 264 p.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1405, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01405/full>>. Acesso em: 17 dez. 2020.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Carya illinoensis*

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) é uma espécie da família Juglandaceae, nativa da América do Norte, onde cresce às margens de rios, desde os Estados Unidos, até o Sul do México (VÁZQUEZ, 2016). No Brasil, a noqueira-pecã foi introduzida em 1900, por norte-americanos, no estado de São Paulo a 130 Km da cidade de Santa Bárbara. A localidade recebeu o nome de Vila Americana e posteriormente, foi chamada de Americana (WELLS, 2017). No País, o maior produtor é o Rio Grande do Sul, responsável por 41,48% da produção (IBGE, 2018).

A noqueira-pecã possui porte arbóreo, atingindo até 40 m de altura e tem como características ser perene (sobrevive por mais de dois anos), caducifolia (perde suas folhas no período vegetativo) e monóica (apresenta flores estaminadas e pistiladas no mesmo indivíduo). A planta possui fase vegetativa, reprodutiva e senescência, com o período de dormência vegetativa, em que praticamente não há crescimento (SPARKS, 1992). Para superar o período de dormência, as plantas da espécie precisam de número mínimo de horas de frio, para degradar o ácido abscísico formado pela planta, que fica acumulado nos tecidos da mesma (WELLS, 2017).

O sistema radicular da noqueira-pecã é caracterizado por ser vigoroso, tendo uma raiz principal que cresce de forma descendente no solo, atingindo até 10 m de profundidade, e raízes laterais que se desenvolvem até dois metros. Além disso, a noqueira-pecã apresenta raízes fibrosas que crescem em todas as direções, que são substituídas conforme o sistema radicular vai se desenvolvendo. Quanto ao caule, a muda tem o tronco com coloração marrom, com o crescimento ele adquire coloração acinzentada com textura lisa e bifurcações, já na planta adulta, o tronco possui a cor marrom com textura áspera, com desprendimento da casca em escamas ou placas (FRONZA; HAMANN, 2016).

A produção de nozes inicia-se entre seis e 10 anos de idade das plantas. A madeira da espécie é considerada de boa qualidade, com 720 kg.m^{-3} de peso específico, utilizada principalmente em pisos e móveis (GATTO et al., 2008). As cultivares mais plantadas no Brasil são: Barton, Shawnee, Cape Fear, Caddo, Choctaw e Money Maker (FRONZA; HAMANN, 2016), além das variedades citadas anteriormente, alguns produtores optam pela produção através de mudas oriundas de pés-francos, as quais não são enxertadas, contudo exigem período mais longo para entrar em produção (LAZAROTTO, 2013).

Apesar das boas propriedades da madeira, no Brasil, o cultivo da noqueira-pecã visa quase que exclusivamente a produção de nozes, que são consumidas devido aos atributos nutricionais das mesmas. Santos et al. (2019) analisando nozes de *C. illinoensis* descreveram que em grande parte elas são formadas por compostos fenólicos e lipofílicos, principalmente ácidos oleico e linoleico. Segundo os autores citados anteriormente, essas substâncias apresentaram efeitos positivos na manutenção do peso corporal, na atividade hipoglicemiante e no tratamento da diabetes.

Outros autores reforçam a qualidade nutricional da noz-pecã, descrita como fonte de compostos bioativos, sendo que na sua fração lipídica foram encontrados ácidos graxos mono e poli-insaturados, tocoferóis e fitoesteróis, que diminuem a concentração de colesterol plasmático e atuam como antioxidantes na prevenção de doenças cardíacas (ATANASOV et al., 2018; GONG et al., 2017). Na fração não lipídica foram descritos compostos fenólicos com várias propriedades biológicas e farmacológicas, destacando-se a ação antibacteriana, anticâncer, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, imunomoduladora e cardioprotetora (FLORES-MARTÍNEZ et al., 2016; JIA et al., 2018; SMERIGLIO et al., 2017).

Como toda planta cultivada a noqueira-pecã é atacada por muitos patógenos fúngicos que causam muitas doenças diferentes, dentre elas pode-se destacar a “sarna”, causada por espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* (WALKER et al., 2016), a mancha foliar, causada por *Pestalotiopsis* spp. (LAZAROTTO et al., 2014a), a podridão de raízes (LAZAROTTO et al., 2014b), a murcha (ROLIM, 2019; ROLIM et al., 2020) ambas causadas por *Fusarium* spp., e o cancro do tronco causado por *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum* e *Pseudofusicoccum kimberleyense* (ROLIM et al., 2020). Destacam-se a podridão de raízes, a murcha e o cancro do tronco, devido a gravidade dos sintomas que podem levar as plantas atacadas a morte.

2.2 FAMÍLIA *Botryosphaeriaceae*

Botryosphaeriaceae é uma família fúngica que compreende 22 gêneros definidos de acordo com a morfologia dos ascósporos, conídios e com as relações filogenéticas. Os fungos dessa família são caracterizados por apresentarem grandes ascósporos ovóides a oblongos, com coloração hialina ou pigmentada, com paredes espessas contendo estrias longitudinais (PHILLIPS et al., 2019).

As espécies são cosmopolitas e distribuem-se com maior relevância em regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo em uma ampla gama de hospedeiros, que podem ser monocotiledôneas, dicotiledôneas e gimnospermas (ABDOLLAHZADEH et al., 2010; CHINELOS et al., 2007). Os fungos desta família apresentam diversas características ecológicas, sobrevivendo como saprófitas em restos vegetais (ABDOLLAHZADEH et al., 2010), causando doenças em plantas (ABDOLLAHZADEH et al., 2010) ou habitando tecidos vegetais de forma assintomática (LUO et al., 2019). Outra característica importante da família *Botryosphaeriaceae* é que integrantes endófitos mudam seu modo nutricional para fitopatogênicos quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis ao hospedeiro ou quando o hospedeiro sofre algum tipo de injúria (PHILLIPS et al., 2019).

Entre os gêneros fitopatogênicos estão *Lasiodiplodia*, *Pseudofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Neofusicoccum*, *Diplodia*, *Dothiorella* e *Botryosphaeria*, que causam sintomas como queima de brotações, cancos do tronco, apodrecimento de frutas e gomose (ABDOLLAHZADEH et al., 2010). *Lasiodiplodia theobromae*, *L. citricola* e *L. mahajangana* foram descritos como causadores de amarelecimento, cancro, necrose central dos tecidos internos e morte de plantas de amendoeiras (*Prunus dulcis*) e noqueira-chilena (*Juglans regia*) (SOHRABI et al., 2020). *Lasiodiplodia mediterranea* foi descrito como causador de cancro dos ramos em azinheira (*Quercus ilex*) e *Lasiodiplodia exigua* como causador de cancro dos ramos em vassoura branca (*Retama raetam*) (LINALDEDDU et al., 2015).

No Brasil, *L. theobromae* e *Neofusicoccum parvum* foram identificados como causadores de declínio em plantas de manga (*Mangifera indica*) que, em casos mais graves pode evoluir para morte das plantas afetadas (BATISTA et al., 2017). Ainda no Brasil, *L. brasiliense*, *L. egyptiacae*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae* foram identificados como agentes causais da podridão pós-colheita de coco (*Cocos nucifera*), sendo que os sintomas incluem lesões necróticas marrom-escuras com crescimento micelial acinzentado, que com o progresso da doença cobrem todo o fruto (ROSADO et al., 2016). Em sementes e plântulas de *Pinus* spp., o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl. (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) foi identificado causando podridão de sementes, reduzindo de forma significativa o potencial germinativo, além de interferir no desenvolvimento inicial das plântulas (MACIEL et al., 2015).

Pseudofusicoccum kimberleyense, foi associado ao sintoma cancro do tronco em algumas espécies como em eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e manga (*Mangifera indica*) (SAKALIDIS et al., 2011). Em Portugal, *Neofusicoccum parvum* foi descrito como patógeno em mirtilo (*Vaccinium corymbsum*), causando necrose dos tecidos vasculares com lesões de

coloração castanha, enquanto que a epiderme externa demonstrava descoloração intensa, seguidos de desfolhamento e morte de plantas (HILÁRIO et al., 2020). No Irã, em indivíduos de noqueira-chilena (*Juglans regia*) e pistache (*Pistacia vera*), *N. parvum* foi identificado causando amarelecimento, cancro e morte de plantas, sendo possível visualizar necrose central dos tecidos internos (SOHRABI et al., 2020).

O patógeno causador de cancro do tronco em noqueira-pecã foi identificado inicialmente como *Lasiodiplodia subglobosa*, tendo como sintomas, pequenas lesões elípticas na casca do tronco e dos ramos, progredindo para cancos de 6 a 60 cm, com estrias negras próximas aos tecidos vasculares e, em casos mais severos, levando à morte da planta (POLETO et al., 2016). Contudo, posteriormente Rolim et al. (2020), identificaram outros gêneros associados ao sintoma de cancro do tronco em noqueira-pecã, sendo eles *Neofusicoccum parvum* e *Pseudofusicoccum kimberleyense*.

2.3 GÊNERO *Fusarium*

Fungos do gênero *Fusarium* fazem parte da família Nectriaceae; ordem Hypocreales; classe sordariomycetes; filo Ascomycota; com aproximadamente 963 espécies e subespécies. Espécies deste gênero apresentam diversas características ecológicas, podendo ser patógenos de plantas e animais, dentre eles os seres humanos, ou ser também classificados como saprofíticos, produtores de micotoxinas e agentes de biocontroles (INDEX FUGORUM, 2018). São habitantes naturais do solo, cosmopolitas e amplamente distribuídos, contudo são mais comuns em locais tropicais e subtropicais (SUMERELL et al., 2010).

Como características marcantes do gênero podem ser citados os microconídios e macroconídios, esporos assexuados geralmente hialinos e septados, com células basais e apicais marcantes que são utilizadas para a taxonomia desses microrganismos (TEIXEIRA, 2015). Segundo Agrios (2005), fungos do gênero *Fusarium* podem sobreviver no solo por muitos anos, sob condições ambientais adversas, principalmente através de estruturas de resistência chamadas de clamidósporos, o que dificulta o controle do patógeno.

Mais especificamente na área florestal, *Fusarium* spp. é conhecido por causar doenças em viveiro e a campo, destacando-se o “*damping-off*”, as podridões radiculares e doenças vasculares. No ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e no ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*) *Fusarium* spp. é considerado patógeno de sementes, sendo a transmissão para as sementes constatada por Botelho et al. (2008). Em plântulas de *Pinus elliottii* os sintomas observados

foram: murcha, tombamento, apodrecimento dos cotilédones e lesão seguida de ruptura do hipocótilo (MACIEL et al., 2017). Arguedas et al. (2004), em plantas de teca (*Tectona grandis*) relataram alta incidência de *Fusarium oxysporum*, acarretando podridão nas raízes e morte de plantas no campo.

As espécies *F. equiseti*, *F. oxysporum* e *F. graminearum* foram relatadas como patogênicas à *Carya illinoensis*, sendo que em plântulas de viveiros, foi possível observar estrangulamento do colo, murcha e necrose foliar, ambos sintomas reflexos da podridão de raízes. Por serem agressivos, patógenos do gênero *Fusarium* spp. podem ocasionar grandes perdas de mudas em viveiros comerciais, e no campo as mudas atacadas apresentam crescimento inicial reduzido (LAZAROTTO et al., 2014b). Por outro lado, Rolim (2019) e Rolim et al. (2020) relataram que as espécies *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. fujikuroi*, *F. incarnatum* e *F. solani*, causam sintomas de murcha em plantas de noqueira-pecã. Dentre os sintomas citados, estão o amarelecimento, a murcha da parte aérea, necrose marginal, seca de folhas e morte.

2.4 GÊNERO *Trichoderma*

Fungos que integram o gênero *Trichoderma* pertencem ao Reino Fungi; Filo Ascomycota; Ordem Hypocreales; Família Hypocreaceae; sendo o gênero *Hypocrea* na fase sexual e *Trichoderma* na fase assexual (MYCOBANK, 2018). As espécies mais comuns encontradas entre os isolados já estudados são: *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. virens*, *T. coningii*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. reesei*, *T. hamatum*, *T. viride* e *T. ganense* (ADNAN et al., 2019).

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam produção massiva de esporos (conídios), em tons de verde e rápido crescimento em meio de cultivo. Os versos das colônias variam de coloração verde, branco, branco esverdeado, amarelo, amarelo esverdeado, muitas espécies podem produzir quantidades excepcionais de clamidósporos (esporos de paredes espessas) em micélio submerso (VINALE et al., 2008a)

Trichoderma é um gênero altamente diverso que pode ser encontrado em todos os tipos de solos, tanto temperados quanto tropicais (SAMUELS, 2006). Segundo Lee et al. (2012), esses fungos também são encontrados em diferentes materiais vegetais, bem como colonizando raízes, serapilheira, madeira em decomposição e casca em decomposição. Desde 1930, *Trichoderma* spp. são conhecidos por terem impacto antagônico em fungos causadores de doenças, além de atuar diretamente na planta (ADNAN et al., 2019). Entre os mecanismos de

ação de *Trichoderma* podemos citar o micoparasitismo, predação, competição, antibiose, indução de resistência e promoção de crescimento, descritos a seguir.

Micoparasitismo – Conforme Atanasova et al. (2013), micoparasitismo é a capacidade de qualquer fungo em parasitar outras espécies fúngicas e utilizar os nutrientes no próprio metabolismo. O processo envolve diferentes eventos que consistem no reconhecimento do fungo hospedeiro, penetração e finalmente a morte do fungo atacado (RABEA et al., 2003). Esse processo envolve a produção de enzimas que degradam a parede das células do fungo patógeno, como celulasas, quitinases, etc. (RABEA et al., 2003; HORBACH et al., 2011). Bem como na atuação de proteínas envolvidas no processo de absorção de nutrientes (LOCHER et al., 2004).

Predação – A predação se refere ao ataque aos fitonematoides, pela digestão de partes ou do corpo inteiro de juvenis, ou mesmo de ovos desses microrganismos (KHAN e KIM, 2005).

Antibiose - São os metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp. que constituem vários compostos químicos. Esses compostos possuem ação direta no crescimento ou na fisiologia dos fitopatógenos (MUKHERJEE et al., 2012). Um mesmo microrganismo pode produzir uma ampla gama de compostos diferentes que podem apresentar ação contra fitopatógenos (VINALE et al., 2008a)

Indução de resistência - As plantas tratadas com *Trichoderma* spp. mostram maior resistência contra vários patógenos fúngicos. *Trichoderma* spp. pode reduzir a eficiência do fungo fitopatogênicos em causar doença no local da inoculação, sendo este tipo de resistência denominado resistência adquirida localizada induzida (BROTMAN et al., 2010). Contudo, se a inoculação do organismo bioativo for feita em diferentes épocas ou locais, e resistência persistir chama-se de resistência sistêmica induzida (GUPTA et al., 2014)

Competição – É o mecanismo que ocorre devido ao crescimento mais rápido do agente de controle biológico em relação ao patógeno, quando os mesmos se encontram associados ao tecido da planta hospedeira. Essa competição pode ser por espaço (quando o antagonista cresce rapidamente sobre o tecido da planta hospedeira, não restando espaço para colonização do patógeno) ou por nutrientes (agentes antagonistas absorvem nutrientes mais rapidamente que os patógenos) (MEDEIROS et al., 2018).

Indução de crescimento - Segundo Zeilinger et al. (2016), *Trichoderma* spp. participa da decomposição e mineralização de resíduos vegetais, disponibilizando nutrientes para as plantas. Alguns isolados também produzem ácido indolacético (AIA), citocinina, giberelina e

enzimas solubilizadoras de fosfato (GRAVEL et al., 2007; RESENDE et al., 2014; CHAGAS et al., 2016). Esses fatores contribuem na capacidade de *Trichoderma* em induzir maior crescimento das plantas no ambiente em que ele é adicionado.

2.5 *Trichoderma* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS

Além de parasitar outros fungos, atuando de forma direta no controle de fitopatógenos, *Trichoderma* spp., pode parasitar estruturas de resistência, ou controlar patógenos de forma indireta, colonizando superfícies radiculares e a rizosfera, induzindo o maior crescimento e desenvolvimento da planta pelo aumento da disponibilidade de nutrientes, e aumentando a resistência da planta a doenças (MEDEIROS et al., 2018). Dessa forma, o controle biológico por meio de microrganismos do gênero *Trichoderma* spp., em alguns casos, é mais eficaz em controlar patógenos que podem sobreviver no solo, pois esse microrganismo possui boa adaptação a esse ambiente (SANCHEZ et al., 2019).

No trabalho realizado por Borges et al. (2018), foi possível verificar a capacidade de *Trichoderma* spp. de controlar o fungo *L. theobromae*, causador de cancro do tronco em teca (*Tectona grandis*) *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vitro*, os autores avaliaram a capacidade antagonista de 18 isolados fúngicos e bacterianos, sendo nove isolados de *Trichoderma* spp. Os resultados demonstraram que todos os isolados de *Trichoderma* spp. interferiram no crescimento micelial do patógeno sendo que dois isolados, um de *T. harzianum* e outro de *T. asperellum* controlaram totalmente o crescimento micelial do patógeno. No estudo *in vivo*, 24 horas antes de inocular o patógeno, *T. asperellum* e *T. harzianum* foram incorporados ao substrato por meio de grãos de arroz previamente colonizados (20 g de grãos de arroz para cada 100 g de latossolo), que controlaram o cancro do tronco em 70,3%, e 48,4%, respectivamente.

Silva et al. (2019) estudaram o controle de *Fusarium subglutinans in vitro* e de *Fusarium* sp. em sementes de *Pinus* naturalmente infectadas. Nos experimentos *in vitro* foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* spp. e dois de *F. subglutinans*, a avaliação foi por meio de confronto direto, metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis. No confronto direto a inibição variou de 11,5% a 38,4% e na técnica de metabólitos voláteis atingiu até 33,9% de inibição do crescimento micelial. Contudo, não houve ação antagônica de *Trichoderma* sp. contra *F. subglutinans* pela produção de metabólitos não voláteis difusíveis em celofane. Para os testes *in vivo*, os autores utilizaram sementes de *Pinus taeda*, naturalmente infectadas com *Fusarium* e as microbiolizaram com uma suspensão de *Trichoderma* sp. (1×10^6 conídios/mL), o

tratamento de sementes com o antagonista resultou em aumento da emergência de plântulas, aumento da velocidade de emergência e geraram plântulas com maior altura, mesmo em lotes que apresentavam alta incidência de *Fusarium* sp.

Segundo Vinale et al. (2014), no controle biológico com *Trichoderma* spp. a manutenção do antagonista vivo, muitas vezes é condição para garantir o controle da doença. A otimização da produção de compostos por estes fungos em meio de cultivo torna-se assim, alternativa viável, pois não há necessidade de manter o organismo vivo no final do processo, uma vez que somente os compostos são empregados para o controle, otimizando as potencialidades dos bioprodutos gerados, na promoção de crescimento das plantas e no controle de fitopatógenos. Esses bioprodutos podem ser produzidos a baixo custo e em grandes quantidades, tendo maior facilidade de aplicação *in vivo* (VINALE et al., 2014).

Estudos relatam que o cultivo de microrganismos do gênero *Trichoderma* spp. em condições de meio excitantes ou adequadas ao seu desenvolvimento, aumenta a produção de compostos e de metabólitos secundários biologicamente ativos (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Junges (2018), relatou a produção de ácidos graxos e oxidrilas por *Trichoderma* spp. com potencial fungicida e de indução de resposta de defesa em plantas, que por sua vez, reduziram a severidade e o progresso da antracnose no feijoeiro. Muhammad Adnan et al. (2019) relataram que além de compostos secundários, durante o processo de crescimento, *Trichoderma* spp. também produz enzimas degradadoras de parede celular.

Cong et al. (2019), estudando o efeito de filtrados de cultura de *Trichoderma pseudokoningii* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, causador de murcha em pepineiro (*Cucumis sativus*) *in vitro* e *in vivo* obtiveram resultados satisfatórios. Nos experimentos *in vitro* o filtrado de cultura de *T. pseudokoningii* reduziu o crescimento micelial de *F. oxysporum* em 51,52%. Nos experimentos *in vivo*, o filtrado de cultura foi incorporado ao substrato de cultivo e dessa forma o controle da doença foi de 31,25%.

Alguns trabalhos relatam que a utilização de filtrados de cultura também induz a resistência das plantas aos fitopatógenos, como descrito por Yoshioka et al. (2012), que utilizou o filtrado de *T. asperellum* SKT-1 e induziu resistência em *Arabidopsis thaliana*, englobando as rotas de sinalização do ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Já Vinale et al. (2008 e 2014) separaram de filtrados de cultura de *T. harzianum* metabólitos indutores de respostas de resistência e promotores de crescimento em plantas.

2.6 IMPORTÂNCIA DE METABÓLITOS FÚNGICOS

Os metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. são considerados um dos elementos que contribuem para os efeitos positivos exercidos por esses fungos na agricultura (VINALE et al., 2008a, 2008b). Essas moléculas podem estar envolvidas na antibiose, agindo também de forma sinérgica com outros compostos, na indução da resistência sistêmica e na promoção do crescimento vegetal (VINALE et al., 2008a, 2008b). Esses metabólitos compreendem diferentes classes de compostos naturais com baixo peso molecular, e normalmente específicos para gêneros, espécies ou cepas (VINALE et al., 2009). O metabolismo secundário tem sido relacionado a uma mudança da produção de biomassa para a biossíntese de metabólitos com o objetivo de fornecer benefícios competitivos para quem produz a substância (RUIZ et al., 2010).

Os metabólitos secundários frequentemente têm inúmeras atividades biológicas e papel importante na regulação das interações entre os organismos. Entre essas moléculas, estão as bioativas, como: fitotoxinas (tóxicas para as plantas), micotoxinas (tóxicas para fungos), pigmentos (compostos coloridos) e antibióticos (capazes de inibir ou matar outros micróbios) (HANSON, 2003).

Segundo Kottb et al. (2015) entre os compostos produzidos por *Trichoderma* estão os metabólitos voláteis, conhecidos como compostos orgânicos voláteis (VOCs), que são compostos lipofílicos de baixo peso molecular que evaporam facilmente à temperatura e pressão ambiente. Os VOCs são quimicamente diversos e incluem cetonas, lactonas, ésteres, tioálcoois, tioésteres, monoterpênicos, sesquiterpênicos, álcoois e ciclohexanos (SCHENKEL et al., 2015). Metabólitos voláteis de *Trichoderma* mostraram efeito contra fungos fitopatogênicos, e/ou ação de promoção de crescimento em plantas (MOYA et al., 2018; HUNG et al., 2015; KOTTB et al., 2015; LEE et al., 2016; NIETO-JACOBO et al. 2017; JUNGES et al., 2018).

No trabalho realizado por Bruce et al. (2000), VOCs produzidos por *Trichoderma aureoviride*, destacando os aldeídos e as cetonas, inibiram o crescimento micelial de *Neolentinus lepideus*, *Coriolus versicolor* e *Gloeophyllum trabeum*, três espécies fúngicas causadoras de apodrecimento da madeira. No trabalho de Kottb et al. (2015), VOCs liberados por *Trichoderma asperellum*, reduziram a germinação de esporos de *Alternaria* spp. Na pesquisa realizada por Moya et al. (2018), isolados das espécies *T. harzianum* e *T. longibrachiatum* inibiram o crescimento de *Pyrenophora teres*, e através da análise dos VOCS foi constatada a presença de sesquiterpênicos, diterpênicos, terpenóides e compostos de oito carbonos, que já foram descritos com atividade antifúngica e/ou indutores de defesa vegetal.

Outro VOC importante produzido por muitos isolados de *Trichoderma* spp. é o 6-Pentil- α -pirona (6PP) (JELEŃ et al., 2014; KESWANI et al., 2014). 6PP é uma lactona insaturada e apresenta aroma de coco. A atividade fungicida já foi descrita para muitos fitopatógenos de culturas agrícolas, como *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* (JELEŃ et al., 2014), *Phytophthora infestans* (ELSHERBINY et al., 2020), *Botrytis cinerea* (COONEY et al., 2000), *Alternaria brassicicola* (KOTTB et al., 2015), *Armillaria mellea* (TARUS et al., 2003), e para os patógenos de troncos como *Neofusicoccum parvum*, *Eutypa lata* e *Phaeomoniella chlamydospora* (MUTAWILA et al., 2016). 6PP ainda demonstrou efeito nematocida para *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans* e *Bursaphelenchus xylophilus* (YANG et al., 2012). Além disso, o papel do 6PP como um potencializador do crescimento da planta foi descrito para *Arabidopsis* (KOTTB et al., 2015, GARNICA-VERGARA et al., 2016), milho (EL-HASAN; BUCHENAUER 2009), tomate, canola (VINALE et al., 2014) e soja (MARRA et al., 2019).

Espécies que fazem parte do gênero *Fusarium* spp. são conhecidas por produzirem uma ampla gama de compostos, entre eles podemos citar os álcoois, ésteres, cetonas, hidrocarbonetos e sesquiterpenos (GIROTTI et al., 2010). Entre os sesquiterpenos estão as micotoxinas, estas por sua vez são tóxicas para as plantas, humanos e animais (BÚSKO et al., 2019).

Entre esses compostos, destaca-se tricoteceno deoxynivalenol (DON) que atua ligando-se ao domínio da peptidil-transferases nos ribossomos de organismos eucarióticos, inibindo a síntese de proteínas (GARREAU DE LOUBRESSE et al., 2014). Além disso, em plantas e animais a DON pode interromper a síntese de DNA/RNA, causando estresse ribotóxico e citotoxicidade (ROCHA et al., 2005). No gênero *Fusarium* spp., *F. graminearum* e *F. culmorum* são conhecidos como os maiores produtores de tricoteceno, sendo que nessas espécies os tricotecenos são fatores que influenciam na patogenicidade e no desenvolvimento de doenças em plantas, que pode ser um conhecimento importante visando práticas de manejo que visam reduzir danos causados por doenças causadas por esses patógenos (PROCTOR et al., 2005).

Segundo McCormick (2014) outra substância importante produzida por *Fusarium* spp. é a culmorina que possui sinergismo com a DON, aumentando a toxicidade da mesma. Um elemento-chave para a produção dessa substância é o longiborneol, que difere da mesma pela falta de um único grupo hidroxila. Essa molécula é necessária para completar a biossíntese de culmorina em possível associação com uma oxigenase.

2.7 FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOPRODUTOS

A produção em massa de conídios aéreos de *Trichoderma*, por muito tempo foi realizada por fermentação em estado sólido (FES), comumente tendo como substrato grãos de cereais, sendo esse processo amplamente conhecido e empregado. Além de *Trichoderma* spp. esse processo é usado também para produção em larga escala de outros agentes de biocontrole fúngicos, como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (MASCARIN et al., 2019).

Apesar de em FES serem obtidos conídios com alta viabilidade e eficácia, este sistema apresenta limitações: como problemas para aumento de escala, é um processo demorado e trabalhoso, falta de automação, requer muito tempo e espaço, dificuldade de atender demanda de produção e altos custos com mão de obra (MASCARIN et al., 2015; CARVALHO et al., 2018). Além disso, segundo Rezende et al. (2020) a padronização do inóculo fúngico é um desafio, o que pode diminuir a qualidade e uniformidade do produto final. A fermentação submersa (FS) é uma alternativa promissora para superar as limitações da FES, pois é mais econômica e permite a produção rápida e em grande escala, que é necessária para insumos de uso agrícola (REZENDE et al., 2020).

A diferença essencial entre FES e FS, é que na FS os microrganismos são rodeados por meio de cultivo líquido, nesse meio estão os nutrientes que garantem o desenvolvimento dos mesmos. Na fermentação submersa, devido à facilidade de homogeneização por causa da agitação constante, cada parte do reator contém a mesma quantidade de microrganismos, metabólitos e nutrientes e é possível ter o controle da concentração de nutrientes desde o início até o final do processo (BILITEWSKI, 2005).

A fermentação submersa possui a vantagem de ser mais rápida, poder ser executada em grande escala e produzir grandes quantidades de biomassa de microrganismos de alta qualidade, isso em pequeno espaço físico e com menor uso de mão de obra (JARONSKI & MASCARIN 2016). Na FS a propensão à contaminação é menor devido ao maior controle habitual e permanente dos lotes (MASCARIN et al., 2015). Segundo Sirohi et al. (2019), a fermentação submersa tem sido preferida por ser fácil de expandir e controlar, sendo um processo bem estabelecido industrialmente com maior controle de fatores ambientais, como temperatura e pH. Além disso, nesse processo os nutrientes são absorvidos de maneira mais eficiente, a recuperação de metabólitos é melhor do que na FES e a possibilidade de degradação do produto é menor (CASTRO, 2010).

Conforme Singhanía et al. (2010) o cultivo submerso de fungos é considerado um processo multicomponente, que envolve o crescimento de estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo e no mesmo período a formação de produtos de interesse, que são influenciados pelos parâmetros operacionais como: as características do fungo, a composição e o pH do meio de cultivo, temperatura, forças de cisalhamento, disponibilidade de nutrientes, presença de indutores, agitação do meio de cultivo, etc. Para o conhecimento dos parâmetros mais adequados de cultivo, inicialmente deve-se proceder com a otimização da forma de cultivo, para tanto o processo é testado em frascos menores, para posteriormente se utilizar os fermentadores de bancada, e assim depois que as variáveis estiverem bem estudadas, passar o processo para a escala industrial (REZENDE et al., 2020)

Fatores abióticos influenciam na produção de esporos e biomassa de fungos do gênero *Trichoderma* spp., entre esses fatores estão o carbono, nitrogênio, razão C:N e pH do meio (KOLOMBET et al., 2008; KOBORI et al., 2015; CARVALHO et al., 2018). O carbono e o nitrogênio são elementos essenciais para o desenvolvimento fúngico. Nesse sentido, a compreensão dos efeitos das variáveis envolvidas no desenvolvimento de *Trichoderma*, como a composição do meio, a razão C:N, inóculo inicial, temperatura de fermentação, pH, fotoperíodo e taxas de agitação são essenciais para a viabilidade da FS em grande escala (GAO et al., 2007).

Nos processos de fermentação submersa em que o microrganismo cultivado é um fungo, as condições mais utilizadas são: tempo de fermentação de 5 a 12 dias; temperatura entre 24 e 35 °C e agitação entre 50 e 150 rpm (KLAIC, 2017). Klaic (2017), ainda comenta que para fungos a agitação deve ser mais branda em comparação com bactérias, pois altas taxas de agitação acarretam em tensões de cisalhamento no biorreator, que prejudicam o crescimento micelial e diminuem a biomassa final. Como meio de cultivo podem ser utilizados meios sintéticos, semissintéticos e agroindustriais (ZHANG et al., 2012; REZENDE et al., 2020; BRUN et al., 2016; BALDONI et al., 2020).

Devido às vantagens da FS, o número de pesquisas utilizando esse processo na produção de biomassa e de metabólitos de *Trichoderma* spp. aumentou. Como exemplos, podemos citar os estudos de Kobori et al. (2015) e Lopes et al. (2020) que demonstraram a viabilidade da FS para produção de conídios e microescleródios de *T. harzianum* e *T. asperellum*, respectivamente. Urbina-Salazar et al. (2018) relataram que o cultivo de *T. harzianum* em meio de cultura formulado, além de aumentar a produção de conídios, é um bom procedimento para produzir enzimas, particularmente quitinase, dentro de um período de cultivo relativamente

curto. Cong et al. (2019) cultivaram *T. pseudokoningii* em FS em meio Batata Dextrose e relataram, que os metabólitos produzidos reduziram o crescimento micelial de *F. oxysporum f. sp. cucumerinum* e diminuíram a severidade da murcha em pepineiro

Como muitos fatores interferem diretamente na FS, existe o método estatístico Plackett-Burman (PB) é um projeto experimental que permite avaliar vários fatores simultaneamente, e suas interações, e em última instância levar à seleção de condições ideais para o cultivo de microrganismos em fermentação submersa. Como resposta podem-se usar características desejáveis para o produto final, enquanto reduz trabalho, tempo e custos (MONTGOMEY, 2005).

2.8 A ENZIMA QUITINASE

A quitina é um polímero linear formado por ligações covalentes β - (1,4) de N-acetil- D-Glucosamina (GlcNAc), é amplamente distribuída e abundante na natureza, sendo encontrada como polissacarídeo estrutural nos exoesqueletos de artrópodes, nas paredes celulares de fungos, em ovos de nematoides e na carapaça de crustáceos (BERINI et al., 2018; HALDER et al., 2013). A hidrólise da quitina é realizada por enzimas, pertencentes à grande família de β -glicosídeo hidrolase, destacando-se nesse grupo a quitinase (HALDER et al., 2013; SCHRANK, 2010). As quitinases hidrolisam as ligações β -1,4-glicosídicas entre o N-acetilresíduos de glucosamina (SHIVALEE et al., 2016).

Segundo Berini et al. (2018) quitinases são produzidas por fungos, bactérias e vírus e apresentam ação fungicida, bactericida e nematicida, pois a quitina faz parte da estrutura celular de fungos, bactérias e nematoides. Apesar do potencial de emprego, as quitinases têm sido pouco exploradas comercialmente, devido ao baixo número de organismos que apresentam alta produção, a baixa atividade e estabilidade e o alto custo de produção (BALDONI et al. 2020; KARTHIK et al 2014). Dessa forma, pesquisas com quitinase produzidas por microrganismos estão se tornando cada vez mais comuns para os mais diversos fins.

No trabalho de Schmaltz et al. (2021), o fungo *Beauveria bassiana* foi cultivado em meio líquido sintético e foi observada a produção de quitinase pelo fungo, sendo esse conhecido pela sua ação contra insetos-praga. No estudo realizado por Baldoni et al. (2020), por exemplo, foi verificada a produção de quitinase por *Trichoderma koningiopsis*, para tanto o fungo foi cultivado em fermentação em estado sólido, com o substrato de cultivo composto por farelo de trigo, quitina coloidal, e água de maceração de milho. A quitinase produzida causou alta

mortalidade de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*, quando aplicado na forma de filtrado de cultura ou como suspensão de esporos.

As quitinases secretadas pela bactéria habitante do solo *Chromobacterium* sp. cultivada em meio líquido sintético, demonstraram potencial para controlar fungos fitopatogênicos. A quitinase inibiu a germinação de conídios de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium guttiforme*, inibindo também o crescimento micelial destes patógenos. Nesse caso, a microscopia de força atômica, revelou alteração morfológica pronunciada da superfície celular dos conídios que estavam em contato com as quitinases em comparação com células não tratadas (SOUSA et al., 2019).

Enquanto isso, Loc et al. (2020) cultivaram *Trichoderma asperellum* em fermentação submersa em meio sintético, a quitinase obtida no processo, foi testada no controle *in vitro* e *in vivo* de dois fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum* sp. e *Sclerotinia rolfsii*, patógenos do amendoim e da manga, respectivamente. Os autores relataram diminuição de quase 100% no crescimento micelial dos patógenos *in vitro*, e relataram a diminuição da incidência e da severidade das doenças nas plantas de amendoim e nos frutos de manga.

Muitos outros fungos, bactérias e vírus produzem quitinases, entre eles pode-se citar os gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (BERINI et al., 2018). Ainda conforme Berini et al. (2018), as quitinases fúngicas com atividade fungicida foram menos investigadas do que as bacterianas, e a maioria dessas quitinases são secretadas por fungos filamentosos, com destaque para isolados de *Trichoderma*.

Industrialmente vários fatores podem influenciar a produção de enzimas quitinolíticas no meio de cultivo, incluindo: temperatura, pH e o tempo de cultivo do microrganismo (DAVYDOV e DUDKIN, 2016). Baldoni et al. (2020), descreveram que a produção de quitinase por *T. koningiopsis* aumentou progressivamente até atingir o valor máximo, às 72 h de cultivo. Resultado semelhante foi relatado por Binod et al. (2007) em que a produção máxima de quitinase por *Penicillium aculeatum* também foi em 72 h de cultivo. Quanto a temperatura, Asad et al. (2015) encontraram pico de atividade da produção de quitinase por *T. asperellum* em 25 ° C, após 96 h de cultivo.

2.9 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, J., JAVADI, A., GOLTAPPEH, EM, ZARE, R. & PHILLIPS, A.J.L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**. v. 25, p. 1–10, Dec. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3767/003158510X524150>> . Acesso em: 12 mar. 2020.

- ADNAN, M. et al. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. **Microbial pathogenesis**, v. 129, p. 7-18, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042>>. Acesso em: 12 nov. 2020. AGRIOS, G. N., 2005. Plant Pathology. Elsevier-Academic Press.
- ASAD, S. A. et al. Determination of lytic enzyme activities of indigenous *Trichoderma* isolates from Pakistan. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1053-1064, Oct./Dec. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140787>>. Acesso em: 15 set. 2020.
- ASH, G. J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, n. 3, p. 230–240, Mar. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.08.007>>. Acesso em: 15 set. 2020.
- ATANASOV, A. G. et al. Pecan nuts: A review of reported bioactivities and health effects. **Trends in food science & technology**, v. 71, p. 246-257, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.019>>. Acesso em: 12 Nov. 2020.
- ATANASOVA, L. et al. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 121, 2013. <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2164-14-121>>. Acesso em: 12 nov. 2020.
- BALDONI, D.B., et al. Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1897–1908, July 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-020-00334-w>>. Acesso em: 12 nov. 2020.
- BATISTA, D. C., et al. Avaliação da resistência de 47 acessos de mangueira aos fungos *Fusicoccum aesculi* e *Neofusicoccum parvum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 823-831, 2012. Disponível em: <[doi:10.1590/S0100-29452012000300023](https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000300023)>. Acesso em: 12 Jan. 2020.
- BERINI F., et al. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 818–838, May 2018. Acessado em: 16 de dez 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.002>>.
- BILITEWSKI, U. Chapter 11 Biosensors for bioprocess monitoring **Comprehensive analytical chemistry**, v. 44, p. 539-578, 2005. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(05\)44011-8](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(05)44011-8)>. Acesso em: 13 fev. 2020.
- BINOD, P. et al. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application to produce N-acetyl-Dglucosamine from colloidal chitin. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2742–2748, nov. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.030>>. Acesso em: 10 set. 2018.
- BOTELHO, L.S.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 343-348, Oct./Dec. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052008000400008&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 15 ago. 2018.

BROTMAN, Y. et al. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 3, p. e1003221, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003221>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

BRUCE, A. et al. Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. **Holzforschung**, v. 54, n. 5, p. 481-486, 2000. Disponível em:<<https://doi.org/10.1515/HF.2000.081>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 230, p. Oct. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>>. Acesso em: 22 out. 2019.

BUŠKO, M. et al. Relationships between volatile organic compounds with an emphasis on terpene compounds and genetic matrix in inoculated and non-inoculated winter wheat cultivars. **Chemistry and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 971-986, 2019.

CARVALHO, A. L. A. et al. Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation. **Biological Control**, v. 118, p. 16–25, Mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.014>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.181-188, 2010. Acesso em: 16 mai. 2020.

CHAGAS, L. F. B. et al. Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 437-445, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40415-015-0247-6>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

CHEN, Li-Hua et al. An antifungal compound from *Trichoderma harzianum* SQR-T037 effectively controls *Fusarium* wilt of cucumber in continuously cropped soil. **Australasian plant pathology**, v. 41, n. 3, p. 239-245, 2012. Acesso em: 16 mai. 2020

CHEN, S. et al. β -Resorcylic acid derivatives with α -glucosidase inhibitory activity from *Lasiodiplodia* sp. ZJ-HQ1, an endophytic fungus in the medicinal plant *Acanthus ilicifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 141-146, Sep. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.05.019>>. Acesso em: 26 jan. 2020.

CONG Y., et al. Mixed culture fermentation between *Rhizopus nigricans* and *Trichoderma pseudokoningii* to control cucumber *Fusarium* wilt. **Crop Protection** v. 124, 104857, Oct. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104857>>. Acesso em: 20 out. 2020.

COONEY, J. M.; HOTTER, G. S.; LAUREN, D. R. Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one by cell suspension cultures of *Pinus*

radiata. **Phytochemistry**, v. 53, n. 4, p. 447-450, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00590-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00590-7)>. Acesso em: 17 set. 2020.

DAVYDOV, V.V. DUDKIN V.I. On the Formation of a Nutation Line Under Conditions of Magnetic Field Modulation. **Russian Physics Journal**, v. 59, n. 7, p. 1008 – 1015, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11182-016-0867-8>> Acesso em: 26 out. 2020.

De SILVA, N. I. et al. Mycosphere Essays 9: Defining biotrophs and hemibiotrophs. **Mycosphere**, v. 7, n. 5 p. 545–559, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5943/mycosphere/7/5/2>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

DODD, S. L.; HILL, R. A.; STEWART, A. Control of *Athelia rolfsii* disease on lentil seedlings using 6-pentyl- α -pyrone. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 1033-1034, 2000.

EL-HASAN, A.; BUCHENAUER, H. Actions of 6-pentyl-alpha-pyrone in controlling seedling blight incited by *Fusarium moniliforme* and inducing defence responses in maize. **Journal of phytopathology**, v. 157, n. 11-12, p. 697-707, 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0434.2009.01565.x>>. Acesso em: 13 Nov. 2020.

ELSHERBINY, E. A. et al. *Trichoderma* volatile organic compounds as a biofumigation tool against late blight pathogen *Phytophthora infestans* in postharvest Potato tubers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 31, p. 8163-8171, 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c03150>>. Acesso em: 13 Nov. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03150>.

FLORES-MARTINEZ, H. et al. Process optimization for the extraction of antioxidants from Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) by the response surface methodology (RSM) approach. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 15, n. 3, p. 773-785, 2016. Disponível em: <<http://rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/1034>>. Acesso em: 13 nov. 2020.

FRONZA, D.; HAMANN, J. J. **Técnicas para o cultivo da noqueira-pecã**. Santa Maria-RS: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Politécnico, Núcleo de Fruticultura Irrigada. 2016. 402 p. Acesso em: 13 nov. 2020.

GARNICA-VERGARA, A. et al. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1496-1512, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26568541/>> Acesso em: 09 jun. 2020. DOI: 10.1111/nph.13725.

GIROTTI, J. et al. Use of solid phase microextraction coupled to capillary gas chromatography-mass spectrometry for screening *Fusarium* spp. based on their volatile sesquiterpenes. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 2, p. 121-128, 2010. Disponível em: <<https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/WMJ2009.1182>>. Acesso em: 09 jun. 2020. <https://doi.org/10.3920/WMJ2009.1182>.

GONG, Y. et al. Chemical and nutritive characteristics of tree nut oils available in the US market. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 8, p. 1600520, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.201600520>>. Acesso em: 09 jun. 2020. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600520>.

GRAVEL, V. et al. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride* possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 1968-1977, 2007. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.02.015>. Acesso em: 17 set. 2020.

GUPTA, V. G. et al. (Ed.). **Biotechnology and biology of Trichoderma**. Newnes, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/C2012-0-00434-6>>. Acesso em: 17 set. 2020.

HALDER, S. K. et al. Proficient biodegradation of shrimp shell waste by *Aeromonas hydrophila* SBK1 for the concomitant production of antifungal chitinase and antioxidant chitosaccharides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 88–97, April 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.01.011>>. Acesso em: 12 dez. 2020.

HANSON, James Ralph. **Natural products: the secondary metabolites**. Royal Society of Chemistry, 2003.

HILÁRIO, S., LOPES, A., SANTOS, L. et al. Botryosphaeriaceae species associated with blueberry stem blight and dieback in the Centre Region of Portugal. **Journal of Plant Pathology**, v. 156, p. 31–44, Jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10658-019-01860-6>>. Acesso em: 11 out. 2020.

HORBACH, R. et al. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 1, p. 51-62, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>>. Acesso em: 17 set. 2020.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 8, p. 3395-3405, 2015. Disponível em: <DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6494-4>>. Acesso em: 17 set. 2020.

IBGE. Lavoura Agrícola Municipal 2015 - Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. Disponível: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2014/default_xls.shtm>. Acesso em: 17 Jul. 2019.

JARONSKI, S. T.; MASCARIN, G. M. Mass production of fungal entomopathogens. **Microbial control of insect and mite pests: from theory to practice**, p. 141-155, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00009-3>>. Acesso em: 09 jun. 2020.

JELEŃ, Henryk et al. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. **Mycological Progress**, v. 13, n. 3, p. 589-600, 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11557-013-0942-2>>. Acesso em: 09 jun. 2020.

JIA, X. et al. Dynamic changes in phenolics and antioxidant capacity during pecan (*Carya illinoensis*) kernel ripening and its phenolics profiles. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 435, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/23/2/435/htm>>. Acesso em: 09 jun. 2020.

JUNGES, E.; et al. Bioproducts from *Trichoderma harzianum* as inducer of resistance to anthracnose in beans. In: *Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos*, 2018.

KARTHIK, N.; AKANKSHA, K.; PANDEY, A. Production, purification and properties of fungal chitinases—a review. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, p. 1025–1035, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25434097>>. Acesso em: 09 jun. 2020.

KESWANI, C. et al. Exploring the role of secondary metabolites of *Trichoderma* in tripartite interaction with plant and pathogens. In: **Agro-environmental sustainability**. Springer, Cham, 2017. p. 63-79. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-49724-2_4>. Acesso em: 09 jun. 2020.

KESWANI, C. et al. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 533-544, nov. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5344-5>>. Acesso em: 09 jun. 2020.

KLAIC, R. et al. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, p. 377–384, Apr/jun. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-66322017000200377&script=sci_arttext>. Acesso em: 18 dez. 2020.

KOBORI, N. N. et al. Liquid culture production of microesclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 11, p. 179–190, April 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

KOLOBET, L. V. et al. Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 123–131, Jan. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9449-9>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

KOTTB, M. et al. *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 995, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00995>>. Acesso em: 18 dez. 2020.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, July 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552112001998>. Acesso em: 30 jun. 2020.

LAZAROTTO, M et al. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 6,

p.440-448, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2014000600440&script=sci_arttext>. Acesso em: 30 jun. 2020.

LAZAROTTO, M. et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9390–9402, Nov. 2014. Disponível em: <<https://www.geneticsmr.org/articles/morphological-and-molecular-characterization-of-fusarium-spp-pathogenic-to-pecan-tree-in-brazil.pdf>>. Acesso em: 04 Jul. 2020.

LEE, J. et al. The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. **Holzforschung**, v. 66, n. 7, p. 883-887, 2012. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/journals/hfsg/66/7/article-p883.xml>>. Acesso em: 17 set. 2020.

LEE, S. et al. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016. Disponível em: <DOI: <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>>. Acesso em: 18 dez. 2020.

LINALDEDDU, B. T. et al. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. Nov. **Fungal Diversity**. v. 71, p. 201–214, Mar. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13225-014-0301-x>>. Acesso em: 06 ago. 2020.

LOC, N. H. et al. Characterization and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. **Micology**, v. 11, ed. 1, p. 38-48, Mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1703839>>. Acesso em: 28 jun. 2020.

LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ABC transporters. **Current opinion in structural biology**, v. 14, n. 4, p. 426-431, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.06.005>>. Acesso em: 17 set. 2020.

LOPES, A. R. O. et al. Preparation, characterization and cell viability of encapsulated *Trichoderma asperellum* in alginate beads. **Journal of Microencapsulation**, v. 37, p. 270–282, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/02652048.2020.1729884>>. Acesso em: 06 dez. 2020.

LUO, Y. et al. Understanding the Process of Latent Infection of Canker-Causing Pathogens in Stone Fruit and Nut Crops in California. **Plant Disease**, v. 103, n. 9, p. 2374–2384, 11 abr. 2019. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-11-18-1963-RE>> Acesso em: 15 nov. 2019. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1963-RE>.

MACIEL, C. G.; et al. *Lasiodiplodia theobromae* associated with seeds of *Pinus* spp. originated from the northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.43, n.107, p. 639-646, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/leitura.asp?Article=15&Number=107&p=n>> Acesso em: 12 jan. 2020.

MACIEL, C.G. et al. *Fusarium oxysporum* e *F. verticillioides* causando *damping-off* em *Pinus* spp. **Revista Ciência Agronômica** (UFC. Online), Fortaleza, v. 48, n. 1, p. 134-141, jan-marc., 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rca/v48n1/1806-6690-rca-48-01-0134.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2018. DOI: 10.5935/1806-6690.20170015. Acesso em: 13 fev. 2020.

MARRA, R. et al. Application of *Trichoderma* strains and metabolites enhances soybean productivity and nutrient content. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 7, p. 1814-1822, Jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06503>>. Acesso em: 13 fev. 2020.

MASCARIN, G.M. et al. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 6653–6665, May 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-6620-3>>. Acesso em: 10 abr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6620-3>.

MASCARIN, G.M., et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pest in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46–52, July 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>>. Acesso em: 10 abr. 2020.

MCCORMICK, S. P.; ALEXANDER, N. J.; HARRIS, L. J. CLM1 of *Fusarium graminearum* encodes a longiborneol synthase required for culmorin production. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 1, p. 136-141, 2010. DOI: 10.1128/AEM.02017-09.

MEDEIROS, F.H.V.; SILVA, J.C.P. da; PASCHOLATI, S.F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, A.M.; BERGAMIN FILHO, A., Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 5ed. Ouro Fino MG: Agronômica Ceres, 573 p. 2018.

MOYA, P. et al. Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. **Journal of Plant Protection Research**, v. 58, 2018. Disponível em: <<https://digital.cic.gba.gov.ar/handle/11746/9939>>. Acesso em: 10 dez. 2020.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 35-45, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0>>. Acesso em: 17 set. 2020.

MUTAWILA, C. et al. Isolation, production and in vitro effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. **Plant Pathology**, v. 65, n. 1, p. 104-113, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/ppa.12385>> Acesso em: 10 abr. 2020.

MYCOBANK. Search on: Mycobank names. Disponível em: Acesso em: 20 de agosto de 2019.

NIETO-JACOBO, M. F. et al. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 102, 2017. Disponível em: <DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>>. Acesso em: 10 abr. 2020.

PHILLIPS, A.J., et al. Families in Botryosphaerales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. **Fungal Diversity**, v. 94, p. 1–22, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13225-018-0416-6>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

PROCTOR, R. H.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular plant-microbe interactions* 1995 v.8 no.4 pp. 593. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/24895>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bm034130m>>. Acesso em: 17 set. 2020.

RESENDE, M. P. et al. Phosphate solubilization and phytohormone production by endophytic and rhizosphere *Trichoderma* isolates of guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess). **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 27, p. 2616-2623, 2014. Disponível em: <DOI: 10.1007/s40415-015-0247-6>. Acesso em: 12 jun. 2020.

REZENDE, L. C. de et al. Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 36, v. 113, p. 1-14, Jul. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-020-02882-7>> Acesso em: 12 jun. 2020.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 4, p. 369-378, 2005. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652030500058403>>. Acesso em: 12 jun. 2020.

ROLIM J. M. et al. First report of stem canker caused by *Neofusicoccum parvum* and *Pseudofusicoccum kimberleyense* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 3067, Sep. 2020. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-01-20-0082-PDN>>. Acesso em: 26 nov. 2020. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0082-PDN>.

ROLIM J.M. et al. First Report of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* on Pecan in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n.6, p. 1870, Mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/pdis-09-19-1956-pdn>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

ROSADO, A. W. C. et al. Phylogeny, identification, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2016. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PDIS-03-15-0242-RE>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

RUIZ, B. et al. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Critical reviews in microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/10408410903489576>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

SAKALIDIS, M. L. et al. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130,

p. 379–391, Mar. 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-011-9760-z>>. Acesso em: 06 out. 2020.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/phyto-96-0195>
Acesso em: 17 set. 2020.

SANCHEZ, A. D.; OUSSET, M. J.; SOSA, M. C. Biological control of *Phytophthora* collar rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. **Biological Control**, v. 135, p. 124–134, Aug. 2019. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.05.012>>. Acesso em: 02 mar. 2020.

SANTOS, L. L. et al. Nutritional composition, fatty acid profile, phytochemistry and evaluation of the effects of *Carya illinoensis* on diabetes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 8, p. 2595-2603, 2019. Disponível em:
<<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.14171>>. Acesso em: 12 dez. 2020.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.14171>.

SCHENKEL, D. et al. A meta-analysis approach for assessing the diversity and specificity of belowground root and microbial volatiles. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 707, 2015.
Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00707/full>>. Acesso em: 02 mar. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00707>.

SCHMALTZ, S. et al. Ultrasound-assisted fermentation for production of β -1,3-glucanase and chitinase by *Beauveria bassiana*. **Journal Of Chemical Technology And Biotechnology**, v. 96, p. 88-98, 2021. <https://doi.org/10.1002/jctb.6514>.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, p. 1267–1274, Dec. 2010. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>>. Acesso em: 02 mar. 2020.

SHIVALEE A. et al. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 7, n.2, p. 10-14, May 2016. Disponível em: <https://sciensage.info/jasr/admin/uploads/paper/JASR_0303161.pdf>
Acesso em: 12 set. 2020.

SILVA, T. W. R. et al. Pine Seeds Treatment with *Trichoderma* for *Fusarium* Control. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, p. 1-8, May 2019. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2179-80872019000200149&script=sci_arttext>.
Acesso em: 26 out. 2019.

SINGHANIA, R.R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, Jun. 2010. Disponível em:<
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022910000657?via%3Dihub>>.
Acesso em: 06 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>

SIROHI, R., et al. Cellulase Production from Pre-treated Pea Hulls Using *Trichoderma reesei* Under Submerged Fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, p. 2651–2659, Mar. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-018-0271-4?shared-article-renderer>>. Acesso em: 06 out. 2020.

SLIPPERS, B. & WINGFIELD, M. J. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 90–106, May-Aug. 2007. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1749461307000309?via%3Dihub>>.

Acesso em: 13 set. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>

SMERIGLIO, A. et al. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1244-1262, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.13630>. Acesso em: 17 set. 2020.

SOHRABI, M., MOHAMMADI, H., L. M. et al. Fungal pathogens associated with branch and trunk cankers of nut crops in Iran. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, p. 327–351, May 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-020-01996-w>>. Acesso em: 13 dez. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01996-w>

SOUSA A. J. S. et al. A thermostable chitinase from the antagonistic *Chromobacterium violaceum* that inhibits the development of phytopathogenic fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 126, p. 50–61, Jul 2019. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022919300456?via%3Dihub>>.

Acesso em: 16 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.03.009>.

TARUS, P. K. et al. Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 17, n. 2, 2003.

URBINA-SALAZAR, A. et al. Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. **Waste Biomass Valor**, v. 10, p. 2915–2923, May 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328-4>>.

Acesso em: 22 set. 2020.

VÁZQUEZ, N.C.R.; LÓPEZ, R.U. Retos y oportunidades para el aprovechamiento de la Nuez pecanera in México. Centro de Investigación y Asistencia in Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). 2016. 124 p. Acesso em: 13 set. 2020.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 80-86, 2008.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0885576508000568?via%3Dihub>>.

Acesso em: 17 set. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2008.05.005>.

VINALE, F. et al. Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 2032-2035, 2009.

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np900548p>>. Acesso em: 17 set. 2019.

<https://doi.org/10.1021/np900548p>.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2008. Disponível em:<

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071707002908?via%3Dihub>>.

Acesso em: 17 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>.

VINALE, F.; et al. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, p. 127-139, Jul. 2014. Disponível em: <<https://benthamopen.com/contents/pdf/TOMYCJ/TOMYCJ-8-127.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2019.

WALKER C. et al. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.3, 2016. Disponível em: < DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.1503871>>. Acesso em: 17 dez. 2020.

WELLS, L. Pecan. America's Native Nut tree. University of Alabama Press. 2017. 264 p.

WOODROOF, J. G. e WOODROFF, N. C. Pecan root growth and development. **Journal of Agricultural Research**, v. 49, p. 511-530, 1934. Disponível em: <<https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43968576/PDF>>. Acesso em: 13 ago. 2019.

YANG, Z. et al. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15, n. 4, p. 647-650, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1226861512001045?via%3Dihub>>. Acesso em: 02 mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2012.08.002>

YOSHIOKA, Yohei et al. Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. **Pest management science**, v. 68, n. 1, p. 60-66, Jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21674754/>>. Acesso em: 13 Nov. 2018.

ZEILINGER, S. et al. Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics. **Fungal biology reviews**, v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1749461316300082?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>.

ZHANG, J. et al. Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida athensensis* SB18. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 369-378, Oct. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096085241201067X>>. Acesso em: 29 set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.020>.

3 CAPÍTULO I - *Trichoderma asperellum* NO BIOCONTROLE *in vitro* DE *Lasiodiplodia theobromae* E *Pseudofusicoccum kimberleyense*

Lasiodiplodia theobromae e *Pseudofusicoccum kimberleyense* são patógenos causadores de cancro do tronco em *Carya illinoensis*. Para essa doença em noqueira-pecã, ainda não existe uma forma eficaz de controle, no entanto, devido a preocupações ambientais, o controle biológico pode ser uma medida promissora no manejo desses patógenos. O objetivo deste trabalho foi coletar e identificar isolados de *Trichoderma* spp. associados a raízes de noqueira-pecã, avaliar a ação dos mesmos no controle *in vitro* de *L. theobromae* e *P. kimberleyense*, e identificar os compostos com potencial fungicida produzidos por *Trichoderma* spp. em meio de cultivo líquido. Fungos do gênero *Trichoderma* spp. foram isolados do solo por meio da técnica de diluição seriada, após foram identificados pela técnica molecular utilizando, para tanto a região fator de alongação e, posteriormente os mesmos foram caracterizados morfológicamente. A ação antagônica de dois isolados de *T. asperellum* obtidos do solo rizosférico, e de um isolado obtido de um produto comercial foi avaliada, por meio do pareamento de culturas e pela técnica de metabólitos voláteis sobre *L. theobromae* e *P. kimberleyense*. Após foi realizada a otimização da forma de cultivo do antagonista tanto em relação ao crescimento, como no controle *in vitro* de *L. theobromae* e *P. kimberleyense*. A enzima quitinase foi quantificada e os compostos produzidos pelo antagonista foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os isolados obtidos do solo foram identificados molecularmente como pertencentes a espécie *T. asperellum*, sendo que as características morfológicas dando suporte para a análise molecular. Os isolados testados diminuíram o crescimento micelial de *L. theobromae* (S6) e *P. kimberleyense* (SM21) no teste de pareamento de culturas, com inibição entre 27,18% (SM21 x Qt) e 48,98% (S6 x Qt), bem como por metabólitos voláteis com variação de 7,14% (S6 x TR4) a 29,85% (SM21 x TR4). A condição de cultivo que gerou os filtrados com maior ação antifúngica foi a 8 (20 g/L de Água de Maceração de Milho (AMM), extrato de levedura 7,5 g/L, pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração de inóculo 10^5 esporos/mL) e a produção de biomassa seca variou de 7,26 a 40,87 g/L, para TR4 e TR1, nessa ordem. Os isolados de *Trichoderma asperellum* produziram quitinase, e as atividades máximas foram de 1,18, 0,86 e 0,13 U/mL para os isolados TR1, Qt e TR4 de *T. asperellum*, respectivamente. Dentre os compostos observados nos cromatogramas, alguns se destacam por terem ação bioativa conhecida, dentre eles os compostos derivados do pirano. Os isolados de *T. asperellum* produziram quitinase e compostos com potencial de biocontrole que, agindo sinergicamente, reduziram o crescimento micelial de *L. theobromae* e *P. kimberleyense* *in vitro*.

Palavras-chave: *Carya illinoensis*. Micoparasitismo. Metabólitos secundários. Quitinase. Análise cromatográfica.

Trichoderma asperellum* IN THE *in vitro* BIOCONTROLE OF *Lasiodiplodia theobromae* AND *Pseudofusicoccum kimberleyense

Lasiodiplodia theobromae and *Pseudofusicoccum kimberleyense* are pathogens that cause stem canker in *Carya illinoensis*. For this disease in pecan, there is still no effective form of control, however, due to environmental concerns, biological control can be a promising measure in the management of these pathogens. The objective of this work was to collect and identify isolates of *Trichoderma* spp. associated with pecan roots, to evaluate their action in the *in vitro* control of *L. theobromae* and *P. kimberleyense*, and to identify the compounds with fungicidal potential produced by *Trichoderma* spp. in liquid culture medium. Fungi of the genus *Trichoderma* spp. were isolated from the soil by means of the serial dilution technique, after they were identified

by the molecular technique using the elongation factor region for both, and later they were morphologically characterized. The antagonistic action of two isolates of *Trichoderma asperellum* obtained from the rhizospheric soil, and of an isolate obtained from a commercial product was evaluated, through the dual culture and by the technique of volatile metabolites on *L. theobromae* and *P. kimberleyense*. Afterwards, the optimization of the antagonist culture was performed, both in relation to growth and in the *in vitro* control of *L. theobromae* and *P. kimberleyense*. The chitinase enzyme was quantified and the compounds produced by the antagonist were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The isolates obtained from the soil were identified molecularly as belonging to the species *T. asperellum*, and the morphological characteristics supporting the molecular analysis. The tested isolates decreased the mycelial growth of *L. theobromae* (S6) and *P. kimberleyense* (SM21) in the dual culture test, with inhibition between 27,18% (SM21 x Qt) and 48,98% (S6 x Qt), as well as by volatile metabolites ranging from 7,14% (S6 x TR4) to 29,85% (SM21 x TR4). The cultivation condition that generated the filtrates with the greatest antifungal action was 8 (20 g/L of Corn Maceration Water (CMW), yeast extract 7,5 g/L, pH 5, Stirring 100 rpm, Sucrose 50 g/L, inoculum concentration 10^5 spores/mL) and dry biomass production ranged from 7,26 to 40,87 g/L, for TR4 and TR1 of *T. asperellum*, in that order. The isolates of *T. asperellum* produced chitinase, and the maximum activities were 1,18, 0,86 and 0,13 U/mL for the isolates of TR1, Qt and TR4, respectively. Among the compounds observed in the chromatograms, some stand out for having known bioactive action, among them the compounds derived from pyran. *T. asperellum* isolates produced chitinase and compounds with biocontrol potential that, acting synergistically, reduced the mycelial growth of *L. theobromae* and *P. kimberleyense* *in vitro*.

Keywords: *Carya illinoensis*. Mycoparasitism. Secondary metabolites. Chitinase. Chromatographic analysis.

3.1 INTRODUÇÃO

Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch, conhecida popularmente como noqueira-pecã, é uma espécie da família Juglandaceae, nativa da América do Norte e do México (VÁZQUEZ, 2016). No Brasil, a noqueira-pecã é cultivada principalmente, na região Sul. No estado do Rio Grande do Sul a produção alcança 2.561 toneladas de nozes, sendo as maiores áreas de cultivo localizadas nos municípios de Cachoeira do Sul, Anta Gorda, e Minas do Leão, com 610, 150 e 110 hectares, respectivamente (IBGE, 2015).

Devido à importância econômica e o aumento das áreas de cultivo da noqueira-pecã, o número de doenças relatadas para a cultura aumentou nos últimos anos, sobretudo as de origem fúngica. Estas causam sérios danos à cultura, com redução da produtividade, da qualidade do produto final e até mesmo a morte das plantas no pomar. Entre as doenças relatadas está o cancro do tronco causado por *Lasiodiplodia subglobosa*, tendo como sintomas pequenas lesões elípticas na casca do tronco e dos ramos, progredindo para cancras de 6 a 60 cm, com estrias negras próximas aos tecidos vasculares e, em casos mais severos, levando a planta à morte (POLETTO et al., 2016). Outras espécies fúngicas da família Botryosphaeriaceae causam o

sintoma de cancro do tronco, entre elas está *Pseudofusicoccum kimberleyense*, que já foi descrito em eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e manga (*Mangifera indica*) (SAKALIDIS et al., 2011) e mais recentemente em noqueira-pecã (ROLIM et al., 2020).

O controle de fungos da família Botryosphaeriaceae com fungicidas químicos é difícil de ser obtido, por esses serem agressivos, pouco específicos e cosmopolitas (DISSANAYAKE et al., 2016; LIMA et al., 2012). Ademais, o uso de fungicidas pode causar prejuízos, como a contaminação ambiental, o desequilíbrio da biota natural do solo, linhagens resistentes dos microrganismos patogênicos, diminuindo a população de microrganismos responsáveis pela ciclagem de nutrientes e antagonistas (BOUBAKRI et al., 2015).

Por outro lado, o controle biológico através da utilização de microrganismos do gênero *Trichoderma*, em alguns casos, é mais eficaz em controlar patógenos que podem sobreviver no solo, pois possuem boa adaptação a esse ambiente, inibindo diretamente as estruturas fúngicas do patógeno, ou colonizando as superfícies radiculares e o solo rizosférico, aumentando o crescimento da planta pela disponibilidade de nutrientes, tornando-a menos suscetível a doenças (SANCHEZ et al., 2019; CHEN et al., 2016). Além disso, *Trichoderma* spp. produz enzimas hidrolíticas como proteases, β -glucanases e quitinases, importantes no micoparasitismo, pois hidrolisam componentes da parede celular de microrganismos fitopatogênicos (MALLIKHARJUNA RAO; SILVA RAJU; RAVISANKAR, 2016).

No controle biológico a manutenção do antagonista vivo é condição para garantir o controle da doença. A reprodução e otimização de compostos produzidos por estes microrganismos em meio de cultivo, antes da aplicação do bioproduto torna-o uma alternativa viável, não havendo a necessidade de manter o organismo vivo ao final do processo. Dessa forma, somente os compostos liberados durante o desenvolvimento fúngico são utilizados para o controle, otimizando as potencialidades dos bioprodutos gerados, tanto no controle de fitopatógenos quanto na promoção de crescimento das plantas. Esses bioprodutos podem ser produzidos a baixo custo e em grandes quantidades, tendo maior facilidade de aplicação *in vivo* (VINALE et al., 2014).

Uma forma de obtenção desses bioprodutos é por meio de fermentação submersa. Nesse caso, o microrganismo é cultivado em meio líquido, onde além do crescimento de suas estruturas vegetativas e de reprodução, o fungo libera substâncias e enzimas que podem ser empregadas para os mais diversos fins, entre eles a indução de resistência e controle de fitopatógenos (CHEN et al., 2019). Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar isolados de *Trichoderma* spp. associados a raízes de noqueira-pecã, avaliar a ação de isolados

de *Trichoderma* spp. no controle *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense*, quantificar a enzima quitinase nos filtrados de cultura e identificar os compostos com potencial fungicida produzidos por *Trichoderma* spp.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Localização de realização dos experimentos e origem dos isolados fúngicos

O presente trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Santa Maria, localizada em Santa Maria, Rio Grande do Sul. Os experimentos foram realizados no Laboratório Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química e no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi no Departamento de Defesa Fitossanitária.

Foram utilizados três isolados de *Trichoderma* spp. como organismos antagonistas: dois provenientes de solo rizosférico de um pomar de plantas adultas de noqueira-pecã, obtidos por meio de diluição seriada até 10^{-4} (codificados como TR1 e TR4); e um isolado obtido de uma alíquota de produto comercial com 2×10^9 conídios por mL, que foi plaqueada para o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (codificado como Qt) (Tabela 1). Os dois isolados de *Trichoderma* spp. obtidos do solo foram caracterizados morfológicamente e identificados molecularmente. O isolado obtido da formulação comercial foi caracterizado morfológicamente. Como patógenos desafiantes foram utilizados dois isolados causadores de cancro do tronco em noqueira-pecã, *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense*, ambos provenientes da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, codificados como “S6” e “SM21” (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécie e codificação do isolado, coordenadas (GMS) do local de coleta, código de depósito do Genbank/produto, acesso SMDB e Código do Sisgen.

Espécie e codificação do isolado	Coordenadas (GMS) do local de coleta	Código GenBank/Produto	Código SMDB	Código Sisgen
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	29°43'29"S – 53°43'0,51"O	MK982653	18,371	A32646D
<i>Trichoderma asperellum</i> TR4	29°43'29"S – 53°43'0,51"O	MN082152	18,372	A32646D
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	-	URM - 5911	-	-

<i>Lasiodiplodia theobromae</i> S6	29°21'06"S – 52°58'39"O	X	18,362	A32646D
<i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i> SM21	29°41'05,12"S – 53°43'33,16"O	MH188485	18,364	A32646D

3.2.2 Caracterização molecular dos isolados de *Trichoderma* spp.

O DNA dos isolados TR1 e TR4 foi extraído por meio da raspagem do crescimento micelial do fungo, crescido por 7 dias em meio de cultivo BDA, com o Kit de extração ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep (Zymo Research, Irvine, EUA). Em seguida foi amplificado parte do gene do fator de alongação 1-alpha (EF1) com o par de primers iniciadores A-TEF_F (5' CCTTCAAGTACGCYTGGGTTC-3') e A-TEF_R (5' -TTCTTGGAGTCACCGGCAA-3'), conforme descrito por Perrone et al. (2011). As reações foram executadas em ciclador térmico de PCR (PTC-100 Bio-Rad) com 25 µl de solução contendo 17,35 µl de água ultrapura (milli-Q), 0,8 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de tampão 10X, 0,5 µl de cada primer (10 µM), 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de DNA polimerase (2,5 unidades) e 2,0 µl de DNA. O programa de desnaturação de PCR consistiu em um passo inicial a 94 °C por 3 min, seguidos de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, em seguida o anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 68 °C por 1 minuto, seguido extensão a 68 °C por 10 min.

Depois desses processos foi realizada a eletroforese para verificar a amplificação em gel de agarose a 1,5% e tampão TBE 1X. Para tanto, as amostras de DNA foram coradas com BlueGreen Loading Dye I[®] (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) e observadas em luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com o kit Gen Elute PCR clean-up Kit[®] (Sigma, Saint 22 Louis, EUA), conforme as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, EUA).

As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as do GenBank do National Center for Biotechnological Information – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências do GenBank que apresentaram os maiores escores e de outras espécies foram selecionadas e alinhadas, com as sequências obtidas no sequenciamento dos isolados da presente pesquisa, pelo algoritmo ClustalW (THOMPSON et al., 1994). A análise filogenética foi pelo método estatístico “Neighbour-joining” com 1000 replicatas, pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al, 2007). A similaridade das

sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada através do procedimento Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Após a identificação as sequências da presente pesquisa foram depositadas no GenBank.

3.2.3 Caracterização morfológica dos isolados de *Trichoderma* spp.

A taxa de crescimento micelial (TCM) foi determinada por meio da transferência de discos de meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), com 6 mm dos isolados de *Trichoderma* spp., obtidos de colônias com sete dias de crescimento, para outras placas com meio BDA, posteriormente mantidas a 25 ± 2 °C, com 12 h de fotoperíodo em BOD. Foram utilizadas cinco repetições, cada uma composta por uma placa. O crescimento micelial de cada isolado foi avaliado diariamente até os cinco dias de incubação, quando a primeira repetição colonizou toda a superfície do meio de cultura, foram mensurados dois sentidos diametralmente opostos. Para o diâmetro médio final da colônia utilizou-se o diâmetro medido no quinto dia de avaliação do crescimento micelial.

A esporulação foi avaliada aos sete dias de incubação, pela adição de 10 mL de água destilada estéril esterilizada, acrescida de uma gota do emulsificante Tween 80[®], em seguida procedeu-se a raspagem das colônias e peneiramento da suspensão em camada dupla de gaze. A suspensão foi agitada por 30 s e, com auxílio de uma micropipeta, retirou-se 1 mL e espalhou-se a mesma na câmara de Neubauer, para a posterior estimativa da concentração de conídios (conídios/mL). A coloração das colônias foi observada aos sete dias de incubação, com o auxílio da carta de cores Munsell Soil Color Chart (2009) e a caracterização dos conídios de *Trichoderma* foi feita por meio da mensuração da largura e comprimento de 30 conídios, por isolado.

3.2.4 Avaliação do pareamento de culturas

Para o teste de pareamento de culturas, um disco de meio de cultura BDA de 6 mm de diâmetro contendo micélio dos isolados patogênicos foi transferido para placas de Petri, contendo meio BDA, a aproximadamente 5 mm da borda da placa. Após, um disco com 6 mm de diâmetro de BDA, contendo micélio dos isolados de *Trichoderma* spp., foi transferido para a posição oposta de cada placa. Como tratamento testemunha utilizou-se somente o patógeno na placa. Todos os isolados fúngicos utilizados no experimento foram previamente crescidos

em BDA, por sete dias a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e fotoperíodo de 12 h em BOD. Após a instalação do experimento, as placas foram em BOD ($25 \pm 2\text{ °C}$, fotoperíodo 12h).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com os tratamentos organizados em bifatorial 4 x 2 (Antagonista: 3 isolados de *Trichoderma* spp. e ausência de *Trichoderma* spp. x Patógeno: *L. theobromae* e *P. kimberleyense*) com cinco repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri. Contudo, para a inibição do crescimento micelial, a testemunha somente com o patógeno, não foi considerada um tratamento, sendo utilizada somente na fórmula.

A avaliação do pareamento de culturas foi realizada ao quinto dia após a instalação dos experimentos, quando o isolado de crescimento mais rápido cobriu toda a superfície do meio na placa. A avaliação foi realizada por meio de medições do diâmetro das colônias em dois eixos, comparando o crescimento micelial de cada tratamento com a testemunha. Por fim, calculando a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), conforme a fórmula: $I(\%) = [(DC - DT) / DC] \times 100$, onde: I= percentagem de inibição; DC= diâmetro da colônia controle (mm); DT= diâmetro da colônia dos tratamentos (mm) (BALOUIRI et al., 2016).

3.2.5 Avaliação de metabólitos voláteis

O efeito inibidor de metabólitos voláteis foi aferido conforme descrito por Dennis & Webster, (1971), com adaptações. Nesta metodologia duas bases de placas de Petri de 90 mm contendo BDA receberam, individualmente, discos (6 mm de diâmetro) das culturas do patógeno e do antagonista, dispostos no centro das mesmas, após elas foram unidas lateralmente, com plástico filme transparente. Como testemunha, foram sobrepostas duas bases, uma contendo o patógeno e a outra somente meio de cultura. As placas utilizadas no experimento foram incubadas em BOD ($25 \pm 2\text{ °C}$, fotoperíodo 12h).

A avaliação da inibição do crescimento micelial foi feita quatro dias após a instalação do experimento, quando o isolado de crescimento micelial mais rápido preencheu a placa. A avaliação dos tratamentos foi realizada por meio de medições do diâmetro das colônias em dois eixos, comparando-se o crescimento radial de cada tratamento com a testemunha, calculando a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), conforme a fórmula: $I(\%) = [(CT - Ct) / CT] \times 100$, onde: I= percentagem de inibição; CT= crescimento final da testemunha; Ct= crescimento do fungo no tratamento (BALOUIRI et al., 2016).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com os tratamentos organizados em bifatorial 4 x 2 (Antagonista: 3 isolados de *Trichoderma* spp. e ausência de *Trichoderma* spp. x Patógeno: *L. theobromae* e *P. kimberleyense*) com cinco repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri. Contudo, para a inibição do crescimento micelial o tratamento testemunha (somente o patógeno) não foi considerado, sendo os dados utilizados somente na fórmula da percentagem de inibição do crescimento micelial.

3.2.6 Otimização da fermentação de isolados de *Trichoderma* spp.

Para a produção do filtrado de cultura foram realizadas fermentações dos isolados de *Trichoderma* spp. em erlenmeyers de 250 mL de capacidade, com volume utilizado de 100 mL de meio de cultura líquido. As condições de cultivo foram otimizadas por meio de delineamento experimental Plackett-Burman, com 11 corridas com três pontos centrais (Tabela 2). As variáveis testadas foram pH (5, 6 e 7) sacarose (50, 75 e 100 g/L), concentração de inóculo (10^5 , 10^6 e 10^7) e agitação (100, 140 e 180 rpm). O meio foi suplementado com 20 g/L de Água de Maceração de Milho (AMM) e extrato de levedura 7,5 g/L, conforme Junges et al. (2018). O pH foi ajustado com o auxílio de pHmetro digital.

Os erlenmeyers contendo o meio de cultivo foram autoclavados a 120 °C durante 20 min. Após o resfriamento, inoculou-se o meio de cultivo com 1 mL da suspensão de esporos dos isolados de *Trichoderma* spp. em câmara de fluxo laminar. A concentração de esporos foi obtida do crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. em placas de Petri (7 dias, 25 ±2 °C, 12 h fotoperíodo), nas quais foi adicionada água destilada e esterilizada e realizada a raspagem da superfície da colônia com alça de Drigalski, seguida de ajuste da suspensão em câmara de Neubauer. Em seguida, alocou-se os tratamentos em câmara incubadora com agitação orbital, sob velocidade de agitação previamente definida pelos tratamentos.

Transcorridas 96 h de incubação foi efetuada a separação da biomassa da parte líquida, obtendo-se os filtrados de cultura, executada por filtração em membrana milipore 12 micras e em seguida em 0,22 micras para assegurar que o filtrado de cultura estivesse livre de esporos fúngicos. Para a filtração foi utilizado um sistema de filtração de membrana acoplado em uma bomba de vácuo para reduzir o tempo da filtração. Os filtrados de cultura foram congelados para posterior emprego nos experimentos e a biomassa fúngica foi colocada em forno a 105 °C por 24 h para a determinação da massa seca.

Tabela 1 - Meios de cultura líquidos compostos por sacarose, água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), concentração de esporos, agitação do meio e o potencial de hidrogênio (pH), para o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp.

Trat.	pH	Sacarose (g/L)	Agitação (rpm)	Esporos []
1	7	50	100	10 ⁷
2	7	50	180	10 ⁵
3	7	100	180	10 ⁵
4	5	100	180	10 ⁷
5	7	100	100	10 ⁷
6	5	50	180	10 ⁷
7	5	100	100	10 ⁵
8	5	50	100	10 ⁵
9	6	75	140	10 ⁶
10	6	75	140	10 ⁶
11	6	75	140	10 ⁶

*[]: Concentração de esporos

3.2.7 Ação de metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense*

Para testar a ação dos filtrados de cultura no controle dos fungos patogênicos, primeiramente adicionou-se os filtrados de cultura na proporção de 10% no meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) fundente, este foi resfriado até 45 °C em câmara de fluxo laminar. O meio de cultura acrescido com os filtrados foi homogeneizado e em seguida vertido para placas de Petri, onde posteriormente depositou-se um disco de 6 mm de diâmetro dos fungos patogênicos no centro de cada placa. Para a testemunha, adicionou-se água destilada estéril ao meio de cultura na mesma proporção (10%) em substituição do filtrado de cultura (adaptado de ISAIAS et al., 2014). As laterais das placas foram vedadas com plástico filme transparente. As placas utilizadas nos experimentos foram incubadas em BOD a 25±2 °C com fotoperíodo de 12 h.

O delineamento experimental foi o Plackett-Burman, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri. A avaliação do teste de ação de metabólitos não voláteis, foi ao quinto dia após instalação dos experimentos quando uma

das repetições de um tratamento ocupou toda a superfície do meio. A avaliação foi realizada por meio de medições do diâmetro das colônias em dois eixos, comparando o crescimento micelial de cada tratamento com a testemunha. Por fim, calculando a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), conforme a fórmula: $I(\%) = [(DC - DT) / DC] \times 100$, onde: I= percentagem de inibição; DC= diâmetro da colônia controle (mm); DT= diâmetro da colônia dos tratamentos (mm) (BALOUIRI et al., 2016).

3.2.8 Determinação da atividade da enzima quitinase

A atividade da quitinase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores (método do DNS) liberados da quitina (SANTOS, 2011). Foram adicionados 250 μ L de caldo enzimático em tubos de ensaio, acrescidos de 0,005 g de quitina de caranguejo suspensa e dissolvida em 250 μ L de solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2. Os tubos foram incubados por 1 h a 37 °C, sob agitação constante de 100 rpm. Após a incubação, acrescentou-se 0,5 mL do reagente DNS, estes submetidos à fervura em banho-maria e esfriados posteriormente, para a adição de 8 mL de tartarato de sódio e potássio. Os tubos “brancos” também denominados de testemunha constituíram-se de quitina regenerada e tampão (500 μ L) sem a adição do caldo enzimático.

A absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro, a atividade enzimática foi determinada por meio da fórmula: $UI = D \times C \times V_t / (T \times V_e)$, em que D = diluição (mol); C = Concentração determinada pelo método DNS (mL^{-1}); V_t = volume total da reação (mL); T = Tempo de reação (min); V_e = volume da solução enzimática (mL).

A atividade da enzima quitinase foi expressa em U/mL, onde 1 U corresponde a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μ mol de N-Acetil-glucosamina por minuto, nas condições da reação. A atividade foi determinada para os filtrados de cultura dos três isolados de *Trichoderma* spp. Cada medida foi feita em triplicata, para cada condição de fermentação.

3.2.9 Análise cromatográfica dos compostos presentes nos filtrados de cultura dos isolados de *Trichoderma* spp.

Para a extração líquido-líquido, 10 mL dos filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. crescidos na condição 8, foram misturados a 50 mL dos solventes orgânicos, metanol, etanol, acetato de etila e hexano. A mistura foi realizada em balão volumétrico e as soluções resultantes

permaneceram em agitação durante 24 h em temperatura ambiente. Após esse período, as soluções foram colocadas em tubo de ensaio por 24 h (etanol e metanol) e 2 h (acetato de etila) e 1 h (hexano). O sobrenadante foi acondicionado em refrigerador para análises.

As moléculas produzidas foram determinadas usando um sistema de cromatografia gasosa multidimensional (Shimadzu, modelo MDGC/GCMS-2010) equipado com um detector de espectrometria de massa (QP-2010 Ultra) e detector de ionização de chama (FID-2010 Plus), e sistema automático de injeção (AOC-20i). Utilizou 1 µl das amostras, a qual foi injetada no modo split (30: 1) a 250 °C. Utilizou-se coluna de sílica fundida Rtx[®]-5ms GC (30 m × 0,25 mm.d. × 0,25 micron de espessura de filme) com 5% de difenil e 95% de dimetil polisiloxano (Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA). O gás hélio foi utilizado para o transporte a uma vazão de 1,69 mL/min para as amostras dissolvidas em acetato de etila e hexano e 1,33 mL/min para as dissolvidas em metanol e etanol. A temperatura de injeção foi de 270 °C para todas as amostras analisadas.

Para as amostras dissolvidas em acetato de etila e hexano, a temperatura do forno foi aumentada de 50 °C para 280 °C a 5 °C/min, preservando por 15 min. No caso das amostras em metanol e etanol, a temperatura do forno foi aumentada de 100 °C para 310 °C a 5 °C/min, permanecendo assim por 15 min. A temperatura da interface e da fonte de íons foi 280 °C. Para as amostras dissolvidas em acetato de etila e hexano os espectros de massa foram registados entre 35 e 500 amu a 0,30 scan/s, e para as amostras dissolvidas em metanol e etanol a 0,30 scan/s e acima de 35-700 amu. As moléculas foram identificadas por espectrometria de massa quadrupolo com o modo de impacto de elétrons (EI) gerado a 70 eV no modo de aquisição de varredura. Os compostos foram identificados por comparação do espectro de massa com os da base de dados (Wiley, 9^o Edition).

3.2.10 Procedimento estatístico

Os dados obtidos no teste de pareamento de culturas, metabólitos voláteis, metabólitos não voláteis, biomassa fúngica seca e determinação da atividade da enzima quitinase foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro utilizando o programa estatístico SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterização molecular e morfológica dos isolados de *Trichoderma* spp.

Na Tabela 3, são apresentados os acessos utilizados para a comparação filogenética obtidos a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), acompanhados de seu número de acesso, país de origem e referência do trabalho em que foram publicados. Foram selecionados acessos de diferentes espécies do gênero *Trichoderma* spp., para a confecção do dendrograma, bem como as mais semelhantes aos isolados da presente pesquisa.

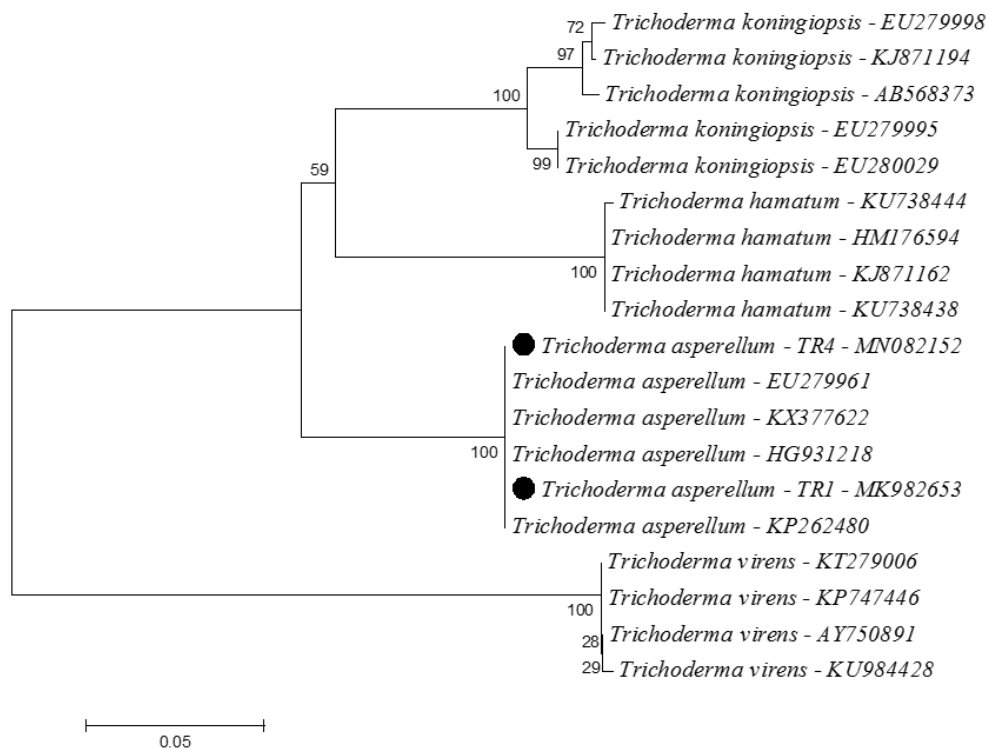
Tabela 3 – Espécie, acesso GenBank, país de origem e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α .

Espécie	Acesso do GenBank	País de origem	Referência
<i>Trichoderma asperellum</i>	EU279961	Colômbia	Hoyos-Carvajal et al. (2009)
<i>Trichoderma asperellum</i>	KX377622	Taiwan	Li et al. (2016)
<i>Trichoderma asperellum</i>	HG931218	Estados Unidos	Sandoval-Denis et al. (2014)
<i>Trichoderma asperellum</i>	KP262480	Brasil	Elias et al. (2014)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	EU279998	Colômbia	Hoyos-Carvajal et al. (2009)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	KJ871194	Nova Zelândia	Braithwaite et al. (2014)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	AB568373	Colômbia	Smith et al. (2013)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	EU279995	Colômbia	Hoyos-Carvajal et al. (2009)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	EU280029	Colômbia	Hoyos-Carvajal et al. (2009)
<i>Trichoderma hamatum</i>	KU738444	Áustria	Haas et al. (2016)
<i>Trichoderma hamatum</i>	HM76594	França	Anees et al. (2010)
<i>Trichoderma hamatum</i>	KJ871162	Nova Zelândia	Braithwaite et al. (2014)
<i>Trichoderma hamatum</i>	KU738438	Áustria	Haas et al. (2016)
<i>Trichoderma virens</i>	KT279006	Brasil	Montoya et al. (2016)
<i>Trichoderma virens</i>	KP747446	China	Liang e Wang (2015)
<i>Trichoderma virens</i>	AY750891	Estados Unidos	Samuels (2006)
<i>Trichoderma virens</i>	KU984428	China	Tian e Zheng (2016)

Com o sequenciamento da região do fator de alongação (TEF1- α) observou-se que os isolados TR1 e TR4 de *Trichoderma* spp. foram alocados no mesmo clado que outros isolados da espécie *Trichoderma asperellum* com bootstrap igual a 100 (Figura 1). Estes isolados foram

depositados no GenBank e tem como número de acesso MK982653 e MN082152, para TR1 e TR4, respectivamente. Dessa maneira, os isolados foram identificados como pertencentes a espécie *T. asperellum*.

Figura 1 - Dendrograma filogenético baseado no método Neighbour-joining, obtido a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- α .



A esporulação entre os isolados variou de $3,85 \times 10^7$ (TR1) a $6,31 \times 10^7$ (Qt) esporos/mL, em que o isolado de *T. asperellum* Qt apresentou a maior esporulação entre os isolados. O diâmetro médio final das colônias de todos os isolados de *T. asperellum* foi de 90 mm, apresentando similaridade entre os mesmos, a Taxa de crescimento micelial para os isolados TR1 e TR4 foi de 22,50 mm/dia e para o isolado Qt foi menor 19,79 mm/dia. O tamanho dos conídios também não variou muito entre os isolados, a média do comprimento de 30 conídios variou de 3,51 (Qt) a 3,85 (TR1) μm e a largura entre os conídios dos diferentes isolados variou de 3,19 (TR4) a 3,24 μm (Qt). As colônias apresentavam tons de verde para todos os isolados de *T. asperellum* (TR1, TR4 e Qt).

Tabela 4 - Características morfológicas e fisiológicas de isolados de *Trichoderma asperellum* cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA)

Isolado	Esp. (10^7)	DC (mm)	T.C.M. (mm/dia)	Esporo		Pigmentação do micélio	
				Larg. (μm)	Comp. (μm)	Superior	Inferior
TR1	3,85	90,00	22,50	3,29	3,85	verde acinzentado	verde acinzentado
TR4	5,77	90,00	22,50	3,19	3,52	verde oliva claro	verde claro
Qt	6,31	90,00	19,79	3,24	3,51	verde oliva claro	verde acinzentado

Fonte: Autor. Meio de cultura BDA: Esp.: esporulação aos sete dias; DC: diâmetro médio final da colônia. T.C.M.: taxa de crescimento micelial; Larg.: largura; Comp.: comprimento;

3.3.2 Avaliação do pareamento de culturas

Em relação ao crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense*, pode-se verificar que houve diferença significativa entre os tratamentos com o antagonista, em relação à testemunha (Tabela 5). No entanto, não houve diferença estatística entre os isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt). O tratamento testemunha do isolado *L. theobromae* foi o que apresentou o maior diâmetro da colônia no quinto dia de crescimento, ocupando toda a superfície do meio e diferenciando-se estatisticamente do *P. kimberleyense*.

Tabela 5 - Crescimento micelial e percentual de inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense* confrontados com isolados de *Trichoderma asperellum* no teste de pareamento de culturas.

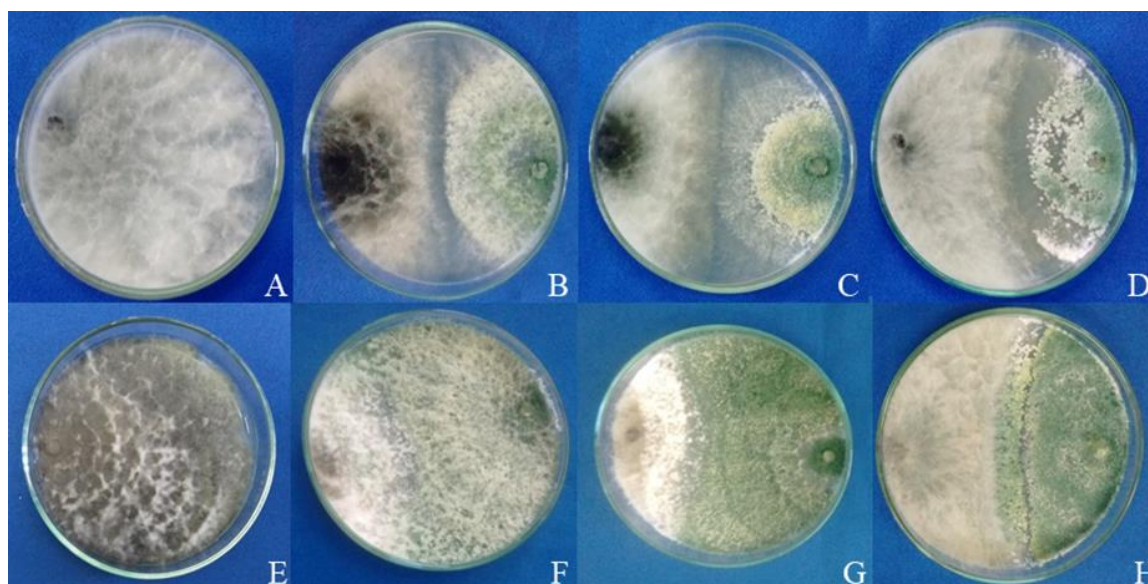
Tratamento	Crescimento micelial (mm)		% de inibição	
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i>
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	45,55 Ab*	40,67 Ab	43,38 Aa	30,44 Ba
<i>Trichoderma asperellum</i> TR4	41,06 Ab	42,61 Ab	48,98 Aa	27,18 Ba
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	42,80 Ab	42,44 Ab	46,80 Aa	27,41 Ba
Testemunha	90,00 Aa	58,47 Ba	-	-
CV(%)	12,67		10,84	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Onde: CV (%) = Coeficiente de variação.

Neste mesmo experimento, os isolados do antagonista inibiram o crescimento micelial dos isolados causadores de cancro do tronco submetidos ao teste de pareamento de culturas,

contudo, não houve diferença estatística entre os isolados de *T. asperellum*, somente entre *L. theobromae* e *P. kimberleyense*. Nesse sentido, comparando-se os isolados de *L. theobromae* e *P. kimberleyense*, quando confrontados com o mesmo isolado de *T. asperellum*, os valores de inibição foram superiores para o isolado de *L. theobromae*. A percentagem média de inibição para o isolado de *L. theobromae* ficou próxima a 47% enquanto que para o isolado de *P. kimberleyense* o efeito inibitório foi menor, alcançando no máximo 30,44% quando pareado com o isolado TR1 de *T. asperellum* (Figura 2).

Figura 2 - Resultados do teste de pareamento de cultura com isolados de *Trichoderma asperellum* em confronto com *Pseudofusicoccum kimberleyense* e *Lasiodiplodia theobromae* em meio BDA.



Onde: as letras correspondem aos diferentes tratamentos usados. A - *Pseudofusicoccum kimberleyense*; B - *P. kimberleyense* x *T. asperellum* (TR1); C - *P. kimberleyense* x *T. asperellum* (TR4); D - *P. kimberleyense* x *T. asperellum* (Qt); E - *Lasiodiplodia theobromae*; F - *L. theobromae* x *T. asperellum* (TR1); G - *L. theobromae* x *T. asperellum* (TR4); H - *L. theobromae* x *T. asperellum* (Qt).

3.3.3 Avaliação de metabólitos voláteis

De acordo com a Tabela 6, no teste de metabólitos voláteis, todos os tratamentos com *Trichoderma asperellum* inibiram o crescimento de *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense*, sendo que houve interação significativa entre os fatores. No quarto dia após a instalação do experimento, o isolado que apresentou maior crescimento micelial foi o de *L. theobromae* (90 mm), que preencheu toda a superfície do meio de cultura nesse período, ao mesmo tempo o isolado de *P. kimberleyense* cresceu somente 64,59 mm. Quanto a inibição do crescimento micelial, os metabólitos voláteis produzidos pelo isolado *T.*

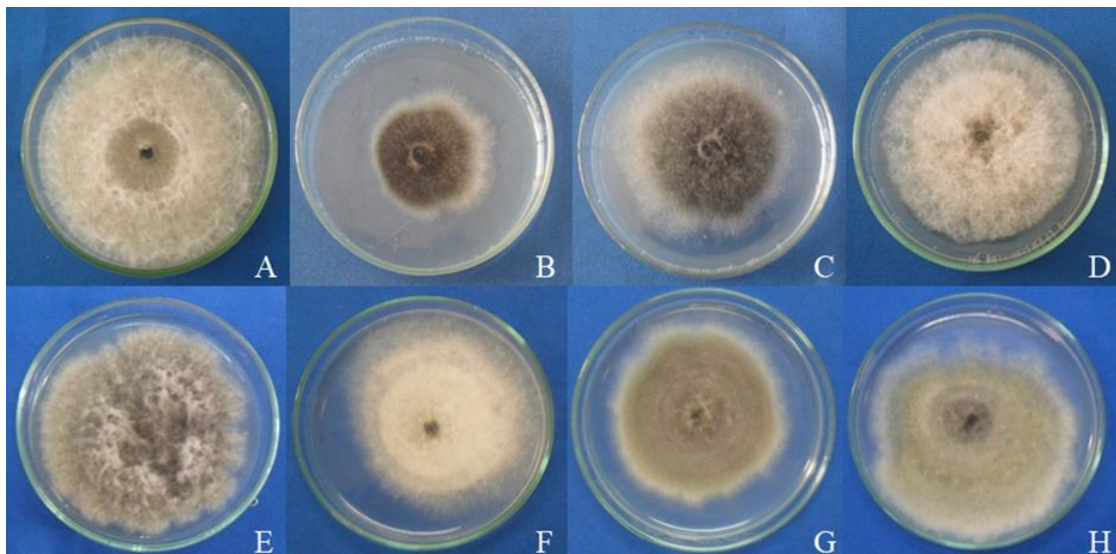
asperellum TR4 quando colocados em contato com o isolado de *L. theobromae* foram os que apresentaram menor percentual de inibição (7,14%), sendo este resultado diferente ao observado para o isolado de *P. kimberleyense* pois o maior percentual de inibição do crescimento micelial foi obtido quando ele foi confrontado com o isolado TR4 de *T. asperellum* (29,85%) (figura 3).

Tabela 6 - Crescimento micelial e percentagem de inibição de crescimento micelial *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense*, crescidos na presença de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma asperellum*, *in vitro* (25 ± 2 °C – fotoperíodo de 12 h).

Tratamento	Crescimento micelial (mm)		% de inibição	
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Pseudofusicoccum kimberleyense</i>
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	65,44 Ac*	53,25 Bb	27,29 Aa	17,56 Bb
<i>Trichoderma asperellum</i> TR4	83,57 Ab	45,31 Bc	7,14 Bb	29,85 Aa
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	77,57 Ab	54,18 Bb	13,81 Ab	16,11Ab
Testemunha	90,00 Aa	64,59 Ba	-	-
CV (%)	6,85		20,76	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade de erro, pelo Teste de Skott-Knott. Onde: CV (%) = Coeficiente de variação.

Figura 3 - Resultados do teste de metabólitos voláteis com isolados de *Trichoderma asperellum* na inibição do crescimento micelial de *Pseudofusicoccum kimberleyense* e *Lasiodiplodia theobromae* em meio BDA.



Onde: As letras correspondem aos diferentes tratamentos usados. A – *Lasiodiplodia theobromae*; B – *L. theobromae* x *T. asperellum* (TR1); C – *L. theobromae* x *T. asperellum* (TR4); D – *L. theobromae* x *T. asperellum* (Qt). E – *Pseudofusicoccum kimberleyense*; F – *P. kimberleyense* x *T. asperellum* (TR1); G – *P. kimberleyense* x *T. asperellum* (TR4); H – *P. kimberleyense* x *T. asperellum* (Qt);

3.3.4 Metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma asperellum* na inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense*

Na redução do crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*, no geral, os melhores resultados foram oriundos dos filtrados de cultura obtidos por meio da condição 8 de desenvolvimento dos isolados de *Trichoderma asperellum*, sendo as variáveis de cultivo: pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração inóculo 10^5 esporos/mL (Tabela 7). A maior redução foi alcançada pelo filtrado do isolado TR1, que se diferenciou estatisticamente dos demais e reduziu o crescimento micelial de *L. theobromae* em 49,12%.

Para os filtrados obtidos do isolado Qt de *T. asperellum*, as condições 2 e 3 também mostraram redução do crescimento micelial acima de 40%, maior, inclusive do que para a condição 8, para o isolado TR1 observou-se redução do crescimento micelial acima de 40% para a condição 5 e 6, e para o isolado TR4, para a condição 5, ou seja a condição de cultivo para obter o filtrado com maior efeito antifúngico varia conforme o isolado, e podemos eleger a condição 8 como a melhor, por mostrar maior estabilidade na produção de filtrados com efeito antifúngico.

Para *Pseudofusicoccum kimberleyense*, novamente se destaca a condição 8 como a que mais diminuiu o crescimento micelial do patógeno *in vitro* (tabela 8 e figura 4). Quando avaliados os filtrados de cultura obtidos do isolado TR1 de *T. asperellum*, a condição 8 (pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração inóculo 10^5 esporos/mL) foi a única condição que gerou filtrados com ação antifúngica. Esse patógeno demonstrou menor sensibilidade aos filtrados de cultura, obtidos dos isolados de *T. asperellum* do que de *L. theobromae*, sendo que o único com percentagem de inibição acima de 40% foi o filtrado obtido da condição 8 do cultivo do isolado Qt de *T. asperellum*.

Tabela 7 - Efeito dos filtrados de cultura de diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) no crescimento micelial (mm) e na percentagem de inibição do crescimento micelial (%) de *Lasioidiplodia theobromae*.

Trat	pH	Agitação (rpm)	Sacarose (g/L)	Esporos []	Crescimento micelial (mm)			Inibição (%)		
					TR1	TR4	Qt	TR1	TR4	Qt
1	7	100	50	10 ⁷	63,84 Bd*	90,00 Aa	52,39 Ce	29,07 Bb	0,00 Cd	41,79 Ab
2	7	180	50	10 ⁵	66,77 Bd	90,00 Aa	47,40 Ce	25,81 Bb	0,00 Cd	47,33 Aa
3	7	180	100	10 ⁵	90,00 Aa	90,00 Aa	47,34 Be	0,00 Bd	0,00 Bd	47,40 Aa
4	5	180	100	10 ⁷	90,00 Aa	90,00 Aa	88,06 Aa	0,00 Bd	0,00 Bd	2,16 Af
5	7	100	100	10 ⁷	49,82 Cc	52,97 Bd	71,19 Ac	44,64 Aa	41,14 Aa	20,90 Bd
6	5	180	50	10 ⁷	48,54 Bc	75,18 Ab	77,50 Ab	46,07 Aa	16,47 Bc	13,89 Be
7	5	100	100	10 ⁵	81,12 Cb	59,11 Bc	86,09 Aa	9,87 Bc	34,32 Ab	4,34 Cf
8	5	100	50	10 ⁵	45,79 Bd	51,48 Ad	50,66 Ae	49,12 Aa	42,80 Ba	43,71 Bb
9	6	140	75	10 ⁶	90,00 Aa	90,00 Aa	64,00 Bd	0,00 Bd	0,00 Bd	28,89 Ac
10	6	140	75	10 ⁶	90,00 Aa	90,00 Aa	65,79 Bd	0,00 Bd	0,00 Bd	26,90 Ac
11	6	140	75	10 ⁶	90,00 Aa	90,00 Aa	63,53 Bd	0,00 Bd	0,00 Bd	29,41 Ac
Testemunha					90,00 Aa	90,00 Aa	90,00 Aa	-		
CV (%)					8,50			13,15		

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

*[]: Concentração de esporos

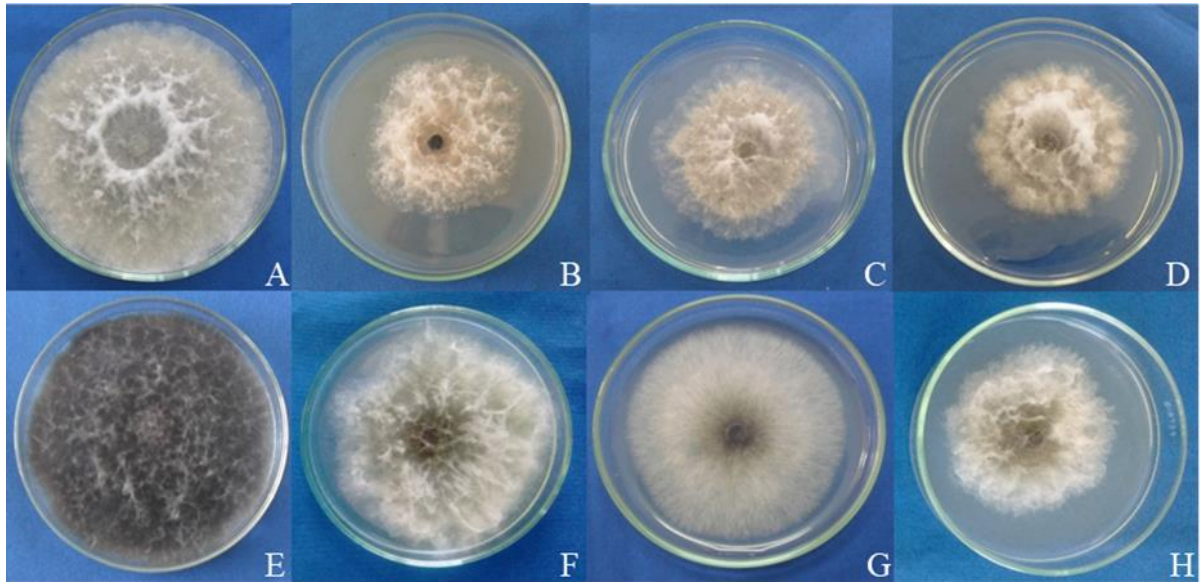
Tabela 8 - Efeito dos filtrados de cultura de diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) no crescimento micelial (mm) e na percentagem de inibição do crescimento micelial (%) de *Pseudofusicoccum kimberleyense*.

Trat	pH	Agitação (rpm)	Sacarose (g/L)	Esporos []	Crescimento micelial (mm)			Inibição (%)		
					TR1	TR4	Qt	TR1	TR4	Qt
1	7	100	50	10 ⁷	90,00 Aa*	87,54 Aa	73,71 Bb	0,00 Bb	0,00 Bc	15,79 Ab
2	7	180	50	10 ⁷	90,00 Aa	90,00 Aa	78,75 Bb	0,00 Bb	0,00 Bc	10,03 Ac
3	7	180	100	10 ⁵	90,00 Aa	82,22 Ba	90,00 Aa	0,00 Bb	6,06 Ab	0,00 Bd
4	5	180	100	10 ⁷	90,00 Aa	90,00 Aa	90,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ad
5	7	100	100	10 ⁷	90,00 Aa	90,00 Aa	90,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ad
6	5	180	50	10 ⁷	90,00 Aa	90,00 Aa	90,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ad
7	5	100	100	10 ⁵	90,00 Aa	79,94 Bb	90,00 Aa	0,00 Bb	8,67 Ab	0,00 Bd
8	5	100	50	10 ⁵	79,71 Ab	76,23 Ab	45,82 Bc	8,93 Ca	12,9 Ba	47,65 Aa
9	6	140	75	10 ⁶	90,00 Aa	88,33 Aa	90,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ad
10	6	140	75	10 ⁶	90,00 Aa	89,21 Aa	90,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ad
11	6	140	75	10 ⁶	90,00 Aa	89,61 Aa	90,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ad
Testemunha					87,53 Aa	87,53 Aa	87,53 Aa	-		
CV (%)					5,66			20,27		

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

*[]: Concentração de esporos

Figura 4 - Crescimento micelial de *Pseudofusicoccum kimberleyense* e *Lasiodiplodia theobromae* crescidos em contato com filtrados de cultura obtidos de diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) que apresentaram maior atividade antifúngica.



Onde: A - Testemunha *Pseudofusicoccum kimberleyense*; B - *P. kimberleyense* x Filtrado de *Trichoderma asperellum* (TR1) na condição 8; C - *P. kimberleyense* x Filtrado de *T. asperellum* (TR4) na condição 8; D - *P. kimberleyense* x Filtrado de *T. asperellum* (Qt) na condição 8; E - Testemunha *Lasiodiplodia theobromae*; F - *L. theobromae* x Filtrado de *T. asperellum* (TR1) na condição 8; G - *L. theobromae* x Filtrado de *T. asperellum* (TR1) na condição 6; H - *L. theobromae* x Filtrado de *T. asperellum* (Qt) na condição 8.

3.3.5 Atividade da enzima quitinase

Os resultados da biomassa fúngica e a atividade enzimática da quitinase obtida na execução dos 11 tratamentos da matriz de Plackett-Burman, para os diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) estão apresentados na Tabela 9. O tratamento com os menores valores de biomassa para todos os isolados de *Trichoderma asperellum* foi o T2, cujas variáveis independentes foram, pH 7, Agitação 180 rpm, Sacarose 50 g/L e concentração de inóculo de 10^5 esporos/mL.

Tabela 9 - Biomassa seca acumulada e atividade da enzima quitinase dos filtrados de cultura dos isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) em função dos tratamentos em meio de cultura líquido compostos por sacarose, água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), concentração de esporos, agitação do meio e o potencial de hidrogênio (pH) ajustado para cada tratamento.

Trat	pH	Agitação (rpm)	Sacarose (g/L)	Esporos []	Biomassa seca (g/L)			Atividade quitinase (UI/mL)		
					TR1	TR4	Qt	TR1	TR4	Qt
1	7	100	50	10 ⁷	26,70 Ab*	12,44 Bb	13,79 Bb	0,09 Ad	0,04 Bb	0,02 Bf
2	7	180	50	10 ⁵	25,65 Ab	7,26 Bb	12,25 Bb	0,71 Aa	0,04 Bb	0,07 Af
3	7	180	100	10 ⁵	34,64 Aa	26,34 Ba	37,09 Aa	0,26 Ac	0,13 Ba	0,17 Bd
4	5	180	100	10 ⁷	34,30 Aa	28,18 Aa	32,23 Aa	0,35 Ab	0,04 Cb	0,29 Bc
5	7	100	100	10 ⁷	34,09 Aa	32,43 Aa	36,20 Aa	0,03 Be	0,06 Bb	0,45 Ab
6	5	180	50	10 ⁷	25,78 Ab	11,17 Bb	14,19 Bb	0,63 Ba	0,03 Cb	0,86 Aa
7	5	100	100	10 ⁵	40,87 Aa	22,42 Ba	30,06 Ba	0,11 Ad	0,06 Bb	0,13 Ae
8	5	100	50	10 ⁵	26,41 Ab	24,59 Aa	19,43 Ab	1,13 Aa	0,03 Cb	0,56 Bb
9	6	140	75	10 ⁶	26,22 Ab	24,59 Aa	17,89 Ab	0,33 Ab	0,13 Ba	0,06 Cf
10	6	140	75	10 ⁶	29,48 Ab	23,79 Aa	21,13 Ab	0,33 Ab	0,11 Ba	0,06 Cf
11	6	140	75	10 ⁶	26,91 Ab	24,48 Aa	21,97 Ab	0,34 Ab	0,11 Ba	0,06 Cf
CV (%)					22,45			13,65		

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

*[]: Concentração de esporos

A quantidade de biomassa produzida por esse tratamento foi de 7,26, 12,25 e 25,65 g/L, para os isolados de *T. asperellum* TR1, Qt e TR4, respectivamente. O maior acúmulo de biomassa fúngica foi no T7 (pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 100 g/L e concentração de esporos de 10^5) com valor de 40,87 g/L para o isolado de *T. asperellum* TR1; enquanto que para o isolado TR4 foi o T5, com biomassa acumulada de 32,43 g/L; e para Qt foi o T3, com 37,09 g/L. Dentre os isolados, TR1 foi o que produziu a maior quantidade de biomassa fúngica durante as fermentações, diferenciando-se dos demais na maior parte das condições de cultivo testadas.

Os filtrados de cultura apresentaram atividade enzimática da quitinase, variando de 0,02 a 1,13 UI/mL. O isolado de *T. asperellum* TR4 foi o que teve menor atividade enzimática, variando de 0,03 (T6 e T8) a 0,13 UI/mL (T3 e T9), enquanto o isolado TR1 apresentou os valores mais elevados de 0,03 UI/mL (T5) atingindo o maior valor encontrado para todos os isolados (1,13 UI/mL) para o tratamento T8. Já Qt demonstrou a maior atividade enzimática no tratamento T6 com 0,86 UI/mL, diferenciando-se dos demais valores obtidos para o isolado, sendo aproximadamente o dobro do segundo maior valor encontrado (T8 = 0,56 UI/mL).

3.3.6 Análise cromatográfica dos compostos presentes no filtrado de cultura dos isolados de *Trichoderma asperellum*

A melhor condição para a produção de filtrados de *Trichoderma asperellum* com ação inibitória no crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense* (SM21) foi a 8 (pH 5, agitação de 100 rpm, 50 g/L de sacarose e 10^5 conídios/mL). Dessa forma, foi realizada a identificação dos compostos presentes nesse filtrado de cultura, por meio de cromatografia gasosa. Na Tabela 10 estão apresentados os compostos extraídos pelos diferentes solventes utilizados na extração líquido-líquido, com exceção do solvente acetato de etila que não extraiu nenhum composto que demonstrasse ação bioativa conhecida.

Cada solvente extrai compostos diferentes, devido principalmente às diferenças de polaridade existente entre eles. Na extração com metanol e etanol é possível observar compostos que possuem na sua cadeia grupos hidroxilas, pois esses solventes são compostos polares ou medianamente polares, assim como as hidroxilas. Além de hidroxilas, esses solventes também extraíram derivados de pironas, de ácidos dicarboxílico e de ácidos graxos. Por outro lado, a utilização de hexano como extrator permitiu a identificação de outros grupos

de compostos, como os alcanos, hidrocarbonetos e compostos com anéis aromáticos, esse solvente também extraiu compostos hidroxilas e ácidos graxos, contudo em menor proporção.

Tabela 10 - Identificação e percentagem dos compostos presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma asperellum* extraídos com os solventes etanol, metanol e hexano.

Nomenclatura Iuapac	Etanol		Metanol		Hexano	
	RT (min)	Área %	RT (min)	Área %	RT (min)	Área %
Isolado TR1						
Hidroxilas						
1,3-Propanediol, 2-(hydroxymethyl)-2-nitro-	5,055	8,390	-	-	-	-
2,7-dimethyl-4,5-octandiol	12,293	4,160	-	-	-	-
Ácidos graxos						
Hexadecanoicacid, 2-hydroxy-1-(hydroxymeth	21,893	21,77	23,514	19,510	-	-
9-Octadecenamide	24,094	4,460	-	-	-	-
Derivados do pirano e compostos biologicamente ativos						
4H-Pyran-4-one, 2-hydroxy-3-methyl-	6,957	11,432	-	-	-	-
Propanoicacid, silver(1+) salt	-	-	5,224	5,210	-	-
Isolado TR4						
Ácidos graxos						
Hexadecanoicacid, 2-hydroxy-1-(hydroxymeth	21,896	5,579	16,564	11,87	-	-
Octadecanoicacid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl	21,802	8,491	-	-	-	-
9-Octadecenamide	22,139	3,240	-	-	-	-
Pentadecanoicacid	17,479	5,173	-	-	-	-
11-Octadecenoic acid, methylester,	-	-	18,302	2,870	-	-
Hexatriacontane	-	-	-	-	21,668	44,771
Derivados do pirano e compostos biologicamente ativos						
4H-Pyran-4-one, 2-hydroxy-3-methyl-	6,190	7,080	-	-	-	-
2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4	7,161	4,930	7,160	5,201	-	-
Propanoicacid, silver(1+) salt	-	-	5,049	3,010	-	-
Celidoniol, deoxy	-	-	40,288	6,223	-	-
Isolado Qt						
Hidroxilas						
DL-Methyltartronic acid	3,055	2,251	-	-	-	-
2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione, 5-methyl-	-	-	6,183	4,602	-	-
Guanosine	-	-	12,294	6,641	-	-
Ácidos graxos						
Hexadecanoicacid, 2-hydroxy-1-(hydroxymeth	23,514	3,020	-	-	-	-
Octadecanoicacid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl	18,300	1,851	-	-	-	-

9-Octadecenamide	24,082	4,390	-	-	-	-
Hexadecanoicacid, methylester	-	-	16,564	10,560	-	-
11-Octadecenoic acid, methylester,	-	-	23,504	3,552	-	-
Derivados do pirano e compostos biologicamente ativos						
4H-Pyran-4-one, 2-hydroxy-3-methyl-	6,211	7,510	-	-	-	-
2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4	7,161	2,558	-	-	-	-
Propanoicacid, 1-methylethyl ester	-	-	-	-	7,413	0,610

3.4 DISCUSSÃO

No trabalho foram obtidos isolados de *Trichoderma* spp. de um pomar de noqueira-pecã, que foram caracterizados morfológicamente e molecularmente. Além disso, são abordados diferentes mecanismos pelos quais os isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) podem agir no controle de fungos fitopatogênicos, sendo para tanto, realizados diferentes testes.

As colorações apresentadas pelos isolados utilizados no presente estudo são similares às descritas por Singh e Sharma (2020), que estudando 15 isolados diferentes de *Trichoderma*, relataram cores que variaram de tons de branco, verde claro e verde escuro, e rápido crescimento micelial em meio de cultivo BDA. Segundo Saito et al. (2009) a coloração da colônia é especialmente influenciada pela quantidade de conídios e sua pigmentação, dessa forma, a coloração da colônia poderá exibir vários tons de verde, às vezes muito claro, devido a pouca esporulação. É importante salientar que as características morfológicas dos isolados de *Trichoderma* spp. estão mais ligadas à natureza do microrganismo do que as condições que os conídios estão submetidos (MILAN et al., 2015). Contudo, com o avanço da análise molecular, a caracterização morfológica tornou-se complementar.

Dessa forma, nesse estudo procedeu-se com a análise molecular dos isolados obtidos através de diluição seriada do solo, sendo que ambos foram identificados como *Trichoderma asperellum*. Lazarotto (2016) por meio do fator alongação também identificou isolados de *Trichoderma* de diferentes espécies, que foram alocadas em clados com sequências de *T. atroviride*, com “bootstrap” variando de 86 a 99%. Segundo Samuels (2006) o fator de alongação é eficiente na identificação de espécies de *Trichoderma*, uma vez que é uma região com maior variação que a ITS (Internal Transcribed Spacer), refletindo melhor as diferenças entre espécies e intraespecíficas. Os resultados do presente trabalho são positivos, já que foi

possível identificar as espécies de *Trichoderma* utilizando apenas o sequenciamento do fator de alongação, com “bootstrap” de 100%.

Após a identificação dos isolados, foi realizado o teste de confronto direto, neste, os microrganismos competem por nutrientes e espaço, onde aquele que for mais rápido em utilizar os recursos disponíveis, multiplica-se e coloniza rapidamente o meio de cultivo, se sobressaindo sobre o outro. Esse processo é semelhante ao que ocorre no solo, quando *Trichoderma* coloniza rapidamente a rizosfera impedindo que o microrganismo patogênico ataque a planta.

Os valores de inibição variaram de 27,41% (TR4 x SM21) a 48,98% (TR4 x S6), em que a maior redução do crescimento micelial foi para *Lasiodiplodia theobromae* (S6) em comparação com *Pseudofusicoccum kimberleyense* (SM21). Esse fato se explica, pelo crescimento micelial de *L. theobromae* ser maior no mesmo período de tempo, e assim o micoparasitismo entre ele e os isolados de *T. asperellum* estar ocorrendo de forma mais acentuada no momento da avaliação do experimento, enquanto que para *P. kimberleyense*, o principal mecanismo que estava agindo ainda era a antibiose.

Os isolados de *T. asperellum* não apresentaram diferença estatística entre si em relação ao controle *in vitro* para o mesmo isolado fitopatogênico, devido principalmente, ao fato desses isolados serem da mesma espécie, e por isso apresentarem crescimento micelial semelhante. Quando cultivados em meio líquido, os isolados de *T. asperellum* produziram maior biomassa seca, nos tratamentos com maior quantidade de sacarose adicionada ao meio, isso se deve ao fato da sacarose ser fonte de energia para o desenvolvimento fúngico. O meio líquido também permitiu que *T. asperellum* produzisse quitinase, uma importante enzima liberada por fungos desse gênero.

Durante o parasitismo, *Trichoderma* libera enzimas que hidrolisam a parede celular dos fungos fitopatogênicos e, entre essas enzimas está a quitinase (MALLIKHARJUNA RAO; SILVA RAJU; RAVISANKAR 2016). No presente estudo, a atividade da quitinase foi quantificada nos filtrados de cultura, testados na inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos, pois a quitina faz parte da composição da parede celular de fungos da família Botryosphaeriaceae (KAMIL et al., 2018). A atividade máxima da quitinase foi 1,13 UI/mL para o isolado TR1 e de 0,86 UI/mL para o isolado Qt nos tratamentos 8 e 6, respectivamente.

Além da quitinase, os isolados de *T. asperellum* cultivados em meio líquido produziram compostos com potencial fungicida e de indução de respostas de defesa em plantas. A antibiose é um importante mecanismo de ação, em que o antagonista libera metabólitos voláteis e/ou não-voláteis que inibem ou impedem o desenvolvimento de outros microrganismos que foi explorado no presente estudo. Nesse sentido, os isolados de *T. asperellum* produziram

compostos com potencial antifúngico em meio líquido, e estes que estavam presentes nos filtrados de cultura, inibiram o crescimento micelial dos patógenos na placa de Petri em percentagens variáveis. As maiores percentagens de inibição do crescimento micelial, foram obtidas para os filtrados oriundos do isolado TR1 no controle de *L. theobromae*, sendo a maior inibição de 49,12%.

Durante o crescimento dos isolados de *T. asperellum* em meio de cultivo líquido, os nutrientes eram utilizados para seu desenvolvimento e o fungo liberava metabólitos secundários no meio, responsáveis pela inibição do crescimento dos patógenos observados na presente pesquisa. Em experimentos semelhantes, Mishra et al. (2011) observaram que os compostos não voláteis, obtidos de filtrados de cultura de *Trichoderma viride*, inibiram o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum capsici*, *Sclerotinia rolfsii* e *Macrophomina phaseolina*. Por outro lado, os filtrados de cultura obtido de diferentes espécies de *Trichoderma* cultivadas em meio Batata Dextrose, e adicionados ao meio de cultivo de *Botryodiplodia palmarum* em diferentes concentrações (10, 20 e 30%), inibiram o crescimento micelial do patógeno entre 4,38-78,08%. Sendo que, na proporção de 10%, como a utilizada na presente pesquisa, a inibição variou de 4,38-4110%, sendo esses resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo (TAPWAI & PANDEY 2016). Em outros trabalhos esse efeito variou conforme a espécie fúngica, como no trabalho realizado por Adebessin et al. (2009). Nesse estudo, os autores avaliaram o efeito de filtrados de cultura de diferentes isolados de *T. asperellum* no crescimento micelial das espécies *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *Lasiodyplodia theobromae*, sendo que para *L. theobromae* não ocorreu inibição do crescimento micelial, e para as demais espécies a inibição variou conforme o isolado de *T. asperellum*.

Para avaliar a composição dos metabólitos voláteis presentes nos filtrados de cultura foi realizada a análise cromatográfica, e a partir disso verificou-se que mesmo sendo da mesma espécie fúngica, os isolados produziram metabólitos diferentes. Nesse sentido, Sivasithamparam e Ghisalberti (1998) comentam que a mesma espécie de *Trichoderma* pode produzir compostos diferentes e, por outro lado, diferentes espécies de *Trichoderma* podem originar o mesmo composto. Essa diferença na produção de compostos está diretamente relacionada ao microrganismo, ao ambiente (pH e temperatura) e ao substrato no qual é realizado o cultivo, e isso também interfere nos percentuais de inibição encontrados com a utilização dos filtrados de cultura (SANCHEZ et al., 2019).

Metanol e etanol são considerados compostos polares, por isso nessas amostras foram extraídas as hidroxilas, que apresentam o grupo funcional -OH solúveis nesse tipo de solventes,

(MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013). Segundo Resende et al. (2003) as hidroxilas, são espécies ativas de oxigênio que desempenham resposta de defesa das plantas ao reconhecer um ataque patogênico, ativando o sistema de sinalização imunológica da planta. Esses solventes também extraíram ácidos graxos, apesar deste composto ser considerado apolar, pois a parte da cadeia ligada ao grupo carboxila (COOH) é polar devido a presença de O eletronegativo, e por isso o composto foi solúvel nesses solventes. Conforme Pohl et al. (2011) os ácidos graxos têm ação antimicrobiana sobre fungos, principalmente na membrana celular, aumentando a fluidez da mesma, resultando em desorganização generalizada, que leva a alterações conformacionais e extravasamento dos componentes intracelulares.

Dentre os compostos extraídos produzidos pelos isolados de *T. asperellum*, alguns se destacam por terem ação bioativa conhecida. Entre eles estão o ácido hexadecanóico e alfa-humuleno, descritos como inseticidas, enquanto outros têm ação antimicrobiana, como é o caso de derivados do pirano, Celidoniol, deoxy, Pentadecanoicacid, 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl, Propanoicacid, 1-methylethyl ester e ácido 9-octadecenoico (BENELLI et al., 2018; LEE et al., 2007; BARRETO & VOOTLA, 2018; CHHOUK et al., 2018; ROGALSKA, 2021; FOO et al., 2015; WALTERS et al., 2004; ALI et al., 2017).

Apesar da identificação dos compostos bioativos nas amostras, a maior parte dos metabólitos (proporção maior que 40%) é composto por 2-Furancarboxaldehyde, 5-(Hydroxymetil), esse composto é um furano derivado da degradação de açúcares, no caso da presente pesquisa da sacarose (KUCHEROV et al., 2018). Esse dado não está apresentado na tabela, por se tratar de um composto do meio de cultivo e não do metabolismo do fungo. Jöbstl et al. (2010) comentam que o metabólito é formado por reduções e degradações catalisadas por ácidos, esses processos podem ter ocorrido durante o crescimento fúngico ou durante o armazenamento das amostras. Isso demonstra que durante o cultivo de *T. asperellum*, nem toda a sacarose empregada no meio foi aproveitada no desenvolvimento fúngico, sendo esse um fator que explica a variabilidade nos resultados da inibição de crescimento micelial dos patógenos.

3.5 CONCLUSÃO

Dessa maneira, conclui-se que os isolados de *Trichoderma asperellum* diminuíram o crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* e *Pseudofusicoccum kimberleyense* no teste de pareamento de culturas, bem como por metabólitos não voláteis. Das condições de crescimento testadas a que gerou filtrados de cultura com maior potencial fungicida foi a 8 (20

g/L de Água de Maceração de Milho (AMM), extrato de levedura 7,5 g/L, pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração de inóculo 10^5 esporos/mL). Os isolados de *Trichoderma asperellum* produziram quitinase e quando cultivados em meio líquido produziram compostos com potencial fungicida. Compreender os diferentes mecanismos de biocontrole com que os isolados de *T. asperellum* atuam sobre os agentes fitopatogênicos, leva a uma aplicação mais eficiente desses agentes de controle biológico. Em vista disso, os mecanismos de biocontrole são complexos e sua ação sinérgica resultou no controle dos patógenos *in vitro*.

3.6 REFERÊNCIAS

- ADEBESIN A. A., et al., Control of postharvest rots of banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 49, p. 302–308, 2009.
- ALI, A.; JAVAID, A.; SHOAIB, A. GC-MS analysis and antifungal activity of methanolic root extract of *Chenopodium album* against *Sclerotium rolfsii*. **Planta Daninha**, v. 35, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-83582017000100245&script=sci_arttex>. Acesso em: 25 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582017350100046>.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402. 1997. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/25/17/3389/1061651>>. Acesso em: 25 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776-782, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 71–79, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150>>. Acesso em: 25 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- BARRETTO D. A. e VOOTLA S. K. Análise por gc-ms de compostos bioativos e atividade antimicrobiana de *Cryptococcus rajasthanensis* ky627764 isolado de bombyx mori gut microflora. **International Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 525-538 (ISSN 2320-5407) 2018. <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/6700>
- BOUBAKRI, H. et al. Biocontrol potential of chenodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens. **New Zealand Journal Crop Horticulture Science**, v. 4 p.261-274, 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01140671.2015.1049620>> <https://doi.org/10.1080/01140671.2015.1049620>.

BENELLI, G. et al. Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 781–786, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29190597/>> Acesso em: 25 Jan. 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.044.

CHEN, X.; ZHANG, Y.; FU, X.; LI, Y.; WANG, Q. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. **Postharvest Biological Technology**, v. 115, p.113–121, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521415302039>>. Acesso em: 12 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>.

CHEN, L.; WANG, Z.; ZHANG, B.; et al. Production, structure and morphology of exopolysaccharides yielded by submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, p. 271–278, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861718312682>>. Acesso em: 25 fev. 2021. Doi: 10.1016/j.carbpol.2018.10.070.

CHHOUK, K.; WAHYUDIONO; KANDA, H.; GOTO, M. Efficacy of supercritical carbon dioxide integrated hydrothermal extraction of Khmer medicinal plants with potential pharmaceutical activity. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, p. 2944–2956, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343718302185>>. Acesso em: 17 jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.036>.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III- Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.57, p. 368-369, 1971. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0007153671800773>>. Acesso em: 17 jul. 2019. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3).

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFPA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542011000600001&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 17 jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.

FOO, L.W.; SALLEH, E.; MAMAT, S.N.H. P-53: Extraction and qualitative analysis of *Piper betle* leaves for antimicrobial activities. **International Journal of Engineering Technology Science and Research**, v. 2, p. 1–8, 2015.

HALL, T. A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

IBGE. Lavoura Agrícola Municipal 2015 - Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2014/default_xls.shtm>. Acesso em: 17 jul. 2019.

ISAIAS, C. O. et al. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052014000100005&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 25 Jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052014000100005>.

JÖBSTL, D. et al. Analysis of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid (HMFA) the main metabolite of alimentary 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) with HPLC and GC in urine. **Food chemistry**, v. 123, n. 3, p. 814-818, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814610005753>>. Acesso em: 25 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.015>.

JUNGES, E.; et al. Bioproducts from *Trichoderma harzianum* as inducer of resistance to anthracnose in beans. In: *Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos*, 2018.

KAMIL, F.H.; et al. Biological control of mango dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* using Streptomycete and Non streptomycete actinobacteria in the United Arab Emirates. **Frontiers in Microbiology**, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5945903/>>. Acesso em: 25 Jan. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00829.

KUCHEROV, F. A. et al. Chemical transformations of biomass-derived C6-furanic platform chemicals for sustainable energy research, materials science, and synthetic building blocks. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 7, p. 8064-8092, 2018. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssuschemeng.8b00971>>. Acesso em: 25 jan. 2021. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00971>.

LAZAROTTO, M. et al. Identificação de Fungos Emboloradores em Madeira de *Pinus* spp. em Laboratório. **Floram - Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 23, n. 4, p. 602-605, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2179-80872016005003108&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 25 jan. 2021. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.144615>.

LEE, P.S.; SHIN, D.H.; LEE, K.M. et al. Effects of guanosine on the pharmacokinetics of acriflavine in rats following the administration of a 1:1 mixture of acriflavine and guanosine, a potential antitumor agent. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, p. 372-380, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17424946/>>. Acesso em: 12 jan. 2019. DOI: 10.1007/BF02977621.

LIMA, J. S et al. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, p. 16. 2012. Disponível em: <periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/714/601>. Acesso em: 15 set. 2018.

MALLIKHARJUNA RAO KLN; SILVA RAJU K; RAVISANKAR H. Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. **Brasilian Journal of Microbiology**. v. 47, n. 1, p. 25-32, Jan 2016. Disponível

em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822016000100025&script=sci_abstract>. Acesso em: 10 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.007>.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. de. Organic compound solubility. *Química Nova*, v.36, n.8, p.1248-1255, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000800026>. Acesso em: 15 jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000800026>.

MILAN, M. D. et al. Light regimes used for producing *Trichoderma harzianum* conidia to control white mold in common bean plants. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 4, p. 434-439, 2015. Disponível em: <<https://search.proquest.com/docview/1765395202?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true>>. Acesso em: 12 Jan. 2019.

MISHRA, B. K. et al. Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L. **Scholars Research Library Archives of Applied Science Research**. 2011. Available from: www.scholarsresearchlibrary.com.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, v.115, n.11, p.1138-1150, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22036292/>. Acesso em: 25 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.07.008>.

POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: A review. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. 1 ed. Formatex: 2011. p. 61-71.

POLETTI, T. et al. First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, p. 1016-1016, 2016. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN>>. Acesso em 18 de out. de 2018. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN>.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, 28, p. 123-130, mar./abr. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/0D/fb/v28n2/a01v28n2.pdf> >. Acesso em: 5 jan. 2021.

ROLIM, J. M.; et al. First report of stem canker caused by *Neofusicoccum parvum* and *Pseudofusicoccum kimberleyense* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, 16 Sep 2020. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-01-20-0082-PDN>. Acesso em: 25 jan. 2021. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0082-PDN>.

ROGALSKA, M. J. Aktywność przeciwgrzybicza nowych pochodnych sulfonowych. Dissertação de mestrado, Jednostka prowadząca Zakład Katalizy i Chemii Metaloorganicznej (WCh/ZKChM), 2021.

SAITO, L. R. et al. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 2, n. 3, p. 203-216, 2011. Disponível em: <https://docplayer.com.br/67981234-Aspectos-dos-efeitos-do-fungo-trichoderma-spp-no-biocontrole-de-patogenos-de-culturas-agricolas.html>. Acesso em: 10 mar. 2021.

- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/phyto-96-0195>
Acesso em: 17 set. 2020. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195>.
- SANCHEZ, A.D.; OUSSET, M.J.; SOSA, M.C. Biological control of *Phytophthora* collar rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. **Biological Control**, v. 135, p. 124–134, 2019. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.05.012. Acesso em: 25 Jan. 2021.
- SAKALIDIS, M.L.; et al. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. **European Journal Plant Pathology**, v. 130, p. 379–391, 2011. DOI 10.1007/s10658-011-9760-z.
- SINGH, P.; SHARMA, M. Cultural and Morphological Characterization of Antagonistic *Trichoderma* Isolates. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 9, n. 3, p. 1041-1048, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.903.122>>. Acesso em: 07 jan. 2021.
- SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Trichoderma and Gliocladium*, p. 139–191, 1998.
- TAMURA, K. et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v.24, n. 8, p. 1596-1599, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article/24/8/1596/1105236>>. Acesso em: 17 jan. 2020. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
- TAPWAL A., PANDEY H. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* species for virulence efficacy on *Botryodiplodia palmarum*. **Current Life Sciences**. 2016, v. 2, p. 86-91. Available from: <https://zenodo.org/record/61073>.
- THOMPSON, J. D.; et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n.22, 4673-4680, 1994. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-abstract/22/22/4673/2400290>>. Acesso em: 25 Jan. 2019. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
- VÁZQUEZ, N.C.R.; LÓPEZ, R.U. Retos y oportunidades para el aprovechamiento de la Nuez pecanera in México. Centro de Investigación y Asistencia in Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). 2016. 124 p.
- VINALE, F.; et al. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, p. 127-139, 2014. Disponível em: <<https://benthamopen.com/contents/pdf/TOMYCJ/TOMYCJ-8-127.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2020.
- WALTERS, D.; et al. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**, v. 157, p. 87–90, 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/B:MYCO.0000012222.68156.2c>>. Acesso em: 13 fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.011>.

4 CAPÍTULO II - AÇÃO *in vitro* DE *Trichoderma asperellum* E DE METABÓLITOS BIOATIVOS EM PATÓGENOS DO GÊNERO *Fusarium* spp.

O cultivo de noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch.] está em expansão no Rio Grande do Sul e com isso houve aumento da incidência e do relato de doenças para a espécie. Entre as doenças identificadas, está a podridão de raízes causada por *Fusarium* spp. O controle de fungos fitopatogênicos, que sobrevivem no solo é difícil de ser obtido, sendo o controle através de antagonistas, como *Trichoderma* spp., uma forma viável. Assim, o objetivo do trabalho foi analisar diferentes formas de ação de *Trichoderma asperellum* no controle de *Fusarium* spp. *in vitro* e identificar a melhor condição de cultivo de *T. asperellum* para a produção de compostos com ação fungicida sobre *Fusarium* spp. A ação antagonística foi avaliada por pareamento de culturas, metabólitos voláteis e não voláteis. Para os metabólitos não voláteis foi feita a determinação da forma de cultivo em meio líquido que produzisse o filtrado de cultura com maior atividade antifúngica, para tanto testou-se pH (5, 6 e 7), agitação (100, 140 e 180 rpm), quantidade de sacarose (50, 75 e 100 g/L) e concentração inicial de inóculo (10^5 , 10^6 e 10^7), além do meio ser constituído, sem variação por 20 g/L de Água de Maceração de Milho (AMM), extrato de levedura 7,5 g/L. A inibição do crescimento micelial avaliada no pareamento de culturas variou de 10,38% (F18xTR1) a 43,17% (F20xTR4), já para os metabólitos voláteis a inibição foi menor, alcançando valores de no máximo 14,54% (F20xTR4). Quanto aos metabólitos não voláteis a condição 8 de crescimento (pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração inóculo 10^5 esporos/mL) para obtenção de filtrados de cultura, foi a que mais se destacou na inibição do crescimento micelial das diferentes espécies de *Fusarium* spp. estudadas, pois demonstrou maior estabilidade, mesmo quando eram alterados os isolados de *Fusarium* spp. e de *T. asperellum*. *T. asperellum* inibiu o crescimento de *Fusarium* spp., tanto no pareamento de culturas, como por metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis, demonstrando potencial para o controle dos patógenos causadores de podridão de raízes em noqueira-pecã.

Palavras-chave: podridão de raízes. Pareamento de culturas. Metabólitos voláteis. Metabólitos não voláteis.

***In vitro* ACTION OF *Trichoderma asperellum* AND BIOACTIVE METABOLITES IN PATHOGENS OF THE GENDER *Fusarium* spp.**

Pecan cultivation [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch.] is expanding in Rio Grande do Sul and with this there has been an increase in the incidence and reporting of diseases for the species. Among the diseases identified is root rot caused by *Fusarium* spp. The control of phytopathogenic fungi, which survive in the soil, is difficult to obtain, being the control through antagonists, such as *Trichoderma* spp., a viable form. Thus, the objective of the work was to analyze different forms of action of *Trichoderma asperellum* in the control of *Fusarium* spp. *in vitro* and to identify the best cultivation condition of *T. asperellum* for the production of compounds with fungicidal action on *Fusarium* spp. The antagonistic action was evaluated by matching cultures, volatile and non-volatile metabolites. For the non-volatile metabolites, the determination of the form of culture in liquid medium that produced the culture filtrate with greater antifungal activity was done, for this purpose, pH (5, 6 and 7), agitation (100, 140 and 180 rpm), amount of sucrose (50, 75 and 100 g / L) and initial inoculum concentration (10^5 , 10^6 and 10^7), in addition to the medium being constituted, without variation by 20 g L of Corn Maceration Water (CMW), yeast extract 7,5 g/L. The inhibition of mycelial growth evaluated in the dual culture ranged from 10,38% (F18xTR1) to 43,17% (F20xTR4), whereas for volatile metabolites the inhibition was lower, reaching values of a maximum of 14,54% (F20xTR4). As

for the non-volatile metabolites, the condition 8 of growth (pH 5, Agitation 100 rpm, Sucrose 50 g/L, inoculum concentration 10^5 spores/mL) to obtain culture filtrates, was the one that stood out the most in the inhibition of mycelial growth of the different species of *Fusarium* spp. studied, as it demonstrated greater stability, even when the isolates of *Fusarium* spp. and *T. asperellum*. *T. asperellum* inhibited the growth of *Fusarium* spp., both in the pairing of cultures, as by volatile and non-volatile metabolites, demonstrating potential for the control of pathogens that cause root rot in pecan.

Keywords: Root rot. Crop matching. Volatile. Non-volatile metabolites.

4.1 INTRODUÇÃO

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) foi introduzida no Brasil por imigrantes norte-americanos em 1865. Nos últimos anos, a área com plantios se expandiu devido principalmente ao aumento do valor pago pela noz (WELLS, 2017). Na safra de 2016/2017 foram produzidos 5453 t, sendo o Rio Grande do Sul responsável por 41,48% com 2135 hectares colhidos (IBGE, 2018). Contudo, com o crescimento da área plantada também se observou o aumento da incidência e do relato de doenças para a cultura.

Nesse sentido, *Fusarium* spp. foi descrito como patógeno associado a perdas nos viveiros produtores de mudas de noqueira-pecã. O patógeno ataca as plantas causando o apodrecimento de raízes e como sintomas reflexos, a deficiência nutricional, murcha da parte aérea e necrose foliar. Em sementeira, há relatos de perdas de até 10% das plântulas e quando os danos do patógeno estendem-se para o campo, as plantas atacadas possuem o desenvolvimento inicial reduzido (LAZAROTTO et al., 2014). Por serem fungos agressivos, pouco específicos e cosmopolitas, o controle de *Fusarium* spp. é difícil de ser obtido (SUMERELL et al., 2010). Os métodos de controle empregados apresentam resultados insatisfatórios principalmente, quando utilizados isoladamente. Por isso, o controle biológico é uma ferramenta que pode somar no manejo integrado de doenças (ROMEIRO, 2007).

Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os microrganismos que atuam no controle biológico de uma ampla gama de fitopatógenos, seja pela habilidade de inibir diretamente as estruturas fúngicas, por meio do parasitismo, predação ou antibiose, ou pela colonização das superfícies radiculares e do solo rizosférico, aumentando o crescimento da planta (promoção de crescimento), a disponibilidade de nutrientes e induzindo a resistência da planta a doenças (JEGATHAMBIGAI et al., 2010; CHEN et al., 2016). *Trichoderma* spp. pode agir contra o fitopatógeno por um ou mais mecanismos de ação, o que garante maior estabilidade de controle e um amplo espectro de ação (MEDEIROS et al., 2018).

Apesar de eficiente, o controle biológico enfrenta entraves para sua utilização. Entre eles pode-se destacar a dificuldade de armazenamento, dificuldades de estabilidade da formulação, possível incompatibilidade entre ingredientes gerando dificuldades na aplicação *in vivo* (MACHADO et al., 2012). Dessa forma, segundo Vinale et al (2008), a utilização de bioprocessos que deixariam o processo de formulação mais eficiente, sem necessariamente manter o microrganismo vivo, otimizaria as potencialidades dos bioprodutos gerados, tanto no controle de fitopatógenos, quanto na promoção de crescimento das plantas. Esses bioprodutos podem ser produzidos a baixo custo e em grandes quantidades, tendo maior facilidade de aplicação *in vivo*.

Uma forma de obtenção desses bioprodutos é por fermentação submersa. Nesse caso, o microrganismo é cultivado em meio líquido, no qual, além do crescimento de suas estruturas vegetativas e de reprodução, há liberação de substâncias e enzimas que podem ser empregadas para os mais diversos fins, entre eles a indução de resistência, controle de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas (VINALE et al., 2014). Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antagonista dos isolados de *Trichoderma asperellum in vitro* sobre *Fusarium* spp., por meio do pareamento de culturas, metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Origem dos isolados fúngicos

Para os experimentos foram utilizados três isolados de *Trichoderma asperellum* e três de *Fusarium* spp. Quanto aos isolados de *T. asperellum*, um foi obtido de suspensão de esporos de uma formulação comercial com 2×10^9 conídios por mL plaqueada para o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (codificado como Qt) e dois de solo rizosférico de um pomar de plantas adultas de noqueira-pecã obtidos por meio de diluição seriada até 10^{-4} (codificados como TR1 e TR4) (Capítulo I). Os isolados de *Fusarium* spp., causadores de podridão de raízes, estavam armazenados em solução salina na micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria, e identificados como *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti* e *F. graminearum*, codificados como “F17, F18 e F20”, respectivamente (Tabela 1). A identificação morfológica, molecular e patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp. foram realizadas no estudo de Lazarotto (2013).

Tabela 1 - Espécie e codificação dos isolados, coordenadas (GMS) do local de coleta e código de depósito do GenBank/produto

Espécie e codificação do isolado	Coordenadas (GMS) do local de coleta	Código GenBank (TEF - 1 α)/Produto	Código Sisgen
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	29°43'29"S – 53°43'0,51"O	MK982653	A32646D
<i>Trichoderma asperellum</i> TR4	29°43'29"S – 53°43'0,51"O	MN082152	A32646D
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	-	URM - 5911	-
<i>Fusarium oxysporum</i> F17	29°43'13.0"S- 53°43'1.90"O	KF022242	AFD5702
<i>Fusarium equiseti</i> F18	28°53'54.7"S- 52°01'59.9"O	KF601580	AFD5702
<i>Fusarium graminearum</i> F20	28°53'54.7"S- 52°01'59.9"O	KF022238	AFD5702

4.2.2 Pareamento de culturas

Para o pareamento de culturas todos os isolados fúngicos foram previamente crescidos em BDA (sete dias a 25°C \pm 2°C e fotoperíodo de 12 h). Um disco de meio de cultura BDA de 6 mm de diâmetro contendo micélio de *Fusarium* spp., foi transferido para placas de Petri, também contendo meio BDA, a aproximadamente 5 mm da borda da placa. Em seguida um disco de 6 mm de diâmetro de BDA, contendo micélio dos isolados de *Trichoderma asperellum* foi transferido para a posição oposta de cada placa, sendo a testemunha composta somente com o patógeno na placa. Após a instalação do experimento, as placas foram incubadas a 25°C \pm 2°C com fotoperíodo de 12 h em BOD.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com os tratamentos organizados em bifatorial 4x3 (Antagonista: 3 isolados de *T. asperellum* e ausência de *T. asperellum* x 3 isolados de *Fusarium* spp.) com cinco repetições, sendo cada repetição uma placa de Petri. Para o experimento de inibição do crescimento micelial, o tratamento somente com os patógenos não foi considerado. A avaliação do pareamento de culturas foi realizada no sexto dia quando o isolado de crescimento mais rápido cobriu toda a superfície do meio na placa.

A avaliação foi por meio de medições do diâmetro das colônias em dois sentidos, comparando o crescimento micelial de cada tratamento com a testemunha, calculando-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), conforme descrito por Balouiri et al.,

(2016): $I(\%) = [(DC-DT)/DC] \times 100$, onde: I= percentagem de inibição; DC= diâmetro da colônia controle (mm); DT= diâmetro da colônia dos tratamentos (mm).

4.2.3 Ação de metabólitos voláteis

Para avaliar a ação de metabólitos voláteis de *Trichoderma asperellum* sobre *Fusarium* spp., duas bases de placas de Petri contendo BDA receberam, individualmente, discos (6 mm de diâmetro) das culturas do patógeno e do antagonista, dispostos no centro das placas, após as placas foram unidas lateralmente, com plástico filme transparente. Como testemunha, foram sobrepostas duas bases, uma contendo o patógeno e a outra somente meio de cultura. As placas utilizadas no experimento foram incubadas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h (DENNIS & WEBSTER, 1971).

O delineamento experimental foi o Inteiramente Casualizado, com os tratamentos organizados em análise bifatorial 4x2 (Antagonista: 3 isolados de *T. asperellum* e ausência de *T. asperellum* x Patógeno: *Fusarium* spp.). A avaliação da inibição do crescimento micelial para *Fusarium* spp. foi realizada no quinto dia, quando o isolado de crescimento micelial mais rápido preencheu a superfície do meio na placa de Petri. A avaliação foi realizada por meio de medições do diâmetro das colônias em dois sentidos, comparando o crescimento micelial de cada tratamento com a testemunha, determinando a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), com a fórmula: $I(\%) = [(DC-DT)/DC] \times 100$, onde: I= percentagem de inibição; DC= diâmetro da colônia controle (mm); DT= diâmetro da colônia dos tratamentos (mm) (BALOUIRI et al., 2016).

4.2.4 Ação de metabólitos não voláteis

4.2.4.1 Otimização da fermentação dos isolados de *Trichoderma asperellum*

As fermentações dos isolados de *Trichoderma asperellum* foram realizadas em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, com volume utilizado de 100 mL de meio de cultura líquido. As condições de cultivo foram otimizadas por meio de um delineamento experimental Plackett-Burman, com 11 corridas com 3 pontos centrais (Tabela 2). O meio de cultivo era composto sem variação por 20 g/L de Água de Maceração de Milho (AMM) e extrato de levedura 7,5 g/L, adaptado de Junges et al. (2018). As variáveis testadas foram pH (5, 6 e 7),

sacarose (50, 75 e 100 g/L), concentração de inóculo (10^5 , 10^6 e 10^7) e rotação (100, 140 e 180 rpm).

Tabela 2 - Tratamentos dos meios de cultura líquido compostos por sacarose, água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), concentração de esporos, agitação do meio e o potencial de hidrogênio (pH), para o crescimento dos isolados de *Trichoderma asperellum*

Trat.	pH	Sacarose (g/L)	Agitação (rpm)	Esporos []
1	7	50	100	10^7
2	7	50	180	10^5
3	7	100	180	10^5
4	5	100	180	10^7
5	7	100	100	10^7
6	5	50	180	10^7
7	5	100	100	10^5
8	5	50	100	10^5
9	6	75	140	10^6
10	6	75	140	10^6
11	6	75	140	10^6

O pH do meio de cultivo foi ajustado com o auxílio de pHmetro digital e em seguida o meio foi autoclavado a 120 °C por 20 min. Após o resfriamento, inoculou-se com 1 mL da suspensão de esporos dos isolados de *T. asperellum* em câmara de fluxo laminar. A concentração de esporos foi obtida do crescimento dos isolados de *T. asperellum* em placas de Petri (7 dias, 25 ± 2 °C, 12 h fotoperíodo), nas quais foi adicionada água e feita a raspagem da superfície da colônia com alça de Drigalski, seguida da determinação da concentração de esporos em câmara de Neubauer e ajuste. Posteriormente, alocou-se os erlenmeyers em agitador orbital sob agitação definida pelos tratamentos.

Transcorridas 96 h de incubação foi efetuada a separação da biomassa da parte líquida (filtrados de cultura), executada por filtragem em membrana milipore 12 micras e em seguida na de 0,22 micras para assegurar que o filtrado de cultura estivesse livre de esporos fúngicos. Em ambos os casos foi utilizada uma bomba de vácuo para reduzir o tempo da filtração. Os

filtrados de cultura foram congelados para posterior emprego nos bioensaios. As fermentações foram realizadas em triplicata, para cada uma das condições.

4.2.4.2 Ação dos filtrados de cultura

Para testar a ação dos filtrados de cultura obtidos no controle dos fungos do gênero *Fusarium* spp., primeiramente adicionou-se os filtrados de cultura na proporção de 10% ao meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) fundente, este foi resfriado até 45 °C em câmara de fluxo laminar. O meio de cultura acrescido com os filtrados de cultura foi transferido para placas de Petri, onde depositou-se um disco de 6 mm de diâmetro da cultura monospórica dos fungos patogênicos no centro de cada placa. Para a testemunha, no lugar do filtrado, acrescentou-se água ao meio na mesma proporção (10%). As laterais das placas foram vedadas com plástico filme transparente (adaptado de Isaias et al., 2014). As placas utilizadas nos experimentos foram incubadas em BOD a 25±2 °C com fotoperíodo de 12 h.

Para as análises, o delineamento experimental foi o Inteiramente Casualizado, com os tratamentos organizados em bifatorial 11x3 (As 11 corridas do teste Plackett-Burman x Isolados de *Trichoderma asperellum*). O delineamento experimental foi o Plackett-Burman, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri. A avaliação do teste de ação de metabólitos não voláteis foi realizada ao sexto dia após montar os experimentos para *F. graminearum* e *F. equiseti* e no oitavo dia para *F. oxysporum*. A avaliação foi por meio de medições do diâmetro das colônias em sentidos diametralmente opostos, comparando o crescimento micelial da testemunha com cada tratamento, calculando-se a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), conforme a fórmula: $I(\%) = [(DC - DT) / DC] \times 100$, onde: I= percentagem de inibição; DC= diâmetro da colônia controle (mm); DT= diâmetro da colônia dos tratamentos (mm) (BALOUIRI et al., 2016).

4.2.5 Procedimento estatístico

Foi verificado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, no Programa BioEstat 5.0. Os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{x+0,5}$. A comparação das médias foi pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com o software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Pareamento de culturas

No pareamento de culturas, de maneira geral, os isolados seguem o mesmo comportamento para diâmetro final da colônia e percentual de inibição do crescimento micelial, pois essas são variáveis correlacionadas. Em relação ao crescimento micelial, o isolado de *Fusarium graminearum* foi o que apresentou o maior diâmetro da colônia no quinto dia após a instalação de experimento, diferenciando-se dos demais, seguido de *Fusarium equiseti* e *Fusarium oxysporum*. Para todos os isolados, o tratamento testemunha teve o maior diâmetro final da colônia, diferenciando-se estatisticamente dos demais onde houve pareamento com os isolados de *Trichoderma asperellum* (Tabela 3).

Tabela 3 - Crescimento micelial e percentual de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* (F17), *Fusarium equiseti* (F18) e *Fusarium graminearum* (F20) confrontados com isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) no teste de pareamento de culturas.

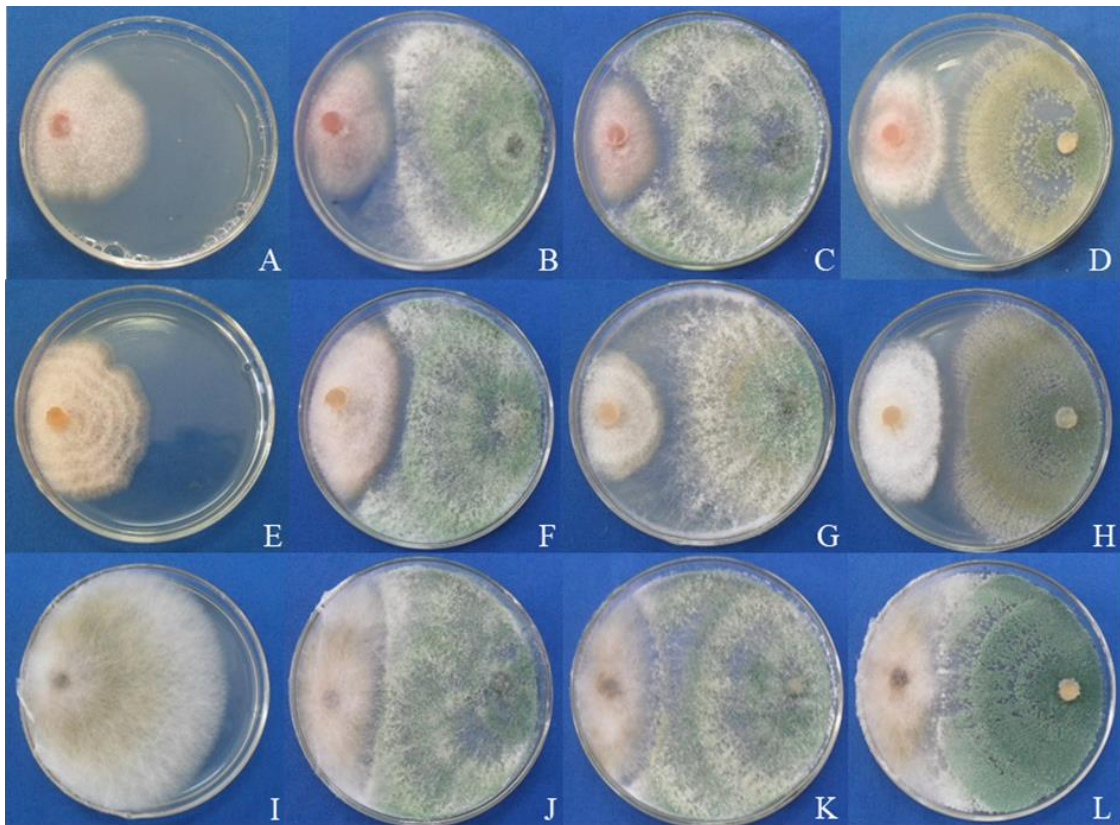
Tratamento	Crescimento micelial (mm)			% de inibição		
	F17	F18	F20	F17	F18	F20
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	34,64 Bb*	37,15 Bb	41,33 Ac	15,84 Ba	10,38 Bb	34,83 Aa
<i>Trichoderma asperellum</i> TR4	37,18 Bb	44,09 Ab	47,39 Ab	21,58 Ba	24,49 Ba	43,17 Aa
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	39,23 Ab	41,18 Ab	41,64 Ac	11,19 Ba	16,29 Ba	42,75 Aa
Testemunha	50,67 Ba	53,41 Ba	77,41 Aa	-	-	-
CV (%)	8,12			18,03		

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade de erro, pelo Teste de Skott-Knott. Onde: CV (%) = Coeficiente de variação.

Trichoderma asperellum reduziu o crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp., havendo interação entre esses fatores. A inibição do crescimento micelial variou de 10,38% (F18xTR1) a 43,17% (F20xTR4). Os melhores resultados de inibição foram para o isolado de *F. graminearum* com inibição de 34,83%, 43,17% e 42,75%, para os isolados de TR1, TR4 e Qt de *T. asperellum* respectivamente, sendo esses valores até três vezes maiores do que foi encontrado para os demais isolados de *Fusarium* spp.

Para o percentual de inibição de crescimento micelial, *F. equiseti* e *F. oxysporum* demonstraram comportamento semelhante, não apresentando diferença estatística entre si. Também, não houve diferença na inibição do crescimento micelial entre os isolados de *T. asperellum*, para os isolados de *F. graminearum* e *F. oxysporum*. Somente para *F. equiseti* o isolado de *T. asperellum* TR1 obteve efeito menor (10,38%). Contudo, além de verificar a ação de *T. asperellum* por meio de pareamento de culturas, outras metodologias podem ser exploradas para melhorar o conhecimento de como *Trichoderma* atua no controle de *Fusarium*, entre elas a ação de metabólitos voláteis e de metabólitos não voláteis.

Figura 1 – Resultados do teste de pareamento de cultura com isolados de *Trichoderma asperellum* em confronto com *Fusarium oxysporum* (F17), *Fusarium equiseti* (F18) e *Fusarium graminearum* (F20) em meio BDA.



Onde: As letras correspondem aos diferentes tratamentos usados. A – *Fusarium oxysporum* (F17); B – *F. oxysporum* (F17) x *Trichoderma asperellum* (TR1); C – *F. oxysporum* (F17) x *T. asperellum* (TR4); D – *F. oxysporum* (F17) x *T. asperellum* (Qt); E – *Fusarium equiseti* (F18); F – *F. equiseti* (F18) x *T. asperellum* (TR1); G – *F. equiseti* (F18) x *T. asperellum* (TR4); H – *F. equiseti* (F18) x *T. asperellum* (Qt). I – *Fusarium graminearum* (F20); J – *F. graminearum* (F20) x *T. asperellum* (TR1); K – *F. graminearum* (F20) x *T. asperellum* (TR4); L – *F. graminearum* (F20) x *T. asperellum* (Qt).

4.3.2 Metabólitos voláteis

No quinto dia após a instalação do experimento de metabólitos voláteis, o isolado que apresentou menor crescimento micelial foi o isolado *Fusarium oxysporum* (55,10 mm), seguido de *Fusarium equiseti* com crescimento intermediário de 69,94 mm e *Fusarium graminearum* que teve o maior crescimento micelial preenchendo toda a superfície do meio de cultura nesse período (Tabela 4).

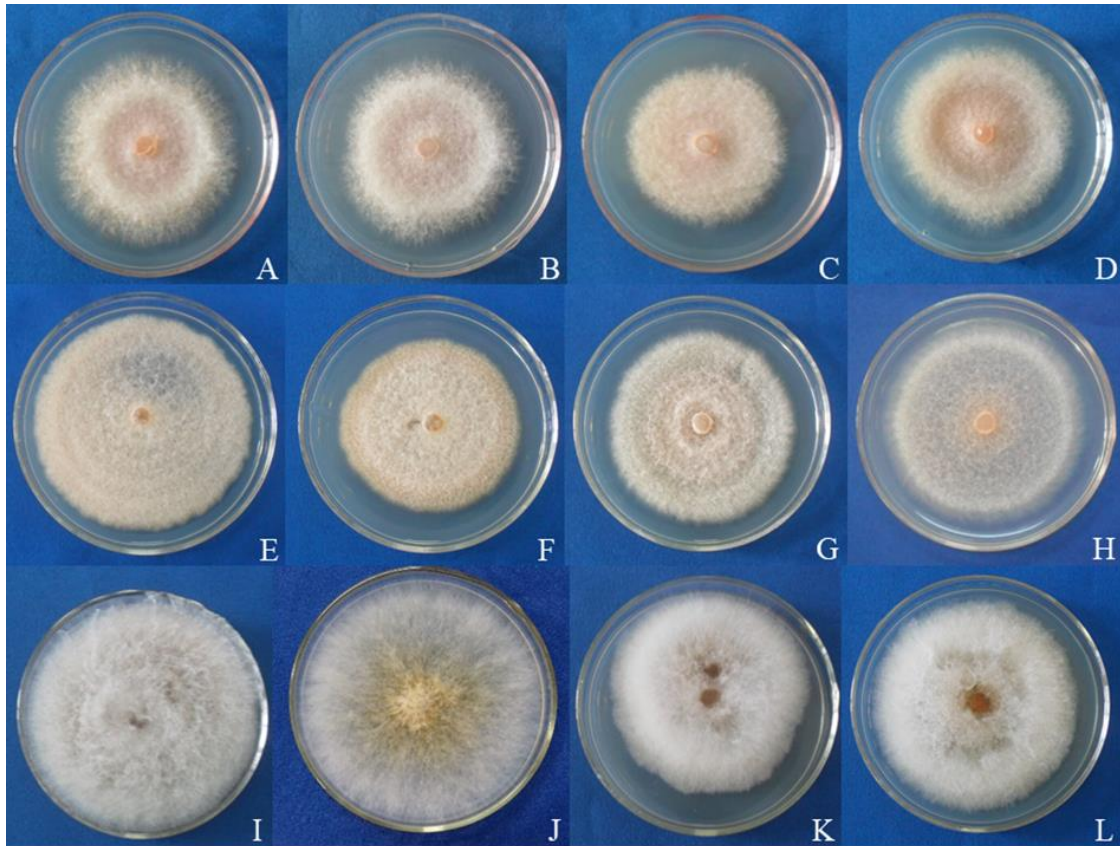
Tabela 4 - Crescimento micelial e percentual de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* (F17), *Fusarium equiseti* (F18) e *Fusarium graminearum* (F20) confrontados com isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) no teste de metabólitos voláteis.

Tratamento	Crescimento micelial (mm)			% de inibição		
	F17	F18	F20	F17	F18	F20
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	53,54 Ca*	60,73 Bc	70,17 Ab	3,26 Ab	13,16 Aa	12,29 Aa
<i>Trichoderma asperellum</i> TR4	51,26 Ba	66,55 Ab	68,37 Ab	7,05 Aa	4,69 Bb	14,54 Aa
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	55,09 Ca	66,39 Bb	65,00 Ac	1,52 Bb	5,07 Bb	18,75 Aa
Testemunha	55,10 Ca	69,94 Ba	80,00 Aa	-	-	-
CV (%)		3,07			29,35	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade de erro, pelo Teste de Skott-Knott. Onde: C.V. (%) = Coeficiente de variação.

No teste de metabólitos voláteis todos os tratamentos com *T. asperellum* inibiram o crescimento de *Fusarium* spp., havendo interação significativa entre os fatores. A maior redução do crescimento micelial do patógeno foi observado no tratamento com o isolado *F. graminearum* F20 confrontado com o isolado de *T. asperellum* codificado como Qt (18,75%), sendo que este tratamento não diferiu dos demais. Já para o isolado de *F. equiseti* F18, o tratamento TR1 apresentou maior redução (13,16%) e para *F. oxysporum*, TR4 (7,05%). Qt (foi o isolado de *T. asperellum* que menos afetou o crescimento de *Fusarium oxysporum* com 1,52% de inibição do crescimento micelial.

Figura 2 – Resultados do teste de metabólitos voláteis com isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) na inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* (F17), *Fusarium equiseti* (F18) e *Fusarium graminearum* (F20) em meio BDA.



Onde: As letras correspondem aos diferentes tratamentos usados. A – *Fusarium oxysporum* (F17); B – *F. oxysporum* (F17) x *Trichoderma asperellum* (TR1); C – *F. oxysporum* (F17) x *T. asperellum* (TR4); D – *F. oxysporum* (F17) x *T. asperellum* (Qt). E – *Fusarium equiseti* (F18); F – *F. equiseti* (F18) x *T. asperellum* (TR1); G – *F. equiseti* (F18) x *T. asperellum* (TR4); H – *F. equiseti* (F18) x *T. asperellum* (Qt); I – *Fusarium graminearum* (F20); J – *F. graminearum* (F20) x *T. asperellum* (TR1); K – *F. graminearum* (F20) x *T. asperellum* (TR4); L – *F. graminearum* (F20) x *T. asperellum* (Qt);

4.3.3 Metabólitos não voláteis

No teste de metabólitos não voláteis, os filtrados de cultura dos isolados de *Trichoderma asperellum* diminuíram o crescimento micelial do isolado de *Fusarium oxysporum* em relação a testemunha, havendo diferença entre os isolados de *T. asperellum* e entre as diferentes condições de desenvolvimento dos mesmos na produção de filtrados de cultura com efeito antifúngico. No geral, o tratamento 8 (pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração inóculo 10^5 esporos/mL), foi o que mais interferiu de forma negativa no desenvolvimento de *F. oxysporum* em relação as demais condições de produção dos filtrados de cultura, independente

do isolado de *T. asperellum* que foi cultivado nessa condição, ou seja, não apresentando diferença estatística entre os isolados para essa condição. Para as demais condições de crescimento, o resultado foi mais variável e mudou conforme o isolado de *T. asperellum*.

Para o isolado TR1 (*T. asperellum*), além da condição 8 que apresentou os melhores resultados, apresentando a maior percentagem de inibição do crescimento micelial, outras condições de crescimento se destacaram por não se diferenciar, caso da condição 2, 7, e nos pontos centrais 9, 10 e 11. Para o isolado TR4 (*T. asperellum*), o mesmo foi observado para as condições de cultivo 1, 2 e 3, enquanto que para o isolados Qt (*T. asperellum*), a condição de cultivo 4 foi a única que não se diferenciou da condição 8 (Tabela 5).

Os filtrados de cultura dos isolados de *T. asperellum* diminuíram o crescimento micelial do isolado de *Fusarium equiseti* em relação a testemunha, havendo diferença entre os isolados de *T. asperellum* e entre as condições de desenvolvimento dos mesmos para a produção de filtrados de cultura com efeito antifúngico. O tratamento 8 (pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração inóculo 10^5 esporos/mL), foi o que mais interferiu de forma negativa no desenvolvimento de *F. equiseti* em relação aos demais, independente do isolado de *T. asperellum* que foi cultivado nessa condição, repetindo o resultado observado para *F. oxysporum*. Para as demais condições, como já visto para *F. oxysporum*, a inibição do crescimento foi mais variável e mudou conforme o isolado de *T. asperellum*.

Para o isolado TR1 (*T. asperellum*), o filtrado de cultura gerado a partir da condição 8 de cultivo, foi a que mais reduziu o crescimento micelial do isolado de *F. equiseti*, diferenciando-se dos demais tratamentos. Em contrapartida, para os isolados TR4 e Qt, outras condições de crescimento se destacaram por não se diferenciar do tratamento 8, caso da condição 9, 10 e 11, para os filtrados de culturas obtidos do isolado TR4 e as condições 3, 9, 10 e 11 para o isolado Qt (*T. asperellum*) (Tabela 6).

Tabela 5 - Efeito dos filtrados de cultura de diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) no crescimento micelial (mm) e na percentagem de inibição do crescimento micelial (%) de *Fusarium oxysporum* (F17).

Trat	pH	Agitação (rpm)	Sacarose (g/L)	Esporos []	Crescimento micelial (mm)			Inibição (%)		
					TR1	TR4	Qt	TR1	TR4	Qt
1	7	100	50	10 ⁷	61,92 Ab*	55,52 Bd	55,59 Bb	20,68 Bb	28,87 Aa	28,79 Ab
2	7	180	50	10 ⁵	56,59 Bb	56,19 Bd	73,30 Aa	27,50 Aa	28,02 Aa	6,10 Bd
3	7	180	100	10 ⁵	60,34 Cb	66,39 Bb	75,43 Aa	22,70 Ab	14,95 Bc	3,36 Cd
4	5	180	100	10 ⁷	80,00 Aa	62,41 Bc	52,30 Cc	0,00 Cc	20,05 Bb	33,00 Aa
5	7	100	100	10 ⁷	80,00 Aa	68,80 Bb	61,35 Cb	0,00 Cc	11,86 Bc	21,41 Ac
6	5	180	50	10 ⁷	58,46 Cb	68,89 Ab	63,62 Bb	25,11 Ab	11,75 Cc	18,49 Bc
7	5	100	100	10 ⁵	53,92 Bc	77,71 Aa	74,59 Aa	30,92 Aa	0,48 Bd	4,44 Bd
8	5	100	50	10 ⁵	49,36 Bc	51,96 Ad	48,20 Bc	36,77 Aa	33,43 Aa	38,25 Aa
9	6	140	75	10 ⁶	54,12 Bc	80,00 Aa	60,49 Bb	30,67 Aa	0,00 Cd	22,51 Bc
10	6	140	75	10 ⁶	52,89 Bc	78,86 Aa	60,87 Bb	32,24 Aa	0,00 Cd	22,13 Bc
11	6	140	75	10 ⁶	54,46 Bc	75,39 Aa	59,44 Bb	30,33 Aa	3,42 Cd	23,85 Bc
Testemunha					78,06 Aa	78,06 Aa	78,06 Aa		-	
CV (%)						13,56			5,96	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

*[]: Concentração de esporo

Tabela 6 - Efeito dos filtrados de cultura de diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) no crescimento micelial (mm) e na percentagem de inibição do crescimento micelial (%) de *Fusarium equiseti* (F18).

Trat	pH	Agitação (rpm)	Sacarose (g/L)	Esporos []	Crescimento micelial (mm)			Inibição (%)		
					TR1	TR4	Qt	TR1	TR4	Qt
1	7	100	50	10 ⁷	62,18 Bc*	67,98 Ba	76,69 Aa	20,27 Ab	12,84 Ab	1,67 Bc
2	7	180	50	10 ⁵	68,84 Bb	69,48 Ba	78,55 Aa	11,73 Ac	10,91 Ab	0,00 Bc
3	7	180	100	10 ⁵	63,06 Bc	68,82 Aa	63,26 Bc	19,15 Ab	11,76 Bb	18,89 Aa
4	5	180	100	10 ⁷	78,37 Aa	67,17 Ba	66,38 Bb	0,00 Bd	13,88 Ab	14,89 Ab
5	7	100	100	10 ⁷	73,34 Bb	64,79 Ca	80,00 Aa	5,96 Bc	16,93 Ab	0,00 Bc
6	5	180	50	10 ⁷	70,79 Bb	71,62 Ba	80,00 Aa	9,23 Ac	8,17 Bb	0,00 Bc
7	5	100	100	10 ⁵	64,97 Bc	73,03 Aa	69,07 Ab	16,70 Ab	6,36 Bb	11,44 Bb
8	5	100	50	10 ⁵	50,01 Cd	55,21 Bb	61,72 Ac	35,88 Aa	29,21 Ba	20,84 Ca
9	6	140	75	10 ⁶	71,33 Ab	56,41 Bb	59,12 Bc	7,19 Bc	24,19 Aa	24,19 Aa
10	6	140	75	10 ⁶	71,92 Ab	60,98 Bb	58,63 Bc	7,78 Bc	28,76 Aa	23,70 Aa
11	6	140	75	10 ⁶	69,84 Ab	58,23 Bb	60,91 Bc	10,45 Bc	25,34 Aa	21,90 Aa
Testemunha					77,99 Aa	77,99 Aa	77,99 Aa	-		
CV (%)					5,83			24,31		

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

*[]: Concentração de esporos

Para o isolado de *Fusarium graminearum* os filtrados de cultura obtidos dos diferentes isolados de *T. asperellum* sob diferentes condições de cultivo, também diminuíram o crescimento micelial do mesmo em relação a testemunha, havendo diferença entre os isolados de *T. asperellum* e entre as condições de desenvolvimento dos mesmos. O tratamento 8 (pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração inóculo 10^5 esporos/mL), novamente se destacou, e interferiu de forma negativa no desenvolvimento de *F. graminearum*, independente do isolado de *T. asperellum* que foi cultivado nessa condição. Para as demais condições, como já visto para os demais isolados de *Fusarium* spp., a inibição do crescimento foi mais variável e mudou conforme o isolado de *T. asperellum*.

Para TR1 (*T. asperellum*), em adição a condição de cultivo 8, que foi a condição de crescimento em que *T. asperellum* produziu o filtrado que mais interferiu no crescimento micelial de *F. graminearum*, outros tratamentos também se destacaram, não diferenciando estatisticamente do tratamento 8, caso do tratamento 1 e 3, para TR4 (*T. asperellum*) isso ocorreu com o tratamento 3 e para Qt (*T. asperellum*) com os tratamentos 1 e 6 (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito dos filtrados de cultura de diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) no crescimento micelial (mm) e na percentagem de inibição do crescimento micelial (%) de *Fusarium graminearum* (F20).

Trat	pH	Agitação (rpm)	Sacarose (g/L)	Esporos []	Crescimento micelial (mm)			Inibição (%)		
					TR1	TR4	Qt	TR1	TR4	Qt
1	7	100	50	10 ⁷	60,12 Bb*	79,24 Aa	46,98 Cc	24,85 Ba	0,95 Cc	41,27 Aa
2	7	180	50	10 ⁵	74,01 Aa	80,00 Aa	77,61 Aa	7,49 Ab	0,00 Ac	2,99 Ac
3	7	180	100	10 ⁵	57,85 Bb	64,83 Bb	78,76 Aa	27,68 Aa	18,96 Ba	1,55 Cc
4	5	180	100	10 ⁷	80,00 Aa	80,00 Aa	80,00 Aa	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac
5	7	100	100	10 ⁷	73,36 Aa	80,00 Aa	63,23 Bb	8,29 Bb	0,00 Bc	20,96 Ab
6	5	180	50	10 ⁷	74,12 Aa	75,00 Aa	65,43 Bb	7,35 Bb	6,25 Bb	18,21 Ab
7	5	100	100	10 ⁵	80,00 Aa	80,00 Aa	78,02 Aa	0,00 Ac	0,00 Ac	2,47 Ac
8	5	100	50	10 ⁵	56,85 Bb	62,92 Ab	51,13 Bc	26,44 Ba	21,35 Ba	36,06 Aa
9	6	140	75	10 ⁶	77,07 Aa	76,04 Aa	65,19 Bb	3,66 Bb	4,95 Bb	18,51 Ab
10	6	140	75	10 ⁶	73,88 Aa	75,66 Aa	64,27 Bb	7,65 Bb	5,42 Bb	19,66 Ab
11	6	140	75	10 ⁶	75,72 Aa	74,91 Aa	61,82 Bb	5,35 Bb	6,36 Bb	22,72 Ab
Testemunha					80,00 Aa	80,00 Aa	80,00 Aa	-		
CV (%)					9,36			21,38		

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

*[]: Concentração de esporos

4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo são analisados diferentes mecanismos de controle com que três isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1, TR4 e Qt) podem agir sobre fungos do gênero *Fusarium*, causadores de podridão de raízes em noqueira-pecã, e para tanto utilizou-se de diferentes testes. O primeiro teste foi o pareamento de culturas, nesse experimento a inibição do crescimento micelial de *Fusarium* spp. variou de 10,38% (F18xTR1) a 43,17% (F20xTR4), pois em geral os isolados de *T. asperellum* apresentam crescimento micelial mais rápido e desse modo conseguem inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos, como observado na presente pesquisa. Esse fato pode ser explicado devido a *Trichoderma* utilizar diferentes mecanismos para sua sobrevivência e proliferação, entre eles a competição, que compreende a rápida degradação e uso de carboidratos complexos, assim *Trichoderma* coloniza rapidamente os habitats onde se encontra, impedindo a colonização e sobrevivência de fungos fitopatogênicos (HARMAN et al., 2004).

A redução do crescimento micelial de *Fusarium* spp. por *Trichoderma* no teste de pareamento de culturas foi relatada por alguns autores. Das; Haridas e Sabu (2019) trabalhando com *T. harzianum* no controle de *Fusarium oxysporum* causador da podridão mole do gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.), encontraram valores de até 78,3% de inibição do crescimento micelial, valores superiores aos encontrados na presente pesquisa. Por outro lado, Silva et al. (2019) estudando a inibição do crescimento micelial de *Fusarium subglutinans*, isolado de sementes de *Pinus* spp. por *Trichoderma* spp. encontraram valores de inibição do crescimento micelial menores, variando de 11,5 a 38,4%.

No teste de pareamento de culturas, além da competição, outros mecanismos de controle estão atuando, entre eles o parasitismo. Nesse mecanismo de controle, *Trichoderma* parasita de forma direta as estruturas do fitopatógeno, por penetração e colonização das hifas (MEDEIROS et al., 2018). Também, a ação de enzimas hidrolíticas e de metabólitos secundários atuam no controle do patógeno, dessa forma, a ação sinérgica do enrolamento de hifas, a produção de antibiótico e de enzimas (antibiose), ao mesmo tempo explica a eficiência do controle de fitopatógenos por fungos do gênero *Trichoderma* (VINALE et al., 2014). Porém, o teste de pareamento de culturas não consegue elucidar a importância da antibiose no controle de *Fusarium* spp. *in vitro*, por isso é necessário a realização de outros testes, entre eles metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis.

A inibição por metabólitos voláteis foi menor do que a inibição obtida no teste de pareamento de culturas, mostrando que os isolados de *T. asperellum* apresentam variação no controle dos fitopatógenos, nos diferentes mecanismos de ação associados a cada um dos testes, como já observado no trabalho realizado por Isaias et al. (2014). O mecanismo de ação ao qual se pode atribuir à diminuição do crescimento micelial dos patógenos, causado pelos metabólitos voláteis e filtrados de cultura (descrito a seguir), é a antibiose. A antibiose é resultado da ação dos metabólitos voláteis e/ou não-voláteis produzidos por *Trichoderma* no processo de controle do patógeno, que inibem ou impedem o desenvolvimento desses microrganismos.

Nesse sentido, os filtrados de cultura obtidos dos diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* em diferentes condições de crescimento, inibiram o crescimento micelial das diferentes espécies de *Fusarium* spp. destacando-se a condição 8 (pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração inóculo 10^5 esporos/mL), que se adaptou bem a todos os isolados de *T. asperellum*, que nessa condição de crescimento geraram metabólitos que inibiram o crescimento micelial de *Fusarium in vitro*. O filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. foi descrito como eficiente na diminuição do crescimento micelial de *Fusarium* em outros trabalhos, como no realizado por Cong et al. (2019). Nesse trabalho, os autores testaram o filtrado de cultura de *Trichoderma pseudokoningii* cultivado em fermentação submersa, no controle de *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum*, causador de murcha em pepineiro, e observaram valores de até 51,52% na redução do crescimento micelial do fitopatógeno.

Louzada et al. (2016) avaliando a ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, por diferentes métodos, como pareamento de culturas, metabólitos voláteis, metabólitos não termo-lábeis (filtrados de cultura) observaram que os melhores resultados de cada teste permitiram somente 16,5%, 9,5% e 0,3% do crescimento micelial do patógeno, nessa ordem, demonstrando a eficiência dos filtrados de cultura no controle de *S. sclerotiorum*. Contudo, no processo de fermentação alguns parâmetros, como o tempo e condições do meio influenciam a produção de metabólitos secundários (PFEFFERLE et al., 2000), e segundo Specian et al. (2014), a otimização das condições de cultivo do antagonista levam a produção de compostos mais eficazes e devem fazer parte do programa de controle biológico.

Entre as variáveis utilizadas para a otimização do cultivo de *T. asperellum* para a produção dos filtrados de cultura está a agitação, outros autores comentam sobre a importância da agitação do meio de cultivo na produção de compostos secundários, como é o caso de Soares e Maringoni (2018). Em seu trabalho, os autores comentam que a agitação do meio causou diferenciação na coloração do produto gerado, provavelmente devido a produção de substâncias e pigmentos, e por outro lado, quando o meio não foi agitado ocorreu a produção de uma camada

micelial branca na superfície dos tratamentos. Além da agitação o pH também interfere na produção de compostos antifúngicos, em outros estudos como o realizado por Cripps-Guazzone et al. (2016), foi possível observar que, independente do pH, ocorreu a produção de metabólitos com atividade antifúngica, como ocorreu no presente estudo. Segundo Cripps-Guazzone et al. (2016), em diferentes pHs são produzidos diferentes compostos ou enzimas por *Trichoderma*, como por exemplo, para a protease do tipo tripsina o pH entre 6,0-7,0 seria o ideal, já para a celobiohidrolase e N-acetilglicosaminidase, 3,0 para a β -xilosidase, 6,0 e para a β -glucosidase o valor ótimo de pH para a produção é de 5,0.

Segundo Vinale et al. (2009), a utilização de metabólitos de *Trichoderma* obtidos por cultivo massal de fungos antagonistas pode tornar possível a obtenção de novos biofertilizantes e biopesticidas baseados nesses compostos, beneficiando o manejo de doenças em plantas. Nesse sentido, nos filtrados de cultura de *Trichoderma* spp., existem muitos compostos antimicrobianos que suprimem ou reduzem o crescimento ou a proliferação de fungos fitopatogênicos. Dentre esses compostos estão as enzimas degradadoras de parede celular, antibióticos e compostos voláteis (GHORBANPOUR et al., 2018; MUHAMMAD ADNAN et al., 2019). No presente estudo, foi evidenciada a eficácia da ação desses compostos na redução do crescimento micelial de *Fusarium* spp.

No presente estudo também foi possível verificar que os isolados de *T. asperellum* utilizam de diferentes mecanismos de ação para o controle de *Fusarium* spp. *in vitro*. Nessa mesma perspectiva, Solino et al. (2017) afirma que microrganismos que possuem a característica de apresentar diferentes modos de ação, por exemplo, além de parasitar estruturas de fitopatógenos produzem metabólitos de efeito fungistático ou fungicida, somam nos programas de biocontrole e podem apresentar um controle biológico *in vivo* com maior eficiência.

4.5 CONCLUSÃO

Os isolados de *Trichoderma asperellum*, apresentaram atividade antifúngica frente aos isolados de *Fusarium* spp. *in vitro*, apresentando ação por diferentes mecanismos constatada por meio do pareamento de culturas e pelas técnicas de metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis. Para a produção de metabólitos não voláteis com ação antifúngica, a melhor condição de cultivo submerso foi com Água de Maceração de Milho (AMM) 20 g/L, 7,5 g/L extrato de levedura, pH5, agitação de 100 rpm, sacarose 50g/L e concentração inicial de esporos de *T.*

asperellum de 10^5 . O uso de *Trichoderma asperellum* no controle biológico *in vitro* de espécies fitopatogênicas do gênero *Fusarium* spp. mostrou potencial para avanços no controle *in vivo* da podridão de raízes de noqueira-pecã.

4.6 REFERÊNCIAS

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71–79, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150>>. Acesso em: 25 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.

BOUBAKRI, H.; et al. Biocontrol potential of chenodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens. **New Zealand Journal Crop Horticulture Science**, v. 4 p. 261-274, 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01140671.2015.1049620>> <https://doi.org/10.1080/01140671.2015.1049620>.

CHEN, X.; et al. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. **Postharvest Biological Technology**, v. 115, p.113–121, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521415302039>>. Acesso em: 12 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>.

CONG Y.; et al. Mixed culture fermentation between *Rhizopus nigricans* and *Trichoderma pseudokoningii* to control cucumber *Fusarium* wilt. **Crop Protection**, v. 124, 104857, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104857>. Acesso em: 14 jul. 2020

CRIPPS-GUAZZONE, N.; et al. Rhizosphere and endophytic colonisation of ryegrass and sweet corn roots by the isolate *Trichoderma atroviride* LU132 at different soil pHs. **New Zealand Plant Protection**, v. 69, p. 78-85, 2016.

DAS, M. M.; HARIDAS, M.; SABU A. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 17, p. 177-183, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818118304742>>. Acesso em: 4 nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.021>.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, Manchester, v. 57, n. 1, p. 363-369, 1971. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0007153671800773>>. Acesso em: 17 jul. 2019. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3).

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542011000600001&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 17 jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.

GHORBANPOUR, M.; et al. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. **Biological Control**, v. 117 p. 147–157, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>. Acesso em: 14 Nov. 2020

HARMAN, G.E.; et al. M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews/Microbiology**, London, v. 2, n.1, p. 43-56, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro797> Acesso em: 18 dez. 2020.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de recuperação automática (SIDRA): Banco de dados agregados. Sistema produção da extração vegetal e da Silvicultura. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pnadcm>. Acesso em: 18 dez. 2020.

ISAIAS, C. O.; et al. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.1, p. 34-41, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052014000100005>>. Acesso em: 4 Nov. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052014000100005>.

JEGATHAMBIGAI, V.; et al. Effect of *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*, the causative agent of Collar Rot on *Zamioculcas zamiifolia* and an on farm method to mass produce *Trichoderma* species. **Plant Pathology Journal**, v.9, n. 2, p. 47-55, 2010. Disponível em: Doi 10.3923/ppj.2010.47.55. Acesso em: 4 Nov. 2020.

JUNGES, E.; et al. A. Bioproducts from *Trichoderma harzianum* as inducer of resistance to anthracnose in beans. In: Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos, 2018.

LAZAROTTO, M.; et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecã tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4 p. Disponível em: <9390-9402, 2014. 10.4238/2014.November.11.5>. Acesso em: 4 Nov. 2020.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul**. 2013. 156f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

LOUZADA, A. de S. et al. Relações entre testes com metabólitos e seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.14, n.1, p.9-14, jan./mar., 2016. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3191>>. Acesso em: 4 Nov. 2019.

MACHADO A. R.; PINHO D. B.; PEREIRA O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the *Botryosphaeriaceae* associated with collar and root rot of the biofuelplant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 231–247. 2014. Disponível em: <10.1007/s13225-013-0274-1>. Acesso em: 4 Nov. 2020.

MUHAMMAD ADNAN, W.I.; et al. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, p. 7–18, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042>>. Acesso em: 4 Nov. 2020.

- PFEFFERLE, C. et al. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 135-142, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165600002492?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 nov. 2019.
- ROMEIRO, R. da S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas- Fundamentos**. 1 ed. Viçosa: Ed. UFV., 2007, 269 p.
- SILVA, T. W. R. et al. Pine Seeds Treatment with *Trichoderma* for *Fusarium* Control. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2179-80872019000200149&script=sci_arttext>. Acesso em: 26 out. 2019.
- SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C. Effectiveness of *Fusarium* spp. in controlling bacterial wilt in beans. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 79-82, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/168402>>. Acesso em: 20 out. 2019.
- SOLINO, A. J. da S. et al. Antagonistic potential and *in vitro* control of *Alternaria solani* by saprobic fungi. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 3, p. 199-204, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2202>>. Acesso em: 2 nov. 2019.
- SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v.16, n.4, p.345-351, 2014. Disponível em: <<http://www.pgsskroton.com.br/seer/index.php/JHealthSci/article/view/393/370>>. Acesso em: 3 out. 2019.
- SUMMERELL, B.A. et al. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, v.44, p.3, 2010.
- VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n.6, p. 80–86, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmp.2008.05.005>>. Acesso em: 4 Nov. 2020.
- VINALE, F.; et al. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, New Jersey, v. 48, p. 705-711, 2009.
- WELLS, L. Pecan. America's Native Nut tree. University of Alabama Press. 2017. 264 p.

5 CAPÍTULO III – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Trichoderma asperellum* E AÇÃO SOBRE *Fusarium graminearum*

Fungos do gênero *Trichoderma* produzem metabólitos secundários, como os compostos orgânicos voláteis (COVs) que podem atuar promovendo o crescimento de plantas, na indução de resistência ou agir diretamente no patógeno, reduzindo a incidência e a severidade de doenças. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a ação antagonista dos metabólitos voláteis liberados por três isolados de *Trichoderma asperellum* contra um isolado de *Fusarium graminearum*, além de identificar os compostos que fazem parte dos metabólitos dos fungos cultivados isoladamente ou em confronto. O antagonismo foi estimado com base na porcentagem de inibição do crescimento micelial pelo método de metabólitos voláteis. A extração e identificação de COVs foram realizadas por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, de COVs emitidos por antagonistas e patógenos sozinhos ou confrontados. COVs produzidos por todos os isolados de *T. asperellum* inibiram o crescimento micelial do patógeno em uma faixa de 11,18 a 14,84%. O principal grupo de COVs observados em *F. graminearum*, foram os sesquiterpenos com destaque para os compostos ligados com a patogenicidade e as mictotoxinas. *T. asperellum* liberou compostos conhecidos por sua ação antifúngica e indutor de crescimento de plantas com destaque para o composto 6PAP (2H-Pyran-2-one, 6-pentyl), com abundância relativa de 60,18, 62,86 e 66,84%, para TR1, TR4 e Qt, respectivamente. Além do 6PAP foram encontrados sesquiterpenos, diterpenos, terpenóides e compostos de oito carbonos. Quando os metabólitos de *T. asperellum* foram confrontados com *F. graminearum*, percebeu-se uma diminuição de compostos importantes na patogenicidade e na toxicidade de *F. graminearum*, como o longiborneol, trichodiene e longifolene. Os metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma asperellum* inibiram o crescimento micelial e a formação de compostos voláteis de *Fusarium graminearum*, com destaque aos relacionados com a toxicidade e a patogenicidade do mesmo.

Palavras-chave: *Carya illionensis*. Cromatografia gasosa. Espectrometria de massa.

IDENTIFICATION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS OF *Trichoderma asperellum* AND ACTION ON *Fusarium graminearum*

Fungi of the genus *Trichoderma* produce secondary metabolites, such as volatile organic compounds (VOCs) that can act to promote plant growth, induce resistance or act directly on the pathogen, reducing the incidence and severity of diseases. The objective of this research was to evaluate the antagonistic action of volatile metabolites released by three isolates of *Trichoderma asperellum* against one isolate of *Fusarium graminearum*, in addition to identifying the compounds that are part of the metabolites of fungi grown alone or in confrontation. Antagonism was estimated based on the percentage of mycelial growth inhibition by the volatile metabolite method. The extraction and identification of VOCs were performed by gas chromatography and mass spectrometry, of VOCs emitted by antagonists and pathogens alone or confronted. VOCs produced by all *T. asperellum* isolates inhibited the mycelial growth of the pathogen in a range of 11,18 to 14,84%. The main group of VOCs observed in *F. graminearum*, were sesquiterpenes, with emphasis on compounds linked with pathogenicity and mictotoxins. *T. asperellum* released compounds known for their antifungal and plant growth inducing action, especially the compound 6PAP (2H-Pyran-2-one, 6-pentyl), with a relative abundance of 60,18, 62,86 and 66,84%, for TR1, TR4 and Qt, respectively. In addition to 6PAP, sesquiterpenes, diterpenes, terpenoids and eight carbon compounds were found. When *T. asperellum* metabolites were confronted with *F. graminearum*, a decrease in compounds important in the pathogenicity and toxicity of *F. graminearum* was noted, such as longiborneol,

trichodiene and longifolene. The volatile metabolites of *Trichoderma asperellum* isolates inhibited mycelial growth and the formation of volatile compounds of *Fusarium graminearum*, with emphasis on those related to its toxicity and pathogenicity.

Keywords: *Carya illinoensis*. Gas chromatography. Mass spectrometry.

5.1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos pela ação antagônica contra patógenos fúngicos, como também por interferirem diretamente no metabolismo da planta, diminuindo a incidência de doenças, bem como aumentando o crescimento e desenvolvimento da mesma (ADNAN et al., 2019). A ação de *Trichoderma* sobre patógenos pode ocorrer por diferentes mecanismos, sendo eles micoparasitismo, predação, indução de resistência e crescimento, competição e antibiose.

Muitos desses mecanismos são diretamente influenciados pela produção de metabólitos secundários por *Trichoderma* spp.. Segundo Vinale et al (2009), os metabólitos secundários são formados por diferentes classes de compostos naturais com baixo peso molecular, normalmente específicos para gêneros, espécies ou isolados. Nesse sentido, fungos do gênero *Trichoderma* spp. liberam compostos que agem diretamente no crescimento ou na fisiologia do patógeno (MUKHERJEE et al., 2012), além de que os metabólitos liberados por *Trichoderma* spp. podem atuar promovendo o crescimento de plantas ou induzindo mecanismos de defesa nas mesmas (VINALE & SIVASITHAMPARAM). Entre os metabólitos liberados por *Trichoderma* spp. estão os compostos orgânicos voláteis (COVs).

Trichoderma spp. pode produzir uma infinidade de compostos orgânicos voláteis (COVs), esses compostos são quimicamente diversos e podem ser classificados em diferentes grupos como cetonas, lactonas, ésteres, tioálcoois, tioésteres, monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois e ciclohexanos (SCHENKEL et al., 2015). Entre esses compostos destaca-se 6-Pentil- α -pirona (6PAP) (JELEŇ et al., 2014; KESWANI et al., 2014), sendo que esse composto demonstra atividade fungicida contra muitos fitopatógenos de culturas agrícolas, como *Phytophthora infestans* (ELSHARBINY et al., 2020), *Neofusicoccum parvum*, *Eutypa lata*, *Phaeoconiella chlamydospora* (MUTAWILA et al., 2016), *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* (JELEŇ et al., 2014).

Fusarium graminearum, é conhecido por afetar diferentes culturas, entre elas *Carya illinoensis* (nogueira-pecã), nessa espécie o fungo ataca plantas em viveiros, causando estrangulamento do colo, murcha e necrose foliar e podridão de raízes. A doença pode ocasionar grandes perdas de mudas em viveiros comerciais, no campo as mudas atacadas apresentam

crescimento inicial reduzido (LAZAROTTO et al., 2014). Além disso, essa espécie é conhecida devido a liberação de compostos voláteis tóxicos para plantas e animais, entre eles pode-se citar Trichodiene/beta-bazzanene, longiborneol, D-Longifolene (GIROTTI et al., 2010; MAGAN et al., 2000; PROCTOR et al., 2005). Desta forma, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a ação antagônica dos metabólitos voláteis liberados por três isolados de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium graminearum*, além de identificar os compostos que fazem parte dos metabólitos dos fungos cultivados isoladamente ou em confronto.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local de realização dos trabalhos e origem dos isolados fúngicos

O presente trabalho foi conduzido na Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina, no Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI-CICBA), na Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, e no Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas (34° 54' 46.69" S; 57° 57' 04.88" O).

Para o experimento foram utilizados três isolados de *Trichoderma asperellum* e um de *Fusarium graminearum*. Um isolado de *T. asperellum* foi obtido de suspensão de esporos de uma formulação comercial com 2×10^9 conídios por mL plaqueada para o meio BDA (codificado como Qt) e dois outros isolados foram obtidos de solo rizosférico de um pomar de plantas adultas de noqueira-pecã pela técnica de diluição seriada até 10^{-4} (codificados como TR1 e TR4). O isolado de *F. graminearum* foi coletado de raízes de plantas de noqueira-pecã com sintomas de podridão de raízes (Lazarotto et al., 2014), e estava armazenado em solução salina na micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria, codificado como "F20" (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécie e codificação dos isolados, coordenadas (GMS) do local de coleta, código de depósito do GenBank/produto e código do Sisgen

Espécie e codificação do isolado	Coordenadas (GMS) do local de coleta	Código GenBank (TEF - 1 α)/Produto	Código Sisgen
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	29°43'29"S – 53°43'0,51"O	MK982653	A32646D
<i>Trichoderma asperellum</i> TR4	29°43'29"S – 53°43'0,51"O	MN082152	A32646D
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	-	URM – 5911	-
<i>Fusarium graminearum</i> F20	28°53'54.7"S- 52°01'59.9"O	KF022238	AFD5702

5.2.2 Extração e identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs)

Para a extração e identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs), primeiramente foi utilizada a metodologia de metabólitos voláteis, proposta por Dennis & Webster, (1971), com adaptações. Nesta metodologia duas bases de placas de Petri de 90 mm contendo aproximadamente 20 mL de meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) receberam, individualmente, discos (6 mm de diâmetro) das culturas do patógeno e de cada um dos isolados de *T. asperellum*, estes discos foram retirados de colônias previamente cultivadas em meio BDA, por sete dias em BOD (25±2 °C com fotoperíodo de 12 h). Os discos foram dispostos no centro das placas, em seguida as mesmas foram unidas lateralmente com Parafilm. Como testemunha, foram sobrepostas duas bases, uma contendo o patógeno e a outra somente meio de cultura BDA. As placas utilizadas no experimento foram incubadas a 25±2 °C com fotoperíodo de 12 h.

A avaliação da inibição do crescimento micelial foi realizada no sexto dia após a instalação do experimento. Os tratamentos foram avaliados pela determinação do diâmetro das colônias em dois eixos, comparando o crescimento radial de cada tratamento com a testemunha, calculando a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), determinada pela fórmula: $I (\%) = [(CT - Ct) / CT] \times 100$, onde: I= percentagem de inibição; CT= crescimento final da testemunha; Ct= crescimento do fungo no tratamento (DENNIS & WEBSTER, 1971).

Após a avaliação da inibição do crescimento micelial foi realizada a coleta dos COVs, para tanto, além dos tratamentos de metabólitos voláteis, também foram montados tratamentos somente com os isolados de *T. asperellum* (TR1, TR4 e Qt), para posterior comparação. A coleta dos COVs foi por micro-extração em fase sólida de headspace (HSSPME) por 30 min utilizando uma fibra de polidimetilsiloxano/ divinilbenzeno com espessura de filme de 65 μ m

(PDMS / DVB) (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett Packard 6890 com coluna capilar DB-5 apolar (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 μm espessura) (J&W, Folsom, CA, EUA).

A temperatura do injetor foi mantida em 250 °C, e o forno foi programado a 40 °C por 2 min, aquecido 10 °C/min até atingir 200 °C, aquecido 15 °C/min até 250 °C, com tempo de espera de 5 min na temperatura final. O detector de ionização de chama (FID) foi fixado em 280 °C. A análise por cromatografia gasosa de massa (GC-MS) foi realizada em um detector seletivo de massa HP 5975C VL Agilent, acoplado ao cromatógrafo gasoso.

O detector seletivo de massa foi configurado no modo de impacto de elétrons a 70 eV e operado em SCAN com faixa de massa de 35 a 650 amu (unidade de massa atômica), com linha de transferência a 320 °C, a ionização câmara a 230 °C e o quadrupolo ajustado a 150 °C. A identificação dos COVs foi realizada pela interpretação da fragmentação espectral de massa; comparando-os aos dados das bibliotecas da Microsoft (NIST 05 Biblioteca Espectral de Massa, Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia; Adams 2007), bem como com espectros e índice de retenção de Kovats (IK) (KOVATS 1965), sendo os valores relatados anteriormente por Stoppacher et al. (2010). Os valores de IK foram calculados após análise de C8-C20 e série C21-C40 n-alcano (Fluka, Suíça) sob as mesmas condições cromatográficas. As medidas de quantificação de COVs foram determinadas calculando a área sob a curva cromatográfica.

Para o teste de metabólitos voláteis o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em análise fatorial (três isolados de *T. asperellum* e ausência de *T. asperellum* no controle de *F. graminearum*) com quatro repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri. Para a inibição do crescimento micelial o tratamento testemunha (somente o patógeno) não foi considerado, sendo os dados utilizados somente na fórmula da percentagem de inibição do crescimento micelial. O teste foi realizado em triplicata.

Após a obtenção dos dados verificou-se se os mesmos apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, no Programa BioEstat 5.0. Os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{x+0,5}$. A comparação das médias foi pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com o software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Metabólitos voláteis

O tratamento testemunha foi o que apresentou o maior crescimento micelial, com colônias ocupando toda a superfície do meio para algumas repetições, por outro lado, todos os outros tratamentos em que havia o enfrentamento com *Trichoderma asperellum* apresentaram menor crescimento micelial, diferindo estatisticamente da testemunha (tabela 2). Quanto ao percentual de inibição do crescimento micelial, não houve diferença estatística entre os tratamentos com *T. asperellum* com valores de 11,18, 13,69 e 14,84%, para os isolados TR1, TR4 e Qt, respectivamente.

Tabela 2 - Crescimento micelial e percentagem de inibição *in vitro* de *Fusarium graminearum*, crescidos na presença de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma asperellum* (25 ± 2 °C – fotoperíodo de 12 h).

Tratamento	Crescimento micelial (mm)	% de inibição
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	67,61 b*	11,18 a
<i>Trichoderma asperellum</i> TR4	68,52 b	13,69 a
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	70,51 b	14,84 a
Testemunha	79,39 a	-
CV (%)	3,02	10,97

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

5.3.2 Identificação de compostos orgânicos voláteis de *Fusarium graminearum* e de *Trichoderma asperellum*

Com base na análise de CG/SM dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Fusarium graminearum*, foram identificados 42 compostos, pertencentes aos grupos químicos: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, aromáticos, terpenos, sesquiterpenos e outros. Os sesquiterpenos são estruturas complexas e, isso também se aplica a fungos que possuem sesquiterpenos presentes em seus COVs, além disso na classe dos sesquiterpenos encontram-se as micotoxinas e compostos envolvidos na patogenicidade de *Fusarium* spp. (GIROTTI et al., 2010; MAGAN et al., 2000; PROCTOR et al., 2005). Entre os sesquiterpenos identificados nos COVs de *F. graminearum*, estão: Trichodiene/beta-bazzanene, longiborneol, D-Longifolene, Barbatene, (E)- β -farnesene, 10-epi- β -acoradiene, β -chamigrene, Longicyclene, beta-Elementene/Helifolenol B, Germacrene D (tabela 3).

Tabela 3 - Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Fusarium graminearum* identificados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (HS-GC-MS).

Pico	IK	Compostos identificados	Abundância relativa (%)
			<i>Fusarium graminearum</i>
1	872	m-Xylene	0,78±0,78
2	906	Oxime-, methoxy-phenyl-	0,34±0,42
3	972	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	0,14±0,02
4	988	3-Octanone	0,21±0,19
5	993	beta-Myrcene	0,41±0,12
6	1033	Limonene	0,65±0,45
7	1079	Mesitol	0,11±0,04
8	1093	Terpinolene	0,95±0,39
9	1205	6-Methyl-3,5-heptadien-2-one	1,03±0,30
10	1272	3,5-Dimethoxytoluene	0,15±0,06
11	1361	alpha-Cubebene /beta- Patchoulene	1,80±0,59
12	1366	alpha-Longipinene	1,21±0,18
13	1385	alpha-Ylangene	0,57±0,02
14	1389	Longicyclene	0,90±0,25
15	1402	beta-Cubebene	1,53±0,68
16	1418	Sesquiterpene mixture	5,12±0,64
17	1427	D-Longifolene	26,41±5,33
18	1431	beta-Barbatene	2,48±0,51
19	1435	Não identificado	7,90±1,49
20	1446	Germacrene D	2,76±0,05
21	1454	Elixene	1,22±0,28
22	1462	beta-Farnesene	1,00±1,42
23	1465	Não identificado	1,19±0,02
25	1469	alpha-Himachalene	1,30±0,25
26	1475	Não identificado	0,36±0,51
27	1482	Não identificado	0,24±0,34
28	1485	Acoradiene<10-epi-beta>	2,72±2,68
29	1487	Amorpha-4,11-diene	1,95±2,75
30	1491	beta-Chamigrene	3,13±0,24
31	1494	alpha-Muurolene	0,71±0,05
32	1498	gamma-Muurolene	1,44±0,26
33	1511	Não identificado	0,19±0,03
34	1514	Não identificado	0,34±0,07
35	1521	beta-Elemene/Helifolenol B	3,61±1,02
36	1528	gamma-Bisabolene	0,24±0,14
37	1543	Trichodiene/beta-bazzanene	16,09±1,47
38	1553	alpha- cedrene + não identificado	0,73±0,00
39	1615	Longiborneol	6,88±0,73
40	1696	Longifolenaldehyde	0,25±0,08

41	1848	3-Isopropyl-6,7-dimethyltricyclo	0,47±0,47
42	1858	Corymbolone	0,41±0,45
Total identificado			99,92%

Onde: IK – Índice de Kovats.

Com a comparação dos índices de retenção de Kovats foram identificados aproximadamente 30 Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) liberados pelos isolados de *Trichoderma asperellum* (Tabela 4) pertencentes aos grupos químicos: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, aromáticos, terpenos, sesquiterpenos e outros. Vários compostos são conhecidos por suas atividades antifúngicas e de promoção do crescimento das plantas, alguns deles foram encontrados na presente pesquisa. Percebe-se um perfil semelhante dos COVs dos diferentes isolados.

O composto mais importante e em maior quantidade encontrado nas amostras dos três isolados de *T. asperellum* foi o 6PAP (2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-), com abundância relativa de 60,18, 62,86 e 66,84%, para TR1, TR4 e Qt, respectivamente. Foram encontrados outros sesquiterpenos considerados compostos importantes que podem agir diretamente na membrana plasmática de fungos fitopatogênicos. Nas amostras também existiam compostos de oito carbonos, entre eles 3-Octanone e 1,3-octadiene, sendo estes ligados diretamente ao metabolismo de *Trichoderma* spp. Entre os álcoois destacam-se o 1-Butanol, 3-methyl- e o 1-Butanol, 2-methyl-, (S), encontrados em pequenas quantidades, não estando presentes nos COVs do isolado TR4.

Tabela 4 - Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por isolados *Trichoderma asperellum* identificados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (HS-GC-MS).

Pico	IK	Compostos identificados	Abundância relativa		
			TR1	TR4	Qt
1	721	1-Butanol, 3-methyl-	1,95±2,52	0,00±0,00	0,60±1,19
2	725	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	2,53±0,76	0,00±0,00	0,55±1,09
3	828	1,3-octadiene	1,03±0,90	1,58±1,96	0,00±0,00
4	907	Oxime-, methoxy-phenyl	0,58±0,63	0,00±0,00	0,00±0,00
5	965	Benzaldehyde	0,17±0,04	0,62±0,27	0,17±0,14
6	987	3-Octanone	0,16±0,05	0,23±0,23	0,69±1,39
7	993	Furan, 2-pentyl-	13,11±5,81	22,59±4,46	14,83±2,54
8	1030	1-Hexanol, 2-ethyl-	0,41±0,15	0,28±0,17	0,16±0,19
9	1033	Limonene	0,36±0,03	0,52±0,44	0,60±0,54
10	1048	Benzeneacetaldehyde	0,05±0,07	0,00±0,00	0,05±0,08

11	1195	2-n-Heptylfuran	1,69±0,40	2,19±1,68	0,80±0,21
12	1246	Cetona não identificada	0,03±0,05	0,47±0,29	1,15±0,52
13	1256	Cetona não identificada	0,00±0,00	0,04±0,05	0,30±0,15
14	1264	Cetona não identificada	0,77±0,71	1,47±0,05	0,31±0,05
15	1269	Cyclohexanone, 2-butyl-	0,07±0,10	0,32±0,10	0,55±0,23
16	1395	Tetradecene	0,49±0,18	0,00±0,00	0,08±0,06
17	1400	Tetradecane	0,29±0,41	0,43±0,40	0,00±0,00
18	1446	alpha-Bergamotene	3,23±2,91	0,55±0,26	3,60±1,80
19	1475	2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-	60,18±4,13	62,86±9,48	66,84±3,89
20	1504	beta-Curcumene	2,53±2,61	0,86±0,42	2,25±1,09
21	1518	beta-Bisabolene	0,45±0,64	0,00±0,00	0,61±0,26
22	1535	beta-Sesquiphellandrene	1,03±1,45	0,95±0,09	0,61±0,27
23	1538	Cetona não identificada	0,40±0,57	0,00±0,00	0,75±0,24
24	1583	Não identificado	0,00±0,00	0,00±0,00	1,77±0,89
25	1623	beta-Eudesmol	1,17±1,00	0,31±0,12	0,25±0,04
26	1644	gamma-Eudesmol	3,40±2,38	1,11±0,14	0,71±0,14
27	1756	(E)-6-(hept-1-en1-yl)-2H-pyran-2-one	2,30±0,15	2,30±0,06	1,16±0,10
28	2021	Cembrene	1,32±1,36	0,19±0,12	0,32±0,15
29	2062	Verticiol	0,22±0,19	0,00±0,00	0,27±0,22
30	2266	Pimara-7,15-dien-3-one	0,05±0,07	0,13±0,08	0,01±0,01
Total identificado			99,97%	100%	99,99%

Onde: IK – Índice de Kovats.

5.3.3 Interação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Trichoderma asperellum* vs *Fusarium graminearum*

Com a comparação dos índices de retenção de Kovats, foram identificados aproximadamente 62 Compostos Orgânicos Voláteis (COVs), liberados durante o teste de metabólitos voláteis, no enfrentamento dos metabólitos de diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* e de *Fusarium graminearum*. Esses COVs pertencem a diversos grupos químicos, entre eles: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, aromáticos, terpenos, sesquiterpenos e outros (tabela 5).

Tabela 5 - Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) emitidos por *Trichoderma asperellum* e *Fusarium graminearum*, quando confrontados pelo método de metabólitos voláteis, identificados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (HS-GC-MS)

Pico	IK	Compostos identificados	Abundância relativa		
			TR1 x F20	TR4 x F20	Qt x F20
1	722	1-Butanol, 3-methyl-	1,01±1,26	0,43±0,06	0,61±0,50
2	726	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	1,19±1,50	0,36±0,13	0,60±0,50
3	829	1,3-octadiene	0,88±1,09	0,00±0,00	0,00±0,00
4	872	Benzene, 1,3-dimethyl- o m-Xylene	0,54±0,45	0,13±0,02	0,17±0,06
5	893	2-Heptanone	0,09±0,16	0,10±0,07	0,19±0,17
6	915	Oxime-, methoxy-phenyl-	0,07±0,10	0,03±0,02	0,03±0,01
7	965	Benzaldehyde	0,07±0,10	0,07±0,02	0,19±0,12
8	972	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	0,95±0,64	0,50±0,36	1,15±0,73
9	988	3-Octanone	0,38±0,32	0,04±0,00	0,05±0,04
10	993	Furan, 2-pentyl-	6,20±2,80	3,29±2,08	8,87±0,95
11	1029	p-Mentha-1,3,8-triene	0,24±0,31	0,04±0,00	0,03±0,01
12	1033	Limonene	0,93±0,51	0,22±0,08	0,29±0,09
13	1048	Benzeneacetaldehyde	0,02±0,04	0,00±0,00	0,01±0,02
14	1079	Mesitol	0,07±0,12	0,08±0,02	0,00±0,00
15	1093	Terpinolene	0,77±0,41	0,42±0,16	0,34±0,24
16	1195	2-n-Heptylfuran	0,25±0,47	0,09±0,13	0,08±0,06
17	1205	6-Methyl-3,5-heptadien- 2-one	1,22±0,82	1,81±0,40	1,47±0,24
18	1246	Cetona não identificada	0,09±0,12	0,18±0,02	0,50±0,12
19	1256	Cetona não identificada	0,03±0,04	0,10±0,01	0,34±0,06
20	1265	Cetona não identificada	0,11±0,06	0,02±0,03	0,02±0,02
21	1270	Cyclohexanone, 2-butyl-	0,07±0,11	0,20±0,17	0,53±0,07
22	1272	3,5-Dimethoxytoluene	0,27±0,17	0,14±0,04	0,05±0,03
23	1361	alpha-Cubebene	1,11±0,53	0,68±0,07	0,47±0,06
24	1366	alpha-Longipinene	0,89±0,72	0,59±0,29	0,56±0,20
25	1385	Ylangene	0,77±0,64	0,57±0,35	0,44±0,17
26	1389	Longicyclene/gamma- Muurolene	0,86±0,40	0,66±0,30	0,73±0,18
27	1396	alpha-Cedrene	0,25±0,30	0,23±0,06	0,10±0,11
28	1400	Tetradecane	0,62±0,47	0,00±0,00	0,41±0,19
29	1402	beta-Cubebene	0,10±0,11	0,40±0,06	0,02±0,04
30	1418	alpha-Himachalene	2,42±1,49	1,81±0,30	1,68±0,34
31	1427	(+)-Longifolene	17,27±6,53	17,06±3,62	17,59±1,80
32	1431	Myltatl-4(12)-ene/beta- Barbatene	3,27±2,20	2,37±0,00	1,87±0,30
33	1435	Não identificado	2,02±1,36	2,12±0,05	1,86±0,24
34	1448	Muurola-3,5- diene/Dauca-8,5-diene	4,78±2,66	8,83±1,07	4,74±2,51

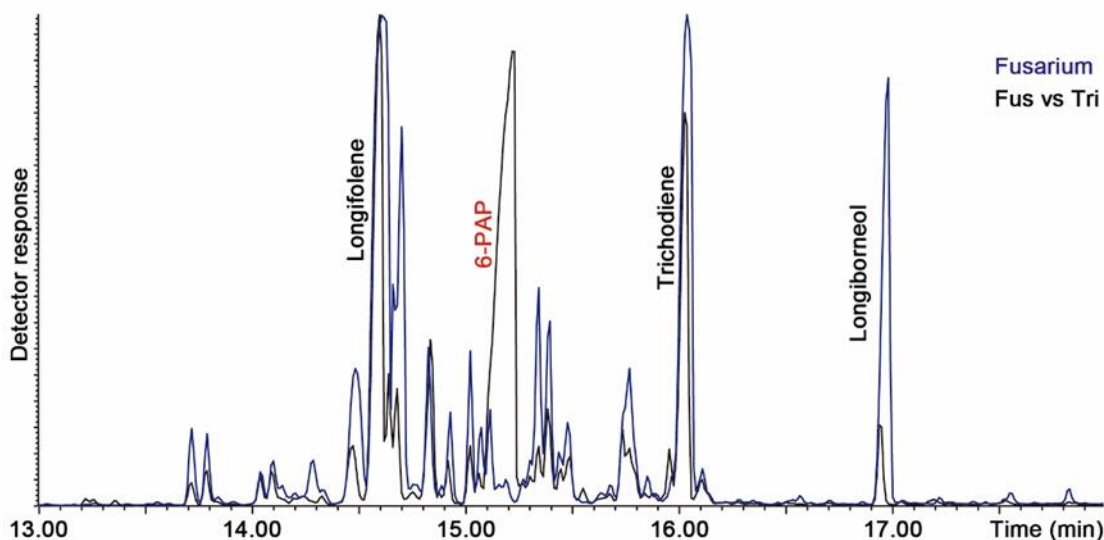
35	1454	Elixene/Thujopsene-(I2)	0,49±0,35	0,71±0,04	0,65±0,14
36	1462	beta-Farnesene	0,45±0,64	1,56±0,23	0,90±0,19
37	1465	Não identificado	0,92±0,37	0,72±0,04	0,46±0,05
38	1475	2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-	11,72±7,88	16,04±2,07	27,53±4,11
39	1482	Não identificado	0,32±0,43	0,52±0,00	0,28±0,04
40	1485	Acoradiene<10-epi-beta->	0,51±0,34	0,24±0,35	0,37±0,13
41	1487	Amorpha-4,11-diene	1,31±0,76	1,44±0,80	0,81±0,17
42	1491	betha-Chamigrene	2,98±1,10	2,42±0,50	1,88±0,29
43	1495	alpha-Muurolene	1,58±2,33	1,23±0,52	0,66±0,17
44	1498	gamma-Muurolene	2,25±1,83	2,53±1,36	1,12±0,23
45	1504	beta-Curcumene	0,69±0,99	1,00±0,08	0,40±0,15
46	1510	Não identificado	0,37±0,14	0,00±0,00	0,00±0,00
47	1514	Não identificado	0,20±0,19	0,66±0,02	0,40±0,08
48	1519	beta-Bisabolene	0,86±0,40	1,34±0,65	1,21±0,22
49	1522	beta-Elemene/Helifolenol B	1,47±0,75	0,80±1,14	1,23±0,47
50	1527	gamma-Bisabolene	0,02±0,04	0,00±0,00	0,17±0,06
51	1538	Cetona não identificada	2,23±1,76	1,30±0,11	1,42±0,26
52	1544	trichodiene/beta-bazzanene	16,46±7,07	15,97±1,7	11,31±0,0
53	1553	Não identificado	0,07±0,14	0,13±0,19	0,00±0,00
54	1621	Longiborneol	1,92±1,73	2,29±0,24	1,93±0,91
55	1644	gamma-Eudesmol	0,9±1,14	0,78±0,12	0,26±0,10
56	1699	Longifolenaldehyde	0,26±0,11	0,15±0,06	0,09±0,04
57	1756	(E)-6-(hept-1-en1-yl)-2H-pyran-2-one	0,48±0,23	0,68±0,10	0,38±0,06
58	1848	Isoaromadendrene epoxide	0,14±0,17	0,10±0,06	0,06±0,03
59	1857	Corymbolone	0,07±0,10	0,04±0,06	0,03±0,02
60	2021	Cembrene	1,37±2,24	2,52±1,50	0,29±0,26
61	2062	Verticiol	0,12±0,17	0,30±0,19	0,08±0,05
62	2247	Pimara-7,15-dien-3-one	0,03±0,05	0,02±0,01	0,00±0,00
Total identificado			100,00%	99,06%	99,91%

Onde: IK – Índice de Kovats.

Observa-se que a maioria dos compostos dessas amostras já estavam presentes quando foram avaliados os três isolados de *T. asperellum* isoladamente, bem como no tratamento somente com o isolado de *F. graminearum*. Contudo, percebe-se uma diminuição da abundância relativa de alguns compostos importantes de *F. graminearum*, quando esse fungo foi exposto aos metabólitos de *T. asperellum*, principalmente do isolado Qt, conforme demonstrado na figura 1. Percebe-se na região do cromatograma relacionada aos

sesquiterpenos, a diminuição dos compostos, longifolene, Trichodiene e Longiborneol, já descritas como ligadas a toxicidade e patogenicidade de espécies do gênero *Fusarium* (figura 1).

Figura 1 – Região dos sesquiterpenos ampliada demonstrando a diminuição de compostos produzidos por *Fusarium graminearum*, quando o fungo cresceu em contato com os metabólitos voláteis de *Trichoderma asperellum* (Qt).



Onde: Linha azul Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) de *Fusarium graminearum* no tratamento sem contatos com os metabólitos voláteis de *Trichoderma asperellum* (Qt) e linha preta metabólitos de *F. graminearum* em contato com os metabólitos voláteis de *T. asperellum* (Qt).

5.4 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi avaliada a ação dos metabólitos voláteis de diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* sobre *Fusarium graminearum*, também foram identificados os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) liberados por diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* e um isolado de *Fusarium graminearum*, isoladamente e em confronto. A inibição do crescimento micelial de *F. graminearum* variou de 11,18 a 14,84%, e nesse teste, foi avaliada somente a ação dos metabólitos voláteis no crescimento micelial, esses por sua vez, não interferem apenas no crescimento micelial, mas também na produção de compostos voláteis que participam em funções fisiológicas importantes de *F. graminearum*, como na patogenicidade e na produção de substâncias tóxicas (COONEY et al., 2001; EL-HASAN et al., 2008; PROCTOR et al., 2005).

Quando foram avaliados os COVs liberados por *F. graminearum* sem a interação com os antagonistas, observou-se um perfil de sesquiterpenos já descritos para a espécie (GIROTTI

et al., 2012). Segundo Búsko et al. (2019) entre os sesquiterpenos, estão as micotoxinas que compreendem um grande grupo de compostos, tóxicos para as plantas, humanos e animais. Algumas dessas substâncias já foram relatadas para *F. graminearum*, como é o caso do Trichodiene/beta-bazzanene, que foi encontrado na presente pesquisa com abundância relativa de 16,09% (GIROTTI et al., 2012; MALBRÁN et al., 2020). Esse composto é um sesquiterpeno e é o primeiro intermediário cíclico na via biossintética dos tricotecenos, que são micotoxinas comumente associadas a espécies de *Fusarium* (DEMYTTENAERE et al., 2004; MALBRÁN et al., 2020).

A micotoxina tricoteceno deoxynivalenol (DON) atua ligando-se ao domínio da peptidil-transferases nos ribossomos de organismos eucarióticos, inibindo a síntese de proteínas (GARREAU DE LOUBRESSE et al., 2014). Segundo Rocha et al. (2005), a característica tóxica da DON em plantas e animais pode levar à interrupção da síntese de DNA/RNA, estresse ribotóxico e citotoxicidade dirigida à membrana. Além disso, Proctor et al. (2005) descreveu que os tricotecenos são fatores que influenciam na patogenicidade e no desenvolvimento de doenças em plantas causadas por *F. graminearum*, que pode ser um conhecimento importante visando práticas de manejo que visam reduzir danos causados por doenças causadas por esse patógeno.

A culmorina é uma substância que demonstra sinergismo com a DON, aumentando a toxicidade da mesma (MCCORMICK, 2014). Culmorina é produzida pela biotransformação de difosfato de farnesila através de um complexo caminho. Um elemento-chave desta via é o longiborneol, identificado nos COVs de *F. graminearum* na presente pesquisa com abundância relativa de 6,88%, esse COV difere da culmorina pela falta de um único grupo hidroxila. Essa molécula é necessária para completar a biossíntese de culmorina em possível associação com uma oxigenase (MCCORMICK et al., 2010).

Para *Fusarium verticillioides* foram descritos alguns outros sesquiterpenos entre eles: Longicyclene, D-Longifolene, beta-Elemene/Helifolenol B, Germacrene D, que também foram encontrados no presente estudo (ACHIMÓN et al., 2019). Destaca-se a presença D-longifolene com abundância de 26,41% e uma mistura de sesquiterpenos, em que não foi possível identificar os compostos isoladamente, esse fato reflete a complexidade das estruturas neste grupo de compostos (BÚSKO et al., 2019). Isso se deve às muitas modificações químicas às quais eles podem ser submetidos, culminando em diferentes propriedades e atividades com respeito aos organismos vivos (TAKAHASHI et al., 2007).

Para que os fungos do gênero *Trichoderma* spp. demonstrem máxima ação antagonista no parasitismo, ocorre uma ação combinada de metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas que lisam a parede celular do fungo atacado, ou seja, há um sinergismo entre os fatores, por isso se torna tão importante conhecer os COVs liberados por fungos dessa espécie (DRUZHININA et al., 2011). Na presente pesquisa pode-se dar ênfase ao composto 2H-Pyran-2-one, 6-pentyl- (6PAP), que apresentou mais de 50% de toda a abundância relativa dos COVs, dos diferentes isolados de *T. asperellum*. Este composto é uma pirona produzida por várias espécies de *Trichoderma*, incluindo *T. hamatum*, *T. citrinoviride*, *T. viridescens*, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. asperellum*, e *T. harzianum* (EL-HASAN et al., 2017; MARQUES et al., 2018, JELENÍ et al., 2014). Segundo Vinale et al. (2008) 6PAP possui atividade antifúngica, pois reduziu o crescimento micelial de fitopatógenos, como *B. cinerea*, *R. solani* e *F. oxysporum*. Os autores relatam ainda, que esse composto teve efeito regulador de crescimento e induziu a defesa sistêmica nas plantas, sendo que o efeito regulador de crescimento foi comparado a função que a auxina exerce nas mesmas.

O composto 6PP obtido de *T. asperellum* T23 e *T. harzianum* T16 suprimiu a formação de peritécio e ascósporo de *F. graminearum* (EL-HASAN et al., 2017; MARQUES et al., 2018). Mazzei et al. (2016) descreveu o efeito positivo do 6PP em plantas de tomate, que foi correlacionado a mudanças na composição dos metabólitos presentes na folha da planta, aumentando a acetilcolina, que atua na permeabilidade de membranas e aumentando o ácido gama-aminobutírico, que regula o metabolismo do carbono, mantém o pH e a pressão osmótica no interior das células.

Quando encontrados nos COVs liberados por *Trichoderma* spp., os sesquiterpenos são considerados ferramentas no mecanismo de competição, pois os mesmos possuem potencial na regulação e supressão do crescimento em microrganismos que competem por espaço e/ou nutrientes, com *Trichoderma* spp. (POLIZZI et al. 2011). Segundo Inoue et al (2004) os sesquiterpenos agem na membrana plasmática causando perda de controle osmótico nas membranas celulares, devido a característica lipofílica desses compostos. Kramer e Abraham (2012) sugerem que esses compostos agem como se fossem solventes, facilitando a passagem de toxinas pelas membranas. No geral, espécies de *Trichoderma* com características de micoparasitismo produzem esse tipo de composto (STOPPACHER et al., 2010; CITRON et al., 2011; CRUTCHER et al., 2013), esse fato torna provável que os sesquiterpenos também auxiliam na habilidade desses fungos em antagonizar patógenos, estabelecendo-se como altamente competitivos no ambiente próximo a rizosfera

Nas amostras de *T. asperellum* avaliadas, também foram observados compostos voláteis de oito carbonos, sendo os mesmos importantes no metabolismo de fungos do gênero *Trichoderma* spp. Herrero-Garcia et al. (2011), demonstraram que esses compostos induzem a formação de conídios e crescimento de fungos, além de auto inibição, dependendo da densidade celular. Nemcovic et al. (2008) relatou que 1-octen-3-ol e seus análogos 3-octanol e 3-octanona são responsáveis pelo processo de conidiação em *Trichoderma* spp. Esses compostos também foram relacionados com o desenvolvimento da colônia e à comunicação entre as colônias de *Trichoderma* spp.

Entre os álcoois liberados pelos isolados de *T. asperellum* da presente pesquisa está o 2-meti-1-butanol, Humphris et al. (2002) demonstraram que o 2-meti-1-butanol produzido por *T. aureoviride* e *T. viride*, afetou negativamente o crescimento micelial e a síntese de proteínas em *Serpula lacrymans*, que causa a podridão seca em madeira. O longifoleno e seus derivados oxidados também possuem propriedades antifúngicas (MUKAI et al., 2017). No trabalho desenvolvido por Yamasaki et al. (2007) limoneno apresentou atividade antifúngica contra *Alternaria alternata*. Em outro caso, o limoneno acelerou a via de sinalização ácido jasmônico, induzindo a expressão de um gene relacionado a indução de resistência em *Arabidopsis thaliana* e no espinafre mostarda japonês (*Brassica rapa* var. *Perviridis*), após inoculação com *Colletotrichum higginsianum* (FUJIOKA et al., 2015).

As interações entre espécies de *Trichoderma* com características antagonistas contra fungos fitopatogênicos são complexas e isso se reflete também quando avaliamos a interação dos COVs desses microrganismos. Nesta pesquisa percebe-se que, ao contrário do esperado, nem sempre o fato dos fungos fitopatogênicos e dos seus metabólitos voláteis entrarem em contato com antagonistas do gênero *Trichoderma* spp. têm papel estimulador na produção de metabólitos secundários com ação fungitóxica.

O efeito relatado acima já foi descrito por Stoppacher et al. (2010) que avaliou o perfil da produção de COVs em *T. atroviride* na presença de uma micotoxina liberada por *Fusarium*. O autor relatou que a micotoxina altera o padrão de expressão de COVs de *T. atroviride*, suprimindo a produção de 6PP, enquanto a produção de compostos associados à esporulação, como 1-octen-3-ol, aumenta. Por outro lado, alguns isolados *Trichoderma* spp. são capazes de degradar, por exemplo, o ácido fusárico e inibir a produção da mesma devido à secreção de 6PAP (EL-HASAN et al., 2008). Em outro estudo Cooney et al. (2001) descreveram que o 6PAP liberado por *Trichoderma* spp. foi capaz de inibir a biossíntese de tricoteceno deoxynivalenol (DON) produzida por *Fusarium* spp.

Na presente pesquisa pode-se notar a diminuição da abundância relativa de importantes COVs de *F. graminearum* quando o fungo foi exposto aos COVs do isolado Qt de *T. asperellum*. Esses compostos são o longiborneol, trichodiene e o longifolene, que são elementos chave na produção de substâncias tóxicas. Essas mudanças no perfil dos compostos observadas na presente pesquisa, propõem que os microrganismos podem alterar seu metabolismo secundário e, assim, alterar o padrão de expressão dos compostos voláteis, para competir com outros microrganismos, sendo importante ressaltar a ação dos COVs de *Trichoderma* spp. na inibição de compostos ligados a capacidade fitopatogênica do isolado de *F. graminearum*.

5.5 CONCLUSÃO

Os diferentes isolados de *Trichoderma asperellum* inibiram o crescimento micelial de *Fusarium graminearum*. *T. asperellum* produziu 6PAP, composto descrito como inibidor de patógenos e indutor de crescimento vegetal. *F. graminearum* produziu compostos ligados a toxicidade e a patogenicidade. Os compostos orgânicos voláteis dos isolados de *Trichoderma asperellum* inibiram a formação de compostos voláteis de *Fusarium graminearum*, dentre eles o longiborneol, trichodiene e longifolene, conhecidos como precursores de toxinas que afetam animais e contribuem com a patogenicidade em vegetais.

5.6 REFERÊNCIAS

ACHIMÓN, F., et al. Carbon sources as factors affecting the secondary metabolism of the maize pathogen *Fusarium verticillioides*. **LWT**, v. 115, p. 108470, 2019.

ADNAN, M. et al. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. **Microbial pathogenesis**, v. 129, p. 7-18, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042>>. Acesso em: 12 jan. 2021.

BUŠKO, M. et al. Relationships between volatile organic compounds with an emphasis on terpene compounds and genetic matrix in inoculated and non-inoculated winter wheat cultivars. **Chemistry and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 971-986, 2019.

CITRON, C. A. et al. Biosynthesis of acorane sesquiterpenes by *Trichoderma*. **RSC advances**, v. 1, n. 2, p. 290-297, 2011. Disponível em: <DOI 10.1039/C1RA00212K>. Acesso em: 19 dez. 2020.

COONEY, J. M.; LAUREN, D. R.; DI MENNA, M. E. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 522-526, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf0006372>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

CRUTCHER, F. K. et al. A putative terpene cyclase, *vir4*, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*. **Fungal genetics and biology**, v. 56, p. 67-77, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.05.003>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

DE LOUBRESSE, N. G. et al. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 517-522, 2014. <<https://www.nature.com/articles/nature13737>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

DEMYTTENAERE, J. C. R. et al. Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *Fusarium* species. **Journal of Chromatography a**, v. 1027, n. 1-2, p. 147-154, 2004.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro2637?la>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

EL-HASAN, A. et al. Assessment of the antifungal activity of selected biocontrol agents and their secondary metabolites against *Fusarium graminearum*. **European journal of plant pathology**, v. 150, n. 1, p. 91-103, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-017-1255-0>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; BUCHENAUER, H. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 2, p. 79-87, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01330.x>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

ELSHARBINY, E. A. et al. *Trichoderma* volatile organic compounds as a biofumigation tool against late blight pathogen *Phytophthora infestans* in postharvest Potato tubers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 31, p. 8163-8171, 2020.

FUJIOKA, Kayoko et al. Protection induced by volatile limonene against anthracnose disease in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 81, n. 6, p. 415-419, 2015.

GIROTTI, J. et al. Use of solid phase microextraction coupled to capillary gas chromatography-mass spectrometry for screening *Fusarium* spp. based on their volatile sesquiterpenes. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 2, p. 121-128, 2010. Disponível em: <<https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/WMJ2009.1182>>. Acesso em: 09 jun. 2020. <https://doi.org/10.3920/WMJ2009.1182>.

GIROTTI, J. R. et al. Early detection of toxigenic *Fusarium graminearum* in wheat. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, n. 2, p. 143-152, 2012. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/wagac/wmj/2012/00000005/00000002/art00005>>. Acesso em: 09 jan. 2021. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1348>.

HERRERO-GARCIA, E. et al. 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 4-5, p. 393-

400, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.005>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

HUMPHRIS, S. N. et al. The effects of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, n. 2, p. 215-219, 2002. Disponível em: < <https://academic.oup.com/femsle/article/210/2/215/488376?login=true>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

INOUE, Y. et al. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS microbiology letters**, v. 237, n. 2, p. 325-331, 2004. Disponível em: < <https://academic.oup.com/femsle/article/237/2/325/530134?login=true>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

JELEŃ, H. et al. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. **Mycological Progress**, v. 13, n. 3, p. 589-600, 2014. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11557-013-0942-2>>. Acesso em: 09 jun. 2020.

KESWANI, C. et al. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 533-544, nov. 2014. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5344-5>>. Acesso em: 09 jun. 2020.

KOVATS E. S. 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. **Advances in Chromatography**, v. 1, p. 229–247.

KRAMER, R.; ABRAHAM, W. R. Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for?. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 1, p. 15-37, 2012. Disponível em: < DOI 10.1007/s11101-011-9216-2>. Acesso em: 19 dez. 2020.

LAZAROTTO, M. et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9390–9402, Nov. 2014. Disponível em: < <https://www.geneticsmr.org/articles/morphological-and-molecular-characterization-of-fusarium-spp-pathogenic-to-pecan-tree-in-brazil.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2020.

MAGAN, N.; EVANS, P. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 4, p. 319-340, 2000.

MALBRÁN, I. et al. Commercially available natural inhibitors of trichothecene production in *Fusarium graminearum*: A strategy to manage *Fusarium* head blight of wheat. **Crop Protection**, v. 138, p. 105313, 2020. Disponível em:

MARQUES, E.; MARTINS, I.; MELLO, S. C. Marques de. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. **Biota Neotropica**, v. 18, n. 1, 2018. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S167606032018000100503&script=sci_arttext>. Acesso em: 19 dez. 2020.

MAZZEI, P. et al. Metabolomics by H-HRMAS-NMR of tomato plants treated with two secondary metabolites isolated from *Trichoderma*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1021-1055, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Alberto_Pascale/publication/301482516_Metabolomics_by_1_H-HRMAS->. Acesso em: 19 dez. 2020.

MCCORMICK, S. P.; ALEXANDER, N. J.; HARRIS, L. J. CLM1 of *Fusarium graminearum* encodes a longiborneol synthase required for culmorin production. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 1, p. 136-141, 2010.

MCCORMICK, S. Genetic control of *Fusarium* mycotoxins to enhance food safety. **Research project**, v. 421045, 2014.

MINERDI, D. et al. *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. **FEMS microbiology ecology**, v. 76, n. 2, p. 342-351, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article/76/2/342/699135?login=true>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

MOYA, P. et al. Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. **Journal of Plant Protection Research**, v. 58, 2018. Disponível em: <<https://digital.cic.gba.gov.ar/handle/11746/9939>>. Acesso em: 10 dez. 2020.

MUKAI, A.; TAKAHASHI, K.; ASHITANI, T. Natural autoxidation of longifolene and anti-termite activities of the products. **Journal of Wood Science**, v. 63, n. 4, p. 360-368, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10086-017-1637-0>>. Acesso em: 10 dez. 2020.

NEMČOVIČ, M. et al. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 284, n. 2, p. 231-236, 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article/284/2/231/516601?login=true>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

POLIZZI, V. et al. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. **Building and Environment**, v. 46, n. 4, p. 945-954, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2010.10.024>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

PROCTOR, R. H.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. **Molecular plant-microbe interactions** 1995 v.8 no.4 pp. 593. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/24895>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 4, p. 369-378, 2005. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652030500058403>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

SCHENKEL, D. et al. A meta-analysis approach for assessing the diversity and specificity of belowground root and microbial volatiles. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 707, 2015. Disponível em: <DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00707>>. Acesso em: 02 mar. 2019.

STOPPACHER, N. et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 187-193, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.011>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

TAKAHASHI, S. et al. Metabolic engineering of sesquiterpene metabolism in yeast. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, n. 1, p. 170-181, 2007.

USSEGLIO, V. L., et al. Volatile organic compounds from the interaction between *Fusarium verticillioides* and maize kernels as a natural repellents of *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 73, p. 109-114, 2017.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K. Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 11, p. 2835-2842, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ptr.6728>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 80-86, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>>. Acesso em: 17 set. 2020.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 357-364, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020592802234>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

YAMASAKI, Yumiko et al. Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in *citrus* defense. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, n. 3, p. 168-179, 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-007-0013-0>>. Acesso em: 19 dez. 2020.

6 CAPÍTULO IV - *Trichoderma asperellum* NO CONTROLE DE CANCRO DO TRONCO EM *Carya illinoensis*

Carya illinoensis é uma espécie florestal que está ocupando cada vez mais espaço em propriedades rurais, fazendo parte da renda do produtor através da produção de nozes. Contudo, problemas fitossanitários ameaçam o rendimento da cultura, interferindo no desenvolvimento das plantas ou até mesmo causando a morte das mesmas. O cancro do tronco é uma dessas doenças que foi identificada recentemente em pomares no Rio Grande do Sul. Os agentes causais da doença são fungos que fazem parte da família Botryosphaeriaceae, e entre eles está *Lasiodiplodia theobromae*. Como trata-se de um patógeno habitante natural do solo, a utilização do controle biológico está entre os métodos mais eficientes de manejo da doença. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma asperellum* e de seus filtrados de cultura no controle de *Lasiodiplodia theobromae in vivo* e na promoção do crescimento de mudas de noqueira-pecã. Foram desenvolvidos dois experimentos, ambos em casa de vegetação. No primeiro experimento, a parte aérea das plantas foi aspergida pelos tratamentos de controle biológico e, 14 dias após foi inoculado o patógeno no caule, por meio de ferimento. No segundo experimento, o substrato foi umedecido com os tratamentos de controle biológico e 14 dias após foi feita a inoculação do patógeno seguindo mesma metodologia do primeiro experimento. Foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento da parte aérea, diâmetro do caule, massa fresca da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz, incidência e severidade da doença. A comparação das médias foi pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com o software SISVAR. Nos dois experimentos, obteve-se as maiores respostas nos parâmetros de crescimento avaliados nos tratamentos com os filtrados de cultura e com a suspensão de esporos em relação ao tratamento inoculado com o patógeno sem o uso dos tratamentos de controle biológico. Esses tratamentos também reduziram a incidência e a severidade do cancro do tronco em mudas de noqueira-pecã, sendo que o melhor tratamento variou com a forma de aplicação. Os dois isolados de *T. asperellum* e os dois filtrados de cultura estimularam o crescimento inicial das plantas, diminuíram a incidência e a severidade do cancro do tronco nas plantas de noqueira-pecã, independente da forma de aplicação.

Palavras-chave: cancro do tronco. *Lasiodiplodia theobromae*. Controle biológico. Manejo de doenças.

Trichoderma asperellum IN THE CONTROL OF STEM CANKER IN *Carya illinoensis*

Carya illinoensis is a forest species that is occupying more and more space on rural properties, forming part of the producer's income through the production of nuts. However, phytosanitary problems threaten the yield of the crop, interfering with the development of the plants or even causing their death. Trunk canker is one of those diseases that was recently identified in orchards in Rio Grande do Sul. The causative agents of the disease are fungi that are part of the Botryosphaeriaceae family, and among them is *Lasiodiplodia theobromae*. It is a pathogen that inhabits natural soil, the use of biological control is among the most efficient methods of managing the disease. Thus, the objective of this work was to evaluate the ability of *Trichoderma asperellum* isolates and their culture filtrates to control *Lasiodiplodia theobromae in vivo* and to promote the growth of pecan seedlings. Two experiments were carried out, both in a greenhouse. In the first experiment, the aerial part of the plants was sprayed by biological control treatments and, 14 days later, the pathogen was inoculated into the stem, through injury. In the second experiment, the substrate was moistened with biological control treatments and

14 days later the pathogen was inoculated following the same methodology as the first experiment. The following parameters were evaluated: length of the aerial part, stem diameter, fresh mass of the aerial part and the root, dry mass of the aerial part and the root, incidence and severity of the disease. The comparison of means was performed using the Skott-Knott test at a 5% probability of error, using the SISVAR software. In both experiments, the greatest responses were obtained in the growth parameters evaluated in the treatments with the culture filtrates and with the spore suspension in relation to the treatment inoculated with the pathogen without the use of biological control treatments. These treatments also reduced the incidence and severity of stem canker in pecan seedlings, and the best treatment varied with the form of application. The two isolates of *T. asperellum* and the two culture filtrates stimulated the initial growth of the plants, decreasing the incidence and severity of stem canker in pecan plants, regardless of the form of application.

Keywords: Trunk canker. *Lasiodiplodia theobromae*. Biological control. Disease management.

6.1 INTRODUÇÃO

Botryosphaeriaceae é uma família fúngica que compreende 22 gêneros, distribuindo-se principalmente, em regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo em uma ampla gama de hospedeiros. Os fungos desta família podem apresentar hábitos saprófitas, ser fitopatogênicos ou sobreviver em tecidos vegetais de forma assintomática (ABDOLLAHZADEH et al., 2010; LUO et al., 2019). Os gêneros *Lasiodiplodia*, *Pseudofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Neofusicoccum*, *Diplodia*, *Dothiorella* e *Botryosphaeria*, são descritos como causadores de doenças em plantas e ocasionam uma infinidade de sintomas, como queima de brotações, cancos do tronco, apodrecimento de frutas e gomose (ABDOLLAHZADEH et al., 2010).

Entre os hospedeiros desses fungos destaca-se a noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], nessa espécie os fungos da família *Botryosphaeriaceae* causam a doença cancro do tronco, caracterizada por pequenas lesões elípticas na casca do tronco e dos ramos que progridem para cancos, com a presença de estrias negras próximas aos tecidos vasculares. Em casos mais severos da doença esses fungos podem levar a planta atacada à morte (POLETTO et al., 2016; ROLIM et al., 2020).

O controle biológico de doenças merece atenção por ser uma forma de controle segura, eficaz e que atende aos requisitos de protocolo de certificações no mercado internacional (MEYER et al., 2019). Nesse sentido, o controle biológico pode ser definido como o controle de microrganismos causadores de doenças em plantas, por meio da diminuição do inóculo em estado dinâmico ou estático, por meio da utilização de outros microrganismos, conhecidos como antagonistas (O'BRIEN et al., 2017). Entre os antagonistas mais estudados no controle biológico estão os fungos do gênero *Trichoderma*. A eficiência de *Trichoderma* no controle de

microrganismos fitopatogênicos é decorrente dos mecanismos conhecidos como: antibiose, micoparasitismo e/ou competição, capacidade de induzir resistência de plantas a doenças, efeitos positivos na germinação e no crescimento de plantas (MEDEIROS et al., 2018).

Trichoderma spp. foi relatado como eficiente no controle biológico do cancro do tronco em teca (*Tectona grandis* Linn, F.) por Borges et al. (2018). No trabalho, os autores estudaram a redução da expressão do sintoma cancro do tronco, devido a incorporação de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum* ao substrato de cultivo, resultando na redução dos sintomas nas plantas tratadas com o antagonista de até 50 e 100%, para cada microrganismo respectivamente. Assim, o presente estudo objetivou (i) avaliar a ação de dois isolados de *Trichoderma asperellum* e dos seus filtrados de cultura no controle de *Lasiodiplodia theobromae in vivo* e, (ii) avaliar o efeito dos isolados de *T. asperellum* e dos seus filtrados de cultura na promoção do crescimento de mudas de noqueira-pecã.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Local de realização dos experimentos, origem e caracterização dos microrganismos

O trabalho foi realizado no Laboratório Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química, no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi e na casa de vegetação do Departamento de Defesa Fitossanitária, todos pertencentes a Universidade Federal de Santa Maria, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Foram utilizados dois isolados antagonistas de *Trichoderma asperellum*, e um patogênico de *Lasiodiplodia theobromae*. Um dos isolados de *T. asperellum* foi obtido de solo rizosférico de plantas adultas de *C. illionensis* e codificado como TR1. O outro isolado foi obtido de uma alíquota do produto comercial Quality® (2×10^9 conídios por mL) plaqueada para o meio BDA, codificado como Qt (*T. asperellum*). Para obtenção do isolado de *T. asperellum* do solo, foram realizadas diluições seriadas, o mesmo foi identificado molecularmente, a sequência de DNA depositada no GenBank (MN082152), e, posteriormente ele foi armazenado no herbário na Universidade Federal de Santa Maria (nº 18,372), conforme descrito no Capítulo I da presente tese.

O isolado de *Lasiodiplodia theobromae* era procedente da micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria, e estava armazenado no refrigerador em tubos eppendorf contendo água destilada esterilizada. Esse isolado foi obtido

de plantas de noqueira-pecã com sintomas de cancro do tronco e fendilhamento, e posteriormente, foi testado em casa de vegetação, confirmando a sua patogenicidade. Este isolado foi identificado molecularmente, com código no GenBank MT533179 e registro no herbário na Universidade Federal de Santa Maria sob nº18,362.

6.2.2 Produção dos filtrados de cultura de *Trichoderma asperellum*

Os isolados de *T. asperellum* foram cultivados em placas de Petri (7 dias, 25 ± 2 °C, 12 h fotoperíodo), após foi adicionada água destilada e esterilizada e realizada a raspagem da superfície da colônia com a alça de Drigalski, a suspensão foi ajustada para a concentração 1×10^5 para o isolado TR1 e Qt, separadamente. A suspensão de esporos (1 mL) dos isolados de *T. asperellum* foi colocado em erlenmeyers de 250 mL de capacidade, com volume utilizado de 100 mL de meio de cultura líquido em câmara de fluxo laminar.

O meio de cultivo era composto por: 20 g/L de Água de Maceração de Milho (AMM), 7,5 g/L de extrato de levedura, 50 g/L de sacarose, e o pH foi ajustado para 5, com o auxílio de pHmetro digital, sendo esta a melhor condição de cultivo do antagonista para a produção de filtrados de cultura obtida no Capítulo I. Antes da inoculação os erlenmeyers contendo o meio de cultivo foram autoclavados a 120 °C durante 20 min.

Após acrescentar a suspensão ao meio, os erlenmeyers foram alocados em câmara incubadora com agitação orbital, sob agitação de 100 rpm para os isolados TR1 e Qt. Transcorridas 96 h de incubação foi efetuada a separação da biomassa da parte líquida, executada por filtragem em membrana milipore 12 micras e em seguida em 0,22 micras para assegurar que o filtrado de cultura estivesse livre de esporos fúngicos. Para a filtragem foi utilizado um sistema com membranas acopladas a uma bomba de vácuo para reduzir o tempo da filtração. Os filtrados de cultura foram congelados para posterior emprego nos bioensaios, adaptado da metodologia de Junges et al. (2018).

6.2.3 Produção das mudas, preparo do inóculo e inoculação do patógeno

As mudas de noqueira-pecã utilizadas para os experimentos foram obtidas de sementes da cultivar Barton. Primeiramente, procedeu-se com o processo de estratificação das sementes, as quais foram acomodadas em camadas alternadas de areia esterilizada com 5 cm de espessura, dispostas em bandejas plásticas. As sementes foram umedecidas a cada três dias e as bandejas eram providas de orifícios na parte inferior para drenagem do excesso de água. As bandejas

foram mantidas em câmara fria na temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante noventa dias (POLETTO et al., 2016). Posteriormente, efetuou-se a semeadura em substrato comercial esterilizado acomodado em bandejas de 7 L com orifício na parte inferior para drenagem da água. Transcorridos sete dias da emergência, transplantou-se as plântulas para sacos plásticos (12 cm x 25 cm) com substrato comercial Mecplant[®] (composto por casca de Pinus, vermiculita, e macro nutrientes) esterilizado.

Para o preparo do inóculo, inicialmente o patógeno foi cultivado em meio de cultura BDA por 7 dias em BOD a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 h, para posterior utilização. O inóculo do patógeno foi depositado entre a região basal e mediana do caule das mudas (aproximadamente 90 dias após a emergência) a aproximadamente 5 cm do substrato, através de uma incisão, com o auxílio de um bisturi esterilizado. Em cada orifício foi depositado um disco de 6 mm de diâmetro de meio de cultura BDA contendo estruturas do isolado patogênico. O ferimento foi coberto com algodão umedecido e envolvido com plástico filme transparente, para evitar o ressecamento e a entrada de outros microrganismos. Nas plantas testemunha foram realizadas as incisões e nestas foi depositado o disco de meio de cultura sem estruturas do fungo (adaptado de TREMACOLDI et al., 2009).

6.2.4 Experimento 1 - Aplicação dos tratamentos via parte aérea

Para esse experimento foram utilizadas plantas com 90 dias após a emergência, essas plantas apresentavam altura que variava de 18,42 a 21,25 cm e diâmetro entre 3,01 a 3,79 mm. A aplicação dos tratamentos foi realizada 14 dias antes da inoculação do fungo fitopatogênico por aspersão sobre as plantas. Os filtrados de cultura e as suspensões de esporos de *Trichoderma asperellum* (1×10^5), foram aspergidas com aspersor manual, de forma que atingisse toda a planta, em cada planta foi aplicado 10 mL dos tratamentos de controle biológico.

Para testar o efeito dos tratamentos em plantas saudas, sem a inoculação do fungo fitopatogênico, apenas a suspensão de esporos ou os filtrados de cultura foram aspergidos sobre as plantas. Para avaliar o efeito apenas do patógeno na planta, fez-se a inoculação do fungo fitopatogênico sem nenhum tratamento de controle biológico, sendo aspergida somente água destilada sobre as plantas.

6.2.5 Experimento 2 - Aplicação dos tratamentos no substrato

As plantas foram transplantadas com aproximadamente 90 dias após emergência, sendo escolhidas as plantas mais homogêneas, cuja a altura variava de 16,79 a 19,18 cm e diâmetro 3,83 a 4,65 mm. Para a aplicação dos tratamentos de controle biológico o substrato foi umedecido, com a aplicação de 10 mL da suspensão de esporos dos isolados de *Trichoderma asperellum* (1×10^5) ou dos filtrados de cultura originados destes, para cada planta. O outro tratamento consistiu somente na utilização de água destilada e esterilizada em substituição aos tratamentos de controle biológico. Após 14 dias do tratamento com a suspensão de esporos ou com os filtrados de cultura foi realizada a inoculação do patógeno, tanto nos tratamentos com as plantas tratadas, como naquelas que não receberam nenhum tratamento visando o controle do patógeno. Em seguida as plantas foram mantidas por 90 dias em casa de vegetação.

6.2.6 Avaliação dos experimentos

As mudas foram observadas aos 15, 30, 45, 60, 75 dias após a inoculação, para averiguar a presença de sintomas externos nas plantas, quando presentes foram analisados quanto ao aspecto, ocorrência de fendilamentos na casca e formação de protuberâncias ou morte. Aos 90 dias após a inoculação do patógeno, as plantas também foram avaliadas por uma escala de notas adaptada de Borges (2018). Para utilização da escala as plantas foram seccionadas ao meio e analisadas quanto aos danos internos, sendo que esta escala varia de 0 a 4, determinada com base na severidade da doença: (Nota 0) = mudas sem lesão visível; (Nota 1) = lesão com até 3 cm de comprimento; (Nota 2) = lesão com até 6 cm de comprimento; (Nota 3) = lesão de comprimento superior 6 cm e (Nota 4) = mudas com lesão profunda, escurecimento dos vasos, mostrando queda de folhas e morte.

No momento da inoculação do patógeno e 90 dias após, foram medidos o diâmetro do colo e o comprimento da parte aérea, com auxílio de paquímetro digital e régua milimetrada. Aos 90 dias após a inoculação, foi determinada: a massa fresca de plantas, onde, primeiramente as mesmas foram retiradas dos sacos plásticos e as raízes lavadas em água corrente, depois as plantas foram divididas em parte aérea e radicular, em que cada planta representou uma repetição, após estas foram pesadas em balança analítica de precisão 0,01 g e; massa seca de plantas, que utilizou as plantas da determinação da massa fresca, as quais foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60 ± 3 °C até massa constante, após estas foram pesadas em balança analítica de precisão 0,01 g.

6.2.7 Procedimento estatístico

O experimento com aplicação dos tratamentos de controle biológico via parte aérea foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por uma planta. Os tratamentos foram organizados em bifatorial: isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1 e Qt) e os filtrados de cultura obtidos através do cultivo destes isolados em fermentação submersa (filtrado 1 e filtrado 2) X inoculação e não inoculação do fungo fitopatogênico.

O experimento da aplicação dos tratamentos de controle biológico via substrato foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo cada repetição composta por uma planta. A análise foi bifatorial, sendo um fator os isolados de *T. asperellum* (TR1 e Qt) e os filtrados de cultura obtidos através do cultivo destes isolados em fermentação submersa (filtrado 1 e filtrado 2) e, o outro fator a inoculação ou não com *L. theobromae*. Para os dois experimentos foi verificado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o software BioEstat 5.0. As médias dos dados foram comparadas pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Experimento 1 - Aplicação via parte aérea

Os resultados da avaliação de altura e diâmetro das plantas, realizada 90 dias após a inoculação do patógeno e após a realização do tratamento das mesmas com a suspensão de esporos e filtrados de cultura de *Trichoderma asperellum* são apresentados na Tabela 1. É importante ressaltar que, no tratamento testemunha com a inoculação somente do patógeno, houve a estagnação total no incremento da altura das plantas, demonstrando o efeito negativo do mesmo no crescimento das mesmas. Por outro lado, para o diâmetro não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 1 - Efeito dos tratamentos de controle biológico e de *Lasiodiplodia theobromae*, no crescimento das mudas de noqueira-pecã, através das variáveis: comprimento da parte aérea (cm) e diâmetro (mm), avaliada 90 dias após a inoculação do patógeno.

Tratamentos	Altura		Média	Diâmetro		Média
	PP	AP		PP	AP	
<i>Trichoderma asperellum</i> (Qt)	20,77 a*	21,37 a	21,07	4,07 ^{ns}	3,74 ^{ns}	3,91
<i>Trichoderma asperellum</i> (TR1)	21,85 a	23,05 a	22,45	3,81	3,93	3,87
Filtrado 1	21,10 a	22,20 a	21,65	3,76	3,54	3,65
Filtrado 2	21,25 a	22,40 a	21,82	3,27	3,81	3,54
Testemunha	18,42 b	22,07 a	20,24	3,86	3,67	3,76
Média	20,68	22,22		3,75	3,74	
CV (%)	10,82			11,61		

Onde: PP, presença do patógeno; AP ausência do patógeno; ns: não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Na tabela 2 são apresentados os resultados referentes à massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR) avaliados 90 dias após a inoculação do patógeno. Para a MFPA não houve diferença estatística entre os tratamentos avaliados, porém numericamente, as plantas apresentaram maior MFPA para o tratamento sem a inoculação do patógeno, exceto para o tratamento com filtrado 2.

Quando avaliada a MFR, pode-se perceber que na presença do patógeno, nenhum tratamento se destaca, no entanto, todos os tratamentos com o controle biológico apresentaram leve incremento na MFR em relação a testemunha apenas inoculada com o patógeno. Contudo, quando não havia a influência do patógeno alguns tratamentos induziram maior desenvolvimento das raízes, diferindo estatisticamente, como é o caso dos tratamentos Qt, TR1, filtrado 1, com incremento de 8,47, 9,19, 15,77% respectivamente em relação a testemunha. Porém, quando se compara a presença e ausência do patógeno, verifica-se que para todos os tratamentos a presença do patógeno causou efeito negativo, diferenciando-se estatisticamente dos tratamentos sem o patógeno.

Tabela 2 - Efeito dos tratamentos de controle biológico e de *Lasiodiplodia theobromae*, na qualidade final das mudas de noqueira-pecã, avaliada por meio da massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR).

Tratamentos	MFPA		Média	MFR		Média
	PP	AP		PP	AP	
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	6,96 ^{ns}	7,05 ^{ns}	7,00	18,89 Ba*	22,29 Aa	20,59
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	6,92	7,58	7,25	17,98 Ba	22,44 Aa	20,21
Filtrado 1	6,78	6,98	6,88	19,08 Ba	23,79 Aa	21,44
Filtrado 2	7,73	7,38	7,55	18,15 Ba	20,76 Ab	19,45
Testemunha	7,04	7,00	7,02	17,46 Ba	20,55 Ab	19,00
Média	7,09	7,20		18,31	21,97	
CV (%)	8,12			10,79		

ns: não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Na Tabela 3, pode-se verificar que a MSPA seguiu a mesma tendência constatada na MFPA, ou seja, não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos com as suspensões de esporos ou com os filtrados de cultura e entre a presença e ausência do patógeno. Para a MSR, houve diferença estatística entre os tratamentos de controle biológico e a inoculação ou não do patógeno, com interação entre os fatores. Na presença do patógeno o tratamento mais promissor foi com a suspensão de esporos do isolado de *T. asperellum* TR1, enquanto que na ausência do patógeno a maior média de MSR foi do filtrado 1, que não se diferenciou do tratamento com as suspensões de esporos dos isolados TR1 e Qt.

Tabela 3 - Efeito dos tratamentos de controle biológico e de *Lasiodiplodia theobromae*, na qualidade final das mudas de noqueira-pecã, avaliadas por meio da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR).

Tratamentos	MSPA		Média	MSR		Média
	PP	AP		PP	AP	
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	3,21 ^{ns}	3,37 ^{ns}	3,29	7,49 Bb*	11,44 Aa	9,47
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	3,48	3,92	3,70	8,17 Ba	10,70 Aa	9,44
Filtrado 1	3,22	3,72	3,46	7,19 Bb	12,95 Aa	10,07
Filtrado 2	4,07	3,60	3,84	6,77 Ab	8,03 Ab	7,40
Testemunha	3,18	3,59	3,38	6,80 Ab	8,45 Ab	7,62
Média	3,43	3,64		7,28	10,31	
CV (%)	17,17			15,65		

ns: não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. *Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Nas avaliações sobre a manifestação de sintomas realizadas aos 15 e 30 dias seguintes a inoculação de *L. theobromae*, não foram observados sintomas que pudessem ser associados a ação do patógeno na planta. Contudo, na avaliação feita 45 dias após a inoculação do patógeno, foram observados os primeiros sintomas relacionados ao cancro do tronco. Os sintomas consistiram em fendilhamento longitudinal e cancro, algumas plantas apresentavam os dois sintomas simultaneamente.

Os sintomas observados aos 90 dias foram semelhantes aos constatados aos 45 dias, com fendilhamentos longitudinais e cancras, no entanto nesse momento os sintomas ocupavam maiores proporções nos tecidos das plantas, sendo que havia uma planta morta. Nessa avaliação foi observada a presença de fendilhamentos longitudinais em todas as repetições do tratamento testemunha inoculada com o patógeno, ou seja, a incidência da doença foi de 100% (tabela 4). Além disso, esse tratamento foi o que apresentou a maior nota de severidade 3,50, com uma planta morta no final do experimento.

Os demais tratamentos apresentaram incidência que variou 75% a 50% e houve uma diminuição acentuada da severidade dos sintomas com notas iguais ou menores que 1,50. O tratamento mais promissor para o controle de *Lasiodiplodia theobromae* aplicado via parte aérea foi o com a suspensão de esporos do isolado de *T. asperellum* Qt, com incidência de 50% e severidade de 0,75. Todos os tratamentos não inoculados com *L. theobromae* não apresentaram mudas sintomáticas e, portanto, os sintomas nos tratamentos inoculados são referentes à aplicação proposital do patógeno e não a presença deste de forma latente nas plantas. Nas plantas em que se aplicou somente as suspensões de esporos de *T. asperellum* spp. ou os filtrados de cultura, não houve nenhum sintoma que pudesse ser relacionado a efeito fitotóxico causado pela aplicação dos tratamentos.

Tabela 4 - Incidência (%) e notas de severidade da doença, relacionados ao teste de antagonismo *in vivo* 90 dias após a inoculação do patógeno.

Tratamentos	Incidência	Nota
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	50,00 c*	0,75 b
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	75,00 b	1,50 b
Filtrado 1	50,00 c	0,85 b
Filtrado 2	75,00 b	1,25 b
Testemunha	100,00 a	3,50 a
CV (%)	21,38	24,30

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

6.3.2 Experimento 2 - Aplicação dos tratamentos no substrato

Na tabela 5, podemos observar os resultados das avaliações realizadas aos 90 dias após a inoculação do patógeno, para o comprimento da parte aérea e diâmetro do caule, pode-se observar que os tratamentos interferiram de forma diferente nessas variáveis. As plantas do tratamento testemunha, tanto com a inoculação ou sem a inoculação do patógeno, em geral, apresentaram comprimento da parte aérea significativamente menor que os demais tratamentos, demonstrando que as suspensões de esporos e os filtrados de cultura de *T. asperellum* foram capazes de induzir o crescimento das plantas de noqueira-pecã.

O tratamento que se mostrou mais promissor foi o com a suspensão de esporos do isolado TR1, em que as plantas apresentaram maior comprimento de parte aérea (21,47 cm), tanto na presença quanto na ausência do patógeno (22,12 cm). A inoculação do patógeno não prejudicou o incremento das plantas em diâmetro de caule, mantendo-se estatisticamente semelhante aos tratamentos na ausência do patógeno. Na presença do patógeno, os tratamentos com as suspensões de esporos de *T. asperellum* e com os filtrados de cultura interferiram no crescimento das plantas, sendo que o tratamento TR1 (5,01 mm) demonstrou plantas com diâmetro de caule estatisticamente superior aos demais.

Tabela 5- Efeito dos tratamentos de controle biológico e de *Lasiodiplodia theobromae*, no crescimento das mudas de noqueira-pecã, através das variáveis: comprimento da parte aérea (cm) e diâmetro (mm), avaliada 90 dias após a inoculação do patógeno.

Tratamentos	Comprimento da parte aérea (cm)		Média	Diâmetro (mm)		Média
	PP	AP		PP	AP	
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	19,97 Aa*	19,40 Ab	19,68	4,59 Ab	4,19 Aa	4,39
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	21,47 Aa	22,12 Aa	21,79	5,01 Aa	4,51 Aa	4,76
Filtrado 1	19,90 Aa	19,60 Ab	19,75	4,35 Ac	4,16 Aa	4,25
Filtrado 2	19,81 Aa	20,88 Aa	20,34	4,54 Ab	4,40 Aa	4,47
Testemunha	18,65 Ab	19,62 Ab	19,13	4,65 Ab	4,15 Aa	4,15
Média	19,96	20,32		4,49	4,28	
CV (%)	5,5			9,61		

Onde: PP, presença do patógeno; AP ausência do patógeno; *Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro; ns: não significativo. CV: Coeficiente de Variação.

Conforme observados na Tabela 6, para a massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca da raiz (MFR) houve diferença estatística entre os tratamentos, ocorrendo interação entre os fatores. Os resultados demonstraram que o patógeno interferiu na MFPA para alguns tratamentos, como é o caso do tratamento com a suspensão de esporos do isolado de *T. asperellum* TR1 e com o filtrado 2, no entanto, o tratamento TR1 na presença do patógeno foi o melhor para o acúmulo da MFPA quando comparado aos demais. Na ausência do patógeno dois tratamentos se destacaram no acúmulo de MFPA, sendo eles o TR1 e o Filtrado 2. Tanto na presença, quanto na ausência do patógeno a testemunha, foi o tratamento que apresentou a menor MFPA, demonstrando o efeito positivo dos tratamentos do substrato com as suspensões de esporos de *T. asperellum* e com os filtrados de cultura.

Na MFR também houve diferença estatística entre os tratamentos, com interação entre os fatores. Novamente, o tratamento com o isolado de *T. asperellum* TR1 se destacou, estando entre os maiores valores de MFR, na presença e na ausência do patógeno. Na ausência do patógeno os tratamentos com a suspensão de esporos do isolado de *T. asperellum* Qt e filtrado 2 também mostraram potencial de induzir do crescimento das raízes. As testemunhas, na presença e na ausência do patógeno, apresentaram os menores valores de MFR, sendo que a inoculação do patógeno no caule das plantas de noqueira-pecã sem a aplicação dos tratamentos de controle biológico no substrato, gerou plantas com menor acúmulo de MFR.

Tabela 6 - Efeito dos tratamentos de controle biológico e de *Lasiodiplodia theobromae*, na qualidade final das mudas de noqueira-pecã, através das variáveis: massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR).

Tratamentos	MFPA		Média	MFR		Média
	PP	AP		PP	AP	
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	7,04 Ab*	6,76 Ab	6,90	24,61 Ab	24,35 Aa	24,48
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	9,73 Ba	12,12 Aa	10,92	31,10 Aa	29,76 Aa	30,43
Filtrado 1	6,55 Ab	5,87 Ab	6,21	19,13 Ab	19,79 Ab	19,46
Filtrado 2	5,54 Bb	9,13 Aa	7,33	23,17 Bb	30,33 Aa	26,75
Testemunha	5,46 Ab	4,97 Ab	5,21	12,69 Bc	19,19 Ab	15,94
Média	6,86	7,77		22,14	24,68	
CV (%)	14,95			15,41		

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

Para a MSPA e MSR houve diferença entre os tratamentos e entre a inoculação ou não com o patógeno, havendo interação entre os fatores (Tabela 7). Para essas variáveis foi possível observar que, para a maior parte dos tratamentos, quando não foi inoculado o patógeno, o acúmulo de MSPA e MSR foram superiores aos inoculados com o patógeno. A incorporação da suspensão de esporos dos isolados de *T. asperellum* no substrato, induziu maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas de noqueira-pecã, como pode ser evidenciado pela análise da MSR. A exceção foi o tratamento com o Filtrado 2 na ausência do patógeno, que apresentou o maior valor para essa variável, mas sem se diferenciar dos tratamentos com a suspensão de esporos dos isolados de *T. asperellum*.

Tabela 7 - Efeito dos tratamentos de controle biológico e de *Lasiodiplodia theobromae*, na qualidade final das mudas de noqueira-pecã, através das variáveis: massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR).

Tratamentos	MSPA		Média	MSR		Média
	PP	AP		PP	AP	
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	2,94 Ba*	4,96 Aa	3,95	9,86 Aa	11,14 Aa	10,50
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	3,55 Aa	3,98 Aa	3,75	10,99 Aa	11,06 Aa	11,02
Filtrado 1	2,36 Aa	2,54 Ab	2,45	5,84 Ab	5,56 Ab	5,70
Filtrado 2	2,34 Ba	3,78 Aa	3,06	8,16 Bb	11,78 Aa	9,97
Testemunha	2,24 Aa	1,82 Ab	2,03	6,90 Ab	5,08 Ab	5,99
Média	2,69	3,42		8,35	8,92	
CV (%)	16,37			12,62		

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

Nas duas avaliações iniciais realizadas para a observação de sintomas aos 15 e 30 dias após a inoculação do patógeno, não foram observados sintomas que pudessem ser associados a doença cancro do tronco. Somente na avaliação seguinte, 45 dias após a inoculação do patógeno, foram observados os primeiros sintomas, caracterizados por fendilamentos e cancos próximos ao local da inoculação. Aos 90 dias após a inoculação, os sintomas eram similares aos relatados aos 45 dias após a inoculação, porém um número maior de plantas apresentava sintomas, e os mesmos, visualmente, ocupavam maior parte do tecido das plantas sintomáticas. Nas plantas não inoculadas com o patógeno, não foi observado nenhum sintoma de fendilhamento ou de cancro que pudessem ser associados ao patógeno, que poderia estar latente na planta. Somente foi observada uma cicatriz no local do ferimento, resultante do

processo de cicatrização. Devido à ausência de plantas doentes nesses tratamentos, optou-se por não os adicionar esta variável na análise estatística.

Na tabela 8 é possível constatar que quando houve inoculação do patógeno e nenhum tratamento de controle biológico, todas as plantas foram sintomáticas alcançando a incidência de 100%, e severidade de 3,25. Nenhum tratamento de controle conteve totalmente a presença de sintomas relacionados com a doença, contudo quando se utilizou a suspensão de esporos de *T. asperellum* (TR1) a incidência foi menor com 37,50% de plantas sintomáticas, e consequentemente esse tratamento também apresentou a menor severidade de 0,38. Os demais tratamentos foram intermediários com incidência variando entre 50% (Filtrado 1 e 2) e 75% (Qt) e notas entre 0,75 (Filtrado 1) e 1,37 (Qt).

Tabela 8 - Incidência (%) e notas de severidade da doença, relacionados ao teste de antagonismo *in vivo* em plantas inoculadas com *Lasiodiplodia theobromae*.

Tratamentos	Incidência (%)	Nota
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	75,00 b*	1,37 b
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	37,50 c	0,38 c
Filtrado 1	50,00 c	0,75 c
Filtrado 2	50,00 c	0,88 c
Testemunha	100,00 a	3,25 a
CV (%)	31,52	24,54

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

6.4 DISCUSSÃO

Esse trabalho foi desenvolvido com a intenção de avaliar a ação de isolados de *Trichoderma asperellum*, na forma de suspensão de esporos e de filtrados de cultura, no desenvolvimento de plantas de noqueira-pecã, bem como, analisar a ação desses tratamentos na presença do patógeno causador do cancro do tronco, *Lasiodiplodia theobromae*.

Independente da forma de aplicação dos tratamentos (parte aérea ou substrato), de modo geral, quando foi utilizado os microrganismos houve maior desenvolvimento das plantas, constatado através do aumento da massa fresca e massa seca das plantas. Azevedo et al. (2017), testou vários métodos de aplicação de *Trichoderma* spp., sendo eles: tratamento de miniestacas; incorporação de grãos de arroz colonizados ao substrato; pulverização de suspensão de esporos e; adição de suspensão de esporos ao substrato e pulverização de suspensão de esporos, concluindo que independentemente do método de inoculação, *Trichoderma* spp. apresentou

potencial para ser utilizado na promoção de desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus camaldulensis*.

O aumento da MSR e MSPA devido a utilização de *Trichoderma asperellum* foi relatada por outros autores em outras espécies. Em *Jacaranda micranta* (caroba) Amaral et al. (2017), relataram MSR de 108,70 mg e MSPA de 178,07 mg para os tratamentos com *T. asperellum* incorporados no substrato por meio de arroz previamente colonizado, enquanto que a MSR e a MSPA foram de 34,8 mg e 48,23 mg para o tratamento controle, sendo todas as variáveis analisadas 90 dias após a semeadura. O isolado de *T. asperellum* obtido de solo rizosférico de plantas adultas de noqueira-pecã, mostrou maior capacidade de promoção de crescimento das mudas, tanto nas aplicações via parte aérea, quanto incorporado ao substrato, bem como na presença e na ausência do patógeno. Esse fato pode estar relacionado com a origem do isolado e seu prévio contato com a noqueira-pecã (MAHDIZADEHNARAGHI et al., 2015).

Metabólitos produzidos por fungos do gênero *Trichoderma* já foram descritos como promotores de crescimento de plantas, por isso no presente estudo, também foi avaliada a ação dos filtrados de cultura no crescimento de plantas de noqueira-pecã, na presença e na ausência de *Lasiodiplodia theobromae*. A partir das análises da altura, diâmetro, MFPA, MFR, MSPA e MSR, verificou-se que, de forma geral, na presença do patógeno, os filtrados de cultura não foram capazes de influenciar positivamente nessas variáveis. Por outro lado, na ausência do mesmo, os filtrados de cultura mostraram-se benéficos para as variáveis: altura (incorporação no substrato), MFPA (incorporação no substrato), MFR (incorporação no substrato) e na MSR (tratamento da parte aérea da planta e do substrato).

Segundo Aguiar et al. (2015), alguns metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. promovem a multiplicação das células vegetais e, conseqüentemente, aumentam a biomassa vegetal. Um desses metabólitos é o ácido indol-3-acético, que não foi observado na constituição dos filtrados de cultura utilizados no presente estudo, porém alguma outra substância pode ter ação semelhante, como no caso dos compostos homólogos ao 2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-(6PAP) identificados nos filtrados de cultura e que podem atuar melhorando a solubilidade de nutrientes (Capítulo I), gerando benefícios no crescimento das mudas de noqueira-pecã tratadas com os mesmos (SOLDAN et al., 2018).

A incorporação dos filtrados de cultura no substrato mostrou-se a forma mais eficaz de aplicação dos mesmos, esse fato pode estar ligado a própria natureza de *T. asperellum*. Pois sendo um fungo de solo, as moléculas produzidas por ele podem ter maior efetividade nesse

ambiente, devido a menor variação de temperatura e umidade, e por este ambiente não apresentar a incidência de radiação solar direta que pode degradar alguns compostos.

A possibilidade de *Trichoderma* spp. ser utilizado na parte aérea, com o intuito de pré-colonizar os locais onde podem ocorrer ferimentos, evitando a colonização desses locais por patógenos deve ser considerada. No presente estudo, percebeu-se que a aplicação de biocontroles na parte aérea, em geral, diminui a incidência e a nota de severidade da doença cancro do tronco, mostrando o potencial dos tratamentos em afetar o patógeno. Conforme Meyer et al. (2019), entre as vantagens de *Trichoderma* está a capacidade do antagonista colonizar a superfície dos ferimentos, inclusive os causados pela poda, penetrando de 1-2 cm no interior dos tecidos e impedindo a entrada de patógenos associados a doenças de tronco. Um exemplo de controle de patógenos, que penetram via ferimentos em plantas, como basiodiomiceto *Chondrostereum purpureum* associado a doença prateada em frutíferas, cujo principal sintoma é a colonização e a obstrução do sistema vascular das plantas (SANHUEZA; BARTNICKI, 2019).

Outra possibilidade de aplicação de *Trichoderma* spp., é a incorporação do mesmo ao substrato de plantio. Na presente pesquisa, esse método de aplicação demonstrou resultados mais consistentes na diminuição, da incidência e da severidade do cancro do tronco em mudas de noqueira-pecã. Apesar de nesse experimento as plantas serem menores e, portanto, mais suscetíveis a doenças do que no experimento com tratamento via parte aérea. A incorporação de espécies de *Trichoderma* no substrato visando o controle de doenças foi explorada por alguns autores. Borges et al. (2018), testaram o efeito de *T. asperellum* e *T. harzianum* no controle de *Lasiodyplodia theobromae*, agente causal do cancro em Teca (*Tectona grandis* Linn, F.). Os autores relataram que *T. asperellum* controlou em até 100% a incidência de cancro nas plantas, dependendo do clone com que foi combinado.

Por outro lado, Santos et al. (2016), trabalharam com diferentes espécies de *Trichoderma* no controle de *Dactylonectria macrodidyma*, causador do pé preto em videira (*Vitis vinifera* L.). Os autores umedeceram o substrato com os agentes de controle, 14 dias antes da inoculação do patógeno. Na avaliação final, os autores relataram que as plantas que cresceram no substrato contendo *Trichoderma* spp., mesmo com a presença do patógeno no substrato, apresentaram menos sintomas da doença, do que plantas do tratamento controle positivo, com o substrato infestado apenas com o patógeno.

Brito et al. (2020), estudaram a ação de diferentes espécies de *Trichoderma* isoladas de solo rizosférico de mangueira (*Mangifera indica* L.), no controle de *Ceratocystis fimbriata*. Esse patógeno causa uma série de sintomas nas plantas, como escurecimento e murcha das

folhas, exsudação de goma do tronco, necrose dos tecidos internos e externos do caule, e podridão de raízes. Entre os isolados de *Trichoderma* obtidos, estava *T. asperelloides*, que incorporado ao solo por meio de suspensão de 10^6 conídios/mL, reduziu a podridão de raízes causada pelo patógeno. Remedier (2017) comenta que a eficiência do uso de *Trichoderma* está diretamente relacionado a época de aplicação do biocontrolador, recomendando a aplicação preventiva, como a que foi realizada na presente pesquisa.

No entanto, a aplicação de isolados vivos de *Trichoderma*, ou seja, os esporos do mesmo, apresenta algumas limitações, como efeitos variáveis quando as condições ambientais ou as culturas alvo são alteradas; os efeitos, às vezes, não são proporcionais às doses; a viabilidade do inóculo depende das condições de armazenamento e apresentam curto prazo de validade; a eficácia principalmente como tratamentos preventivos (WOO et al., 2014). Por isso na presente pesquisa, os metabólitos fúngicos na forma de filtrados de cultura foram utilizados como alternativa a utilização do microrganismo vivo.

Os filtrados de cultura foram eficientes no controle do cancro do tronco em mudas de nogueira-pecã, com efeitos semelhantes do que nos tratamentos em que foram usados os esporos de *T. asperellum*, sendo importante salientar que antes da utilização dos filtrados de cultura, os mesmos passaram por um período de armazenamento de doze meses e que mesmo assim, mantiveram a capacidade de controlar o fitopatógeno e induzir maior crescimento de mudas de nogueira-pecã em alguns tratamentos.

A ação dos metabólitos de *Trichoderma* na redução da severidade de doenças já foi relatada anteriormente. Moutassem et al. (2020) testaram o efeito de metabólitos de diferentes espécies de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium oxysporum*, causador de murcha em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), para tanto as plântulas recém germinadas foram colocadas em contato com os metabólitos e novamente aspergidas no momento do transplante. Os metabólitos de *Trichoderma* spp. reduziram a gravidade da doença entre 35,01% e 56,94% na comparação com o controle positivo constituído apenas pela presença do patógeno.

Fungos do gênero *Trichoderma* produzem muitos metabólitos que são biologicamente ativos e que podem afetar fitopatógenos, esse mecanismo de ação é chamado de antibiose (SHARMA et al., 2017). Esses metabólitos podem causar efeito antimicrobiano direto ou defesa indireta, estimulando as defesas da planta hospedeira ou induzindo maior crescimento, diminuindo a suscetibilidade da planta a patógenos (VINALE et al., 2012).

6.5 CONCLUSÃO

Os dois isolados de *Trichoderma asperellum* e os dois filtrados de cultura estimularam o crescimento inicial de plantas de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), diminuíram a incidência e a severidade da doença cancro do tronco, independente da forma de aplicação.

6.6 REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J. et al. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**. v. 25, p. 1–10, Dec. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3767/003158510X524150>>. Acesso em: 10 dez. 2019.
- AGUIAR A. R. et al. Efeito de metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o índice mitótico em células das pontas de raízes de *Allium cepa*. **Bioscience Journal**.v. 31, n. 3,p. 934-940, may/june 2015. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/23292/16484>. Acesso em: 15 nov. 2020.
- AMARAL P.P. et al. Promotores de crescimento na propagação de caroba. **Pesquisa florestal brasileira**.v. 37, n. 90, p. 149-157, abr./jun. 2017. Disponível em:<http://dx.doi.org/10.4336/2017.pfb.37.90.1402>. Acesso em: 15 nov. 2020.
- AZEVEDO, G. B. de et al. Efeito de *Trichoderma* spp. no crescimento de mudas clonais de *Eucalyptus camaldulensis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 45, n. 114, p. 343-352, jun. 2017. Disponível em:<<dx.doi.org/10.18671/scifor.v45n114.10>>. Acesso em: 15 jun. 2020.
- BORGES, R.C.F. et al. Biocontrol of teak canker caused by *Lasiodiplodia theobromae*. **Revista Árvore**. v. 42, n.3, Sep. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-67622018000300203&script=sci_arttext>. Acesso em: 15 Nov. 2018.
- BRITO, R. A. S. et al. *Trichoderma* species show biocontrol potential against *Ceratocystis* wilt in mango plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 158, n. 3, p. 781-788, Aug. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10658-020-02095-6>>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, dez. 2011. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-0542011000600001&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 15 set. 2019.
- JUNGES, E. et al. (2018) Bioproducts from *Trichoderma harzianum* as inducer of resistance to anthracnose in beans. In: *Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos*.
- LUO, Y. et al. Understanding the Process of Latent Infection of Canker-Causing Pathogens in Stone Fruit and Nut Crops in California. **Plant Disease**, v. 103, n. 9, p. 2374–2384, 11 abr.

2019. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-11-18-1963-RE>> Acesso em: 15 nov. 2019. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1963-RE>.

MAHDIZADEHNARAGHI, R. et al. Biological control of garlic (*Allium*) whiterot disease using antagonistic fungi-based bioformulations. **Journal of Plant Protection Research**, v. 55, n.2, p. 136–141, mar. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/jppr-2015-0017>>. Acesso em: 18 jan. de 2020.

MEDEIROS, F.H.V.; SILVA, J.C.P. da; PASCHOLATI, S.F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, A.M.; BERGAMIN FILHO, A., Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 5ed. Ouro Fino MG: Agronômica Ceres, 573 pg. 2018.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; DA SILVA, J. C. *Trichoderma*: uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 538 p. 1ª ed. 2019.

MOUTASSEM, D. et al. Efficiency of secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Fusarium* wilt in chickpea. **Journal of Crop Protection**, v. 9, n. 2, p. 217-231, 2020. Disponível em: <<https://jcp.modares.ac.ir/article-3-24941-en.pdf>>. Acesso em: 18 nov. de 2020.

O'BRIEN P.A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, p. 293-304, mar. 2017. Disponível em: 10.1007/s13313-017-0481-4. Acesso em 10 dez. de 2020.

POLETTO, T. et al. Dormancy overcome methods in seeds of pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Revista Árvore**, v.39, n.6, p.1111-1118, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v39n6/0100-6762-rarv-39-06-1111.pdf>>. Acesso em: 18 set. de 2018.

POLETTO, T. et al. First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, p. 1016-1016, 2016. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN>>. Acesso em 18 de out. de 2018. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN>.

REMEDIER: Eco-friendly solution against soil-borne diseases. Milan: Isagro, 2017. Disponível em: <<https://www.isagro.com/static/upload/31-/31-remedier.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2020.

RODRIGUES, G.S.; et al. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da Murcha de *Ceratocystis* em cacauero. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, p.72-78, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/sp/v44n1/0100-5405-sp-44-1-0072.pdf>. Acesso em: Acesso em:22 nov. de 2020.

ROLIM, J. M. et al. First report of stem canker caused by *Neofusicoccum parvum* and *Pseudofusicoccum kimberleyense* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, 16 Sep 2020. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-01-20-0082-PDN>>. Acesso em: 26 nov. 2020. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0082-PDN>

SAKALIDIS, M.L. et al. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. **European Journal of Plant Pathology**. v. 130,

p. 379–391, feb. 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-011-9760-z>>. Acesso em: 18 nov. de 2019.

SANHUEZA, R. S. V.; BARTNICKI, V.A. Uso do *Trichoderma* na cultura da maçã. In: *Trichoderma: uso na agricultura*. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 538 p.

SANTOS R. F. dos et al. *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**. v. 55, n. 2, p. 293–300, Jul. 2016. Disponível em: <[10.14601/Phytopathol_Mediterr-18048](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18048)>. Acesso em: 10 jun. de 2019.

SHARMA, V.; SALWAN, R.; SHARMA, P. N. The comparative mechanistic aspect of *Trichoderma* and Probiotics: Scope for future research. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 100, p. 84-96, dec. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.07.005>>. Acesso em: 18 jun. de 2020.

SOLDAN A. et al. Development of forestry species inoculated with *Trichoderma* spp. Fertilized with rock phosphate. **Floresta e Ambiente**. v. 25, n. 4, p. 1-8, sep. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2179-80872018000400121&script=sci_arttext>. Acesso em: 18 jun. de 2020.

TREMACOLDI, C. R. et al. Cancro em mogno africano no estado do Pará. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 74, p. 221-225, jun. 2009. Disponível em: <<https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/415/306>>. Acesso em: 18 jun. de 2018.

REMEDIER, **Eco-friendly against soil-borne diseases**. Milan: Isagro, 2017. Disponível em: <<https://www.isagro.com/static/upload/31-/31-remedier.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

VINALE, F. et al. *Trichoderma* Secondary Metabolites that Affect Plant Metabolism. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 11, Nov. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1934578X1200701133>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

WOO, S. L. et al. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, n. 8, p. 71–126, Jul. 2014. Disponível em: DOI: 10.2174/1874437001408010071. Acesso em: 25 jun. 2020.

7 CAPÍTULO V: AÇÃO *in vivo* DE *Trichoderma asperellum* E FILTRADOS DE CULTURA SOBRE *Fusarium equiseti*

O controle biológico de doenças de plantas é utilizado como alternativa ao uso de produtos químicos ou como complemento a esses, pois além de ser menos tóxico ao meio ambiente e seres vivos, tem se mostrado mais eficiente no manejo de patógenos do solo, como fungos do gênero *Fusarium* spp.. Dentre as doenças que acometem a noqueira-pecã está a podridão de raízes, causada por diferentes espécies de *Fusarium* spp., dentre elas *F. equiseti*. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma asperellum* e de filtrados de cultura no controle de *F. equiseti in vivo* e na promoção do crescimento de mudas de noqueira-pecã. Para tanto, foram realizados dois ensaios, conduzidos em casa de vegetação. No primeiro, 14 dias antes da instalação do experimento os tratamentos de controle biológico, foram incorporados ao substrato de cultivo, e no momento da instalação do experimento foi incorporado *F. equiseti* ao substrato, por meio de grãos de milho previamente colonizados com o patógeno. No segundo experimento, as sementes de noqueira-pecã foram microbiolizadas com os tratamentos e *F. equiseti* foi incorporado ao substrato como mencionado anteriormente. Foram avaliados os seguintes parâmetros: emergência, comprimento da parte aérea, diâmetro, massa fresca da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e severidade de doença. A comparação das médias foi pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com o software SISVAR 5.3. Nos dois ensaios, quando se utilizou o biocontrole, houve aumento da emergência de plântulas, aumento do comprimento da parte aérea e diâmetro, maior acúmulo de massa fresca da parte aérea, massa fresca radicular, massa seca da parte aérea, massa seca radicular. Os tratamentos em que o controle biológico foi incorporado ao substrato através da suspensão de esporos resultaram em menor severidade de doença, já por microbiolização o melhor resultado foi encontrado utilizando os filtrados de cultura. De maneira geral, os tratamentos de controle biológico incorporados ao substrato ou aplicados nas sementes, atuaram promovendo a qualidade das mudas e diminuíram a severidade da podridão de raízes em noqueira-pecã.

Palavras-chave: podridão de raízes. Microbiolização. Promoção de crescimento. Severidade da doença.

In vivo* ACTION OF *Trichoderma asperellum* AND CULTURE FILTERS ON *Fusarium equiseti

The biological control of plant diseases is used as an alternative to the use of chemicals or as a complement to these, as in addition to being less toxic to the environment and living beings, it has been shown to be more efficient in the management of soil pathogens, such as genus *Fusarium* spp.. Among the diseases that affect the pecan tree is root rot, caused by different species of *Fusarium* spp., among them *F. equiseti*. Thus, the objective of this work was to evaluate the ability of *Trichoderma asperellum* isolates and culture filtrates to control *F. equiseti in vivo* and to promote the growth of pecan seedlings. For this, two tests were carried out, conducted in a greenhouse. In the first, 14 days before the installation of the experiment, biological control treatments were incorporated into the cultivation substrate, and at the time of installation of the experiment, *F. equiseti* was incorporated into the substrate, by means of corn grains previously colonized with the pathogen. In the second experiment, the pecan seeds were microbiolized with the treatments and *F. equiseti* was incorporated into the substrate as mentioned previously. The following parameters were evaluated: emergence, shoot length, diameter, shoot and root fresh weight, shoot and root dry weight and disease severity. The comparison of means was performed using the Skott-Knott test at a 5% probability of error,

using the SISVAR 5.3 software. In both tests, when biocontrol was used, there was an increase in seedling emergence, an increase in shoot length and diameter, greater accumulation of fresh shoot weight, fresh root weight, dry shoot weight, dry root weight. The treatments in which the biological control was incorporated into the substrate through the suspension of spores resulted in less disease severity, since by microbiolization the best result was found using the culture filtrates. In general, the biological control treatments incorporated into the substrate or applied to the seeds, acted to promote the quality of the seedlings and decreased the severity of root rot in pecan.

Keywords: root rot. Microbiolization. Growth promotion. Disease severity.

7.1 INTRODUÇÃO

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], é uma espécie de plantas pertencente à família Jugladiaceae, cultivada em muitos países, dentre eles o Brasil. No País, o maior produtor é o Rio Grande do Sul, responsável por 41,48% da produção (IBGE, 2018). As doenças causadas por fungos estão entre as principais causas de perdas de produtividade e qualidade das nozes. A cultura da noqueira-pecã pode ser afetada por patógenos fúngicos desde o momento da formação da muda, ainda no viveiro, como é o caso da podridão de raízes, causada por espécies do gênero *Fusarium*, dentre elas *F. equiseti*. A doença podridão de raízes, relatada por Lazarotto et al., (2014), em noqueira-pecã tem como sintomas: escurecimento e degradação da raiz, que por sua vez causa sintomas reflexos como a murcha da parte aérea e necrose das folhas. No estudo a autora relata que no teste de patogenicidade, o percentual de plântulas afetadas pelo patógeno chegou a 40%.

Fungos do gênero *Fusarium* podem sobreviver no solo por muitos anos, sob condições ambientais adversas, principalmente através de estruturas de resistência chamadas de clamidósporos, e essa característica esse fato dificulta o controle do patógeno (AGRIOS, 2005). O controle de fungos que podem sobreviver no solo era realizado por meio da fumigação com produtos químicos, contudo devido a pouca eficiência destes e às preocupações relacionadas à segurança alimentar e a poluição ambiental a utilização destes produtos está reduzindo (MAO et al., 2012).

Dessa maneira, outras formas de controle devem ser estudadas, entre elas pode-se destacar o controle biológico. Entre os microrganismos estudados como agentes de controle biológico estão os fungos do gênero *Trichoderma* spp., que demonstram eficiência no controle de fungos que podem sobreviver no solo. El Komy et al. (2015), já comprovaram que *Trichoderma* spp. foi eficiente no controle de *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Botrytis*. A aplicação de *Trichoderma* spp. também diminui a severidade da podridão do colo em pêra (*Pyrus*

communis) causada por *Phytophthora cactorum*, além de não apresentar diferença em relação ao controle químico no controle da doença (SANCHEZ, 2019).

Além da utilização do microrganismo vivo, os metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. também podem ser eficientes no controle de fitopatógenos. Cong et al. (2019), estudando o efeito de filtrados de cultura de *Trichoderma pseudokoningii* no controle de *Fusarium oxysporum*, causador de murcha em pepineiro (*Cucumis sativus*) obtiveram até 31,25 % de controle da doença *in vivo*.

Apesar do amplo conhecimento dos agentes de biocontrole e, embora *Trichoderma* seja o gênero de fungos mais estudado no controle de doenças, até o momento, não existem estudos sobre *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium equiseti*, causador de podridão de raiz em noqueira-pecã. Além disso, a tendência atual é produzir noz-pecã em condições sustentáveis e ecológicas, com uso reduzido ou nulo de fungicidas sintéticos para controlar patógenos. Diante do acima exposto, o objetivo desta pesquisa foi (i) avaliar a ação de dois isolados de *Trichoderma asperellum* e dos filtrados de cultura obtidos destes no controle de *F. equiseti in vivo* (ii) avaliar os isolados de *T. asperellum* e dos filtrados de cultura obtidos destes na promoção do crescimento de mudas de noqueira-pecã.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Local de realização dos experimentos, origem e caracterização dos isolados

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi e na casa de vegetação do Departamento de Defesa Fitossanitária.

Foram utilizados dois isolados de *Trichoderma asperellum* como microrganismos antagonistas: um isolado de solo rizosférico de um pomar de plantas adultas de noqueira-pecã (29°43'29"S – 53°43'0,51"O), obtido por meio de diluição seriada até 10⁻⁴ (codificado como TR1), armazenado no herbário na Universidade Federal de Santa Maria (n° 18,372) e registrado no GenBank sob número MN082152; o outro isolado foi obtido de uma alíquota de um produto comercial, que foi plaqueada para o meio BDA (codificado como Qt), registrado no MAPA sob número URM5911, conforme descrito no Capítulo I.

Como patógeno desafiante foi utilizado um isolado causador de podridão de raízes em noqueira-pecã, *Fusarium equiseti* (28°53'54.7"S-52°01'59.9"O) que estava armazenado em

solução salina na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, codificado como UFSM – F18, cuja sequência de DNA da região do fator de alongação está depositada no GenBank sob número KF601580 (LAZAROTTO et al., 2014).

7.2.2 Origem das sementes e superação de dormência

As sementes da cultivar Barton foram obtidas de uma empresa localizada no município de Anta Gorda, logo que chegaram ao laboratório foram submetidas a uma assepsia superficial em solução de álcool 70% (v v-1) por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% (v v-1) por 1 min, lavadas com água destilada esterilizada deixadas para secar sobre papel-filtro esterilizado. As sementes foram estratificadas em areia por 90 dias em geladeira a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (POLETTTO, 2015).

7.2.3 Obtenção dos filtrados de cultura de *Trichoderma asperellum*

Para a produção dos filtrados de cultura foram realizadas fermentações dos isolados de *Trichoderma asperellum* em erlenmeyers de 250 mL de capacidade, com volume utilizado de 100 mL de meio de cultura líquido. A composição do meio de cultivo para os isolados foi: 20 g/L de Água de Maceração de Milho (AMM), 7,5 g/L de extrato de levedura, 50 g/L de sacarose, e o pH foi ajustado para 5, com o auxílio de pHmetro digital, conforme melhor condição de cultivo encontrada no Capítulo I.

Os erlenmeyers contendo o meio de cultivo foram autoclavados a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. Após o resfriamento, o meio de cultivo foi inoculado com 1 mL da suspensão de esporos dos isolados de *T. asperellum* em câmara de fluxo laminar. A suspensão foi ajustada para a concentração 10^5 para ambos os isolados. A suspensão de esporos foi obtida do crescimento dos isolados de *T. asperellum* em placas de Petri (7 dias, $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 h fotoperíodo), nas quais foi adicionada água destilada e esterilizada e realizada a raspagem da superfície da colônia com a alça de Drigalski, seguida de determinação da concentração de esporos em câmara de Neubauer e posterior ajuste.

Após acrescentar a suspensão ao meio, os erlenmeyers foram alocados em câmara incubadora com agitação orbital, sob velocidade de agitação de 100 rpm. Transcorridas 96 h de incubação foi efetuada a separação da biomassa da parte líquida, executada por filtração em membrana milipore 12 micras e em seguida em 0,22 micras para assegurar que o filtrado de cultura estivesse livre de esporos fúngicos. Para a filtração foi utilizado um sistema com

membranas acopladas a uma bomba de vácuo para reduzir o tempo da filtração. Os filtrados de cultura foram congelados para posterior emprego nos bioensaios, adaptado da metodologia de Junges et al. (2018).

7.2.4 Produção de inóculo do patógeno

A produção de inóculo de *Fusarium equiseti*, foi por meio da inoculação deste em grãos de milho, conforme metodologia adaptada de Klingelfuss (2007). Para tanto, os grãos de milho foram embebidos em água à temperatura ambiente durante 8 h, após o excesso de água foi descartado e 80 g de grãos de milho foram colocados em frascos de vidro de 100 mL, estes foram esterilizados em autoclave (durante 40 min, duas vezes, em um intervalo de 24 h). Após o resfriamento, para cada frasco foram transferidos cinco discos de meio de cultura de 6 mm de diâmetro, com micélio de *F. equiseti*. Para a testemunha foram colocados discos de BDA com a mesma dimensão, contudo esses não estavam colonizados pelo patógeno. Os frascos foram incubados a 25 °C, com 12 h de luz, por 15 dias.

7.2.5 Incorporação dos isolados de *Trichoderma asperellum* e de filtrados de cultura ao substrato para controle de *Fusarium equiseti*

Nesse experimento, a avaliação do controle do patógeno foi por meio da incorporação dos antagonistas e dos filtrados de cultura ao substrato. Para tanto, o substrato de cultivo de cada bandeja plástica (21 L de capacidade) foi umedecido com 200 mL de uma suspensão de esporos (10^5) (SANTOS et al., 2016) e com os filtrados de cultura (filtrado 1 e filtrado 2) na mesma proporção, 14 dias antes da semeadura. Tratamentos testemunha também foram montados: um apenas com o patógeno, outros sem o patógeno mas com as suspensões de esporos e filtrados de cultura e um tratamento sem patógeno e sem os tratamentos de controle biológico (testemunha absoluta).

7.2.6 Microbiolização de sementes para o controle de *Fusarium equiseti*

Para a composição dos tratamentos do teste de controle *in vivo*, foram utilizados dois isolados de *Trichoderma asperellum* (TR1 e Qt) e dois filtrados de cultura (filtrado 1 e filtrado 2) com potencial antagonista, previamente testados *in vitro* (Capítulo II). Após a finalização do processo de a estratificação, aos 90 dias, as sementes foram colocadas em contato com os

tratamentos por 48 h (incubação a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h), que se constituíram do contato das sementes com a suspensão de esporos de *T. asperellum* (1×10^5) e com os filtrados de cultura (filtrado 1 e filtrado 2). Para a testemunha foi realizado o mesmo procedimento, porém estas foram colocadas em contato com água. Em seguida procedeu-se a semeadura.

7.2.7 Condução e avaliação dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos em bandejas plásticas com 21 L de capacidade (45x28x13 cm), com orifícios na parte inferior, e estas foram preenchidas com substrato comercial Mecplant® (composto por casca de Pinus, vermiculita, e macro nutrientes), até a metade da capacidade, após o inóculo de 160 g de milho e estruturas do patógeno foram misturados ao substrato. Em seguida, as sementes foram divididas em quatro repetições de 5 sementes por tratamento, totalizando 20 sementes, que foram cobertas por uma camada de 10 cm de substrato. O material foi mantido em casa de vegetação com temperatura entre 22 e 28 °C e com irrigação diária através de um sistema de microtubos. Cada tratamento recebeu 100 mL de água por dia, sendo esta quantidade dividida em quatro irrigações de 25 mL.

A emergência foi avaliada no 15º e 30º dia, computando-se o número de plantas emergidas, os resultados foram expressos em percentagem. Na última avaliação as sementes não germinadas foram observadas quanto a presença de sintomas e sinais relacionados ao patógeno. Aos 45, 60, 75 e 90 dias depois da semeadura, as plantas foram observadas quanto a presença de sintomas na parte aérea. Ao final do período de avaliação (90 dias após a instalação do experimento) determinou-se a incidência da doença em percentagem, e a através da avaliação do percentual do sistema radicular afetado. Em seguida, para cada muda sintomática foi atribuída uma nota.

Para tanto, as raízes foram lavadas em água e observadas quanto a manifestação de sintomas de podridão, escurecimento e presença de raízes secundárias. O índice de podridão radicular foi medido na escala, construída baseada no trabalho de Khan et al. (2019), com notas variando de 0 a 5; 0 = sistema radicular íntegro, com presença de raízes secundárias, 1 = 1 a 10% do sistema radicular afetado, 2 = 11 a 25% do sistema radicular afetado, 3 = 26 a 60% do sistema radicular afetado, 4 = 61 a 80% do sistema radicular afetado e 5 = 80 a 100% do sistema radicular afetado, planta com murcha ou amarelecimento da parte aérea ou folhas com necrose marginal.

Aos 45 e 90 dias foram medidos o diâmetro do colo e o comprimento da parte aérea, realizadas com o auxílio de paquímetro digital e régua milimetrada. Aos 90 dias foi determinada

a massa fresca de plantas: As plantas foram divididas em parte aérea e radicular, estas foram pesadas em balança analítica de precisão 0,01 g; e massa seca de plantas: as plantas utilizadas na determinação da massa fresca foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60 ± 3 °C até atingirem peso constante.

7.2.8 Análise estatística

Para os ensaios *in vivo* o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Verificou-se se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, no Programa BioEstat 5.0. Os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{x+0,5}$. A comparação das médias foi pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com o software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Incorporação dos tratamentos de controle biológico ao substrato para controle de *Fusarium equiseti*

Na primeira e na segunda avaliação de emergência, houve diferença estatística entre os tratamentos, havendo interação entre os fatores (tabela 1). A presença do patógeno no substrato afetou de forma negativa a emergência inicial das plântulas (15º dia) de noqueira-pecã, sendo que somente a incorporação da suspensão de esporos do isolado de *Trichoderma asperellum* (Qt) ao substrato, manteve a emergência no mesmo patamar das plantas cultivadas na ausência do patógeno. Na ausência do patógeno, o filtrado 2 foi o tratamento que induziu a maior emergência de noqueira-pecã, resultando em 58% de plântulas emergidas diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Na segunda avaliação, realizada 30 dias após a instalação do experimento, o tratamento na presença do patógeno, sem a utilização de controle biológico foi o que apresentou a menor emergência (38%), diferindo estatisticamente de quando não houve a incorporação de *Fusarium equiseti* ao substrato (50%). Os tratamentos com incorporação dos tratamentos de controle biológico ao substrato demonstraram resultados superiores de emergência comparados aos tratamentos sem a presença destes, tanto na presença quanto na ausência do patógeno. O

tratamento que resultou em maior emergência foi o filtrado 2 sem a presença do patógeno, que resultou em 82% de plântulas emergidas.

Tabela 1 - Emergência de plântulas de noqueira-pecã, em substrato tratado com suspensão de esporos e filtrados de cultura de isolados de *Trichoderma asperellum*, no 15° e 30° dia após a semeadura, na presença ou ausência de *Fusarium equiseti*.

Tratamentos	15° dia (%)		30° dia (%)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	30,00 Aa*	34,00 Ab	50,00 Bb	58,00 Ab
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	26,00 Ba	38,00 Ab	58,00 Aa	65,00 Ab
Filtrado 1	26,00 Ba	38,00 Ab	62,00 Aa	69,00 Ab
Filtrado 2	22,00 Ba	58,00 Aa	42,00 Bc	82,00 Aa
Testemunha	26,00 Ba	34,00 Ab	38,00 Bc	50,00 Ac
CV (%)	11,09		5,96	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

Na avaliação realizada 30 dias após a semeadura, além da emergência, que nesse momento havia estabilizado, também foram observadas as sementes não emergidas. Quando as mesmas foram retiradas do substrato, percebeu-se que algumas haviam iniciado o processo de germinação, contudo estas apresentaram necrose no ápice da plântula, com sinais do patógeno, que acabou causando tombamento de pré-emergência. Esse sintoma foi observado em média em 10% das sementes utilizadas nos tratamentos em que o substrato estava colonizado com o patógeno.

Transcorridos 45 dias após a instalação do experimento (Tabela 2), para o comprimento da parte aérea não houve diferença estatística entre os tratamentos. Sendo que os tratamentos com controle biológico apresentaram valores superiores de crescimento da parte aérea, tanto na presença quanto na ausência de *F. equiseti*. Para os tratamentos com ausência do patógeno, o comprimento da parte aérea variou de 12,72 cm a 17,93 cm, sem incorporação dos tratamentos de controle biológico e para o tratamento com a suspensão de esporos do isolado de *T. asperellum* (TR1), respectivamente. Na presença do patógeno o comprimento da parte aérea apresentou valores entre 12,84 cm e 16,79 cm, para as plântulas emergidas no substrato sem tratamento e substrato tratado com o filtrado 1, nessa ordem.

Tabela 2 - Efeito dos tratamentos de controle biológico de *Fusarium equiseti* no crescimento das mudas de noqueira-pecã, através das variáveis: comprimento da parte aérea e diâmetro, avaliado 45 dias após a instalação do experimento.

Tratamentos	Comprimento da parte aérea (cm)		Diâmetro (mm)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	15,25 ^{ns}	15,21 ^{ns}	2,78 ^{ns}	2,56 ^{ns}
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	15,53	17,93	2,68	2,48
Filtrado 1	16,79	16,21	2,87	2,64
Filtrado 2	16,57	16,35	3,12	2,99
Testemunha	12,84	12,72	2,59	2,35
CV (%)	13,98		8,18	

ns: não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

Não houve diferença significativa para o diâmetro nas avaliações aos 45 e 90 dias após a instalação do experimento (Tabela 2 e 3), contudo com a aplicação dos tratamentos de controle biológico, as plantas apresentaram diâmetro do caule maior em relação à testemunha não tratada. Na primeira e na segunda avaliação (45º dia) o diâmetro variou de 2,35 mm a 3,12 mm para os tratamentos ausência do patógeno sem tratamento e presença do patógeno tratadas com o filtrado 2.

Aos 90 dias após a instalação do experimento, para a variável comprimento da parte aérea os tratamentos apresentaram diferença estatística entre si, contudo, a inoculação ou não do substrato com *F. equiseti*, não interferiu nessa variável. O tratamento que se destacou, foi o com a suspensão de esporos de *T. asperellum* (TR1) na ausência do patógeno, que obteve o maior comprimento da parte aérea com 18,15 cm. Em contrapartida, as testemunhas na presença (12,84 cm) e na ausência do patógeno (12,93 cm) apresentaram valores inferiores de comprimento da parte aérea em relação aos tratamentos em que foram utilizadas as suspensões de esporos e os filtrados de cultura.

Tabela 3 - Efeito dos tratamentos de controle biológico sobre *Fusarium equiseti* no crescimento das mudas de noqueira-pecã, aferido por meio do comprimento da parte aérea e diâmetro do colo, avaliados 90 dias após a instalação do experimento.

Tratamentos	Comprimento da parte aérea (cm)		Diâmetro (mm)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	15,81 Ab*	15,21 Ab	2,78 ^{ns}	2,74 ^{ns}
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	17,80 Aa	18,15 Aa	2,83	2,83
Filtrado 1	17,43 Aa	16,25 Ab	3,02	3,06
Filtrado 2	16,57 Aa	16,87 Ab	3,12	3,10
Testemunha	12,84 Ab	12,93 Ab	2,85	2,35
CV (%)	11,97		7,08	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

ns: não significativo.

Para a massa fresca da parte aérea e massa fresca da raiz houve diferença estatística entre os tratamentos, ocorrendo interação entre os fatores. No geral, os tratamentos com incorporação dos agentes antagônicos e dos filtrados de cultura ao substrato, apresentaram valores superiores para massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), tanto na presença quanto na ausência do patógeno (Tabela 4). Verificou-se que no geral, quando houve inoculação de *F. equiseti*, a MFPA e a MFR foram menores, quando comparadas aos tratamentos não inoculados com o patógeno. Por outro lado, em alguns tratamentos é possível analisar que mesmo na presença do patógeno, os tratamentos de controle biológico mantiveram a MFPA e MFR como se o patógeno não estivesse presente, caso do tratamento com filtrado 2 (9,88 g), para a MFPA e para os tratamentos com a suspensão de esporos do isolado TR1 (23,28 g) e filtrado 2 (28,05 g), para a MFR.

Tabela 4 - Efeito dos tratamentos de controle biológico sobre *Fusarium equiseti* na qualidade final das mudas de noqueira-pecã, aferidas por meio da massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR).

Tratamentos	MFPA (g)		MFR (g)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	5,59 Bb*	16,21 Aa	15,76 Ab	21,05 Ab
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	5,92 Bb	10,62 Ab	23,28 Aa	18,43 Ab
Filtrado 1	5,78 Bb	15,46 Aa	16,55 Bb	25,62 Aa
Filtrado 2	9,88 Aa	7,03 Ab	28,05 Aa	23,44 Aa
Testemunha	3,16 Bc	6,45 Ab	10,03 Bc	16,74 Ab
CV (%)	10,92		7,68	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

Os tratamentos do substrato com os controles biológicos e a inoculação de *F. equiseti* influenciaram a massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) das mudas de noqueira-pecã, apresentando diferença estatística (Tabela 5). A incorporação dos tratamentos de controle biológico ao substrato interferiu de forma positiva na MSPA e MSR. Na maior parte dos tratamentos, a presença de *F. equiseti* afetou negativamente o acúmulo de MSPA e MSR, comparados aos tratamentos em que as plantas não foram expostas ao inóculo. As menores MSPA e MSR resultaram do tratamento com a presença de *F. equiseti*, sem que nenhum controle fosse aplicado ao substrato, o que resultou em valores de 1,14 g e 3,75 g, respectivamente. Em contraponto a maior MSPA e MSR foram resultantes dos tratamentos em que o substrato foi tratado com o filtrado 1 (6,94 g) na ausência do patógeno e a presença do patógeno com substrato tratado com o filtrado 2 (10,58 g).

Devido à ausência de plantas doentes nos tratamentos sem a incorporação de grãos de milho colonizado por *F. equiseti* ao substrato, optou-se por não adicionar esses tratamentos na análise estatística (Tabela 6). Na presença do patógeno, a maior incidência foi na testemunha com 60% de plantas afetadas, todavia o tratamento do substrato com o isolado TR1 de *T. asperellum*, controlou totalmente a manifestação de sintomas, enquanto que os demais tratamentos resultaram em 36,36%, 40% e 41,67% de incidência de sintomas para o filtrado 1, isolado Qt de *T. asperellum* e filtrado 2, respectivamente.

Tabela 5 - Efeito dos tratamentos de controle biológico sobre *Fusarium equiseti* na qualidade final das mudas de noqueira-pecã, avaliadas através da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR).

Tratamentos	MSPA (g)		MSR (g)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	2,29 Bb*	6,43 Aa	5,79 Bb	9,93 Aa
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	2,58 Bb	4,41 Ab	6,26 Bb	10,52 Aa
Filtrado 1	3,94 Ba	6,94 Aa	6,76 Bb	9,99 Aa
Filtrado 2	2,51 Ab	3,11 Ab	10,58 Aa	9,85 Aa
Testemunha	1,14 Bc	2,50 Ab	3,75 Bc	6,26 Ab
CV (%)	7,34		7,60	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

A presença do patógeno sem nenhum tratamento para o controle do mesmo resultou em menor crescimento de raízes laterais e em alguns locais as raízes apresentavam aspecto apodrecido, esse foi o único tratamento em que duas plantas receberam nota 5, apresentando, inclusive, murcha da parte aérea e folhas com necrose. Esse também foi o tratamento com maior nota de severidade da doença com 3,06 (41,18% do tecido radicular afetado), que se diferenciou dos demais. Os tratamentos que apresentaram, maior controle da doença foi o com a suspensão de esporos do isolado TR1, que controlou totalmente a manifestação dos sintomas, filtrado 1 com nota de 0,31 (3,08% do tecido radicular afetado) e a suspensão de esporos do isolado de *T. asperellum* Qt, com a nota média de 0,38 (3,46% do tecido radicular afetado).

Tabela 6 - Incidência (%), notas de severidade da podridão de raízes causada por *Fusarium equiseti* e percentagem do sistema radicular afetado obtidos no teste de controle *in vivo*.

Tratamentos	Incidência (%)	Notas	Percentagem
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	40,00 b*	0,38 c	3,46 c
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	0,00 c	0,00 c	0,00 c
Filtrado 1	36,36 b	0,31c	3,08 c
Filtrado 2	41,67 b	1,30 b	11,50 b
Testemunha	60,00 a	3,06 a	41,18 a
CV (%)	23,21	17,38	20,41

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

7.3.2 Microbiolização de sementes para o controle de *Fusarium equiseti*

Nas duas avaliações relacionadas à emergência, houve diferença estatística entre os tratamentos e entre a presença e ausência do patógeno (tabela 7). No tratamento somente com a presença do patógeno no substrato sem nenhum tratamento biológico, interferiu de forma negativa nessa variável (14% de plântulas emergidas), ao mesmo tempo que quando o patógeno estava ausente a emergência foi de 26%. Na presença do patógeno, com as sementes microbiolizadas com o filtrado 2, a emergência foi superior aos demais tratamentos, com 58% de emergência. Já na ausência do patógeno, os tratamentos que resultaram em maior emergência foram os com os isolados Qt (38%) e TR1 (38%) de *T. asperellum*.

Aos 30 dias, o tratamento na presença do patógeno sem a utilização de controle biológico foi o que apresentou a menor emergência 42%, diferindo de quando não houve a incorporação de *Fusarium equiseti* ao substrato que resultou em emergência de 58%. A maior emergência foi 78%, para dois tratamentos sendo eles, a presença do patógeno e sementes microbiolizadas com o isolado Qt e o outro, ausência do patógeno e sementes microbiolizadas com filtrado 1. Nessa avaliação, além da emergência, que estava estabilizada, também foram observadas as sementes que não haviam germinado. Nessas observou-se que o ápice da plântula estava necrosado, com sinais do patógeno, que causou tombamento de pré-emergência. Esse sintoma foi observado em média em 10% das sementes utilizadas nos tratamentos em que o substrato estava colonizado com o patógeno.

Tabela 7 - Emergência de plântulas originárias de sementes de noqueira-pecã, tratadas com os biocontroles no 15º e 30º dias após a semeadura na presença ou ausência de *Fusarium equiseti*.

Tratamentos	15º dia (%)		30º dia (%)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> (Qt)	34,00 Ab*	38,00 Aa	78,00 Aa	62,00 Ab
<i>Trichoderma asperellum</i> (TR1)	34,00 Ab	38,00 Aa	58,00 Ab	54,00 Ab
Filtrado 1	42,00 Ab	34,00 Aa	62,00 Bb	78,00 Aa
Filtrado 2	58,00 Aa	30,00 Bb	66,00 Ab	74,00 Aa
Testemunha	14,00 Bc	26,00 Ab	42,00 Bc	58,00 Ab
CV (%)	15,20		7,71	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

Aos 45 dias após a instalação do experimento, houve diferença estatística entre os tratamentos no comprimento da parte aérea e no diâmetro das mudas de nogueira-pecã, havendo interação entre os fatores (tabela 8). O tratamento com o filtrado 1, na ausência do patógeno foi o que apresentou maior comprimento da parte aérea (20,08 cm), se diferenciando dos demais tratamentos, este também demonstrou o maior diâmetro do colo (3,58 mm), não se diferenciando dos demais tratamentos na ausência do patógeno.

Tabela 8 - Efeito dos tratamentos com crescimento das mudas de nogueira-pecã, através das variáveis, comprimento da parte aérea e diâmetro do colo 45 dias após a instalação do experimento na presença ou ausência de *Fusarium equiseti*.

Tratamentos	Comprimento da parte aérea (cm)		Diâmetro (mm)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> (Qt)	16,69 Aa*	16,39 Ab	3,28 Aa	3,31 Aa
<i>Trichoderma asperellum</i> (TR1)	15,98 Aa	14,05 Ab	2,07 Bb	3,41 Aa
Filtrado 1	14,04 Ba	20,08 Aa	2,85 Ba	3,58 Aa
Filtrado 2	16,39 Aa	16,51 Ab	3,25 Aa	3,38 Aa
Testemunha	16,01 Aa	17,21 Ab	2,98 Aa	3,23 Aa
CV (%)	11,27		8,81	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

Aos 90 dias após a instalação do experimento, para o comprimento da parte aérea, quando houve a incorporação do patógeno ao substrato, não houve diferença estatística entre os tratamentos com controle biológico e a testemunha. Entretanto, na ausência do patógeno a incorporação dos tratamentos de controle biológico ao substrato apresentou diferença estatística (Tabela 9). Nesse caso, o tratamento que se destacou, foi o com o filtrado 1, que apresentou maior comprimento da parte aérea com 20,79 cm. Para a interação entre os fatores ocorreu diferença estatística, sendo que para o tratamento com microbiolização das sementes com o filtrado 1 na presença do patógeno, o comprimento da parte aérea foi inferior ao tratamento com o filtrado 1 na ausência do patógeno.

Por outro lado, a variável diâmetro na mesma avaliação não demonstrou diferença estatística entre os tratamentos, apesar dos valores serem numericamente superiores quando não houve a incorporação do patógeno ao substrato. Na presença do patógeno, o diâmetro do colo variou de 3,21 a 3,55 mm, para o tratamento com o filtrado 1 e para a testemunha, nessa ordem.

Na ausência de *F. equiseti*, o diâmetro do colo, variou de 3,33 a 3,63 mm, para o tratamento com *Trichoderma asperellum* (Qt) e para a testemunha, respectivamente.

Tabela 9 - Efeito dos tratamentos de controle biológico sobre *Fusarium equiseti* no crescimento das mudas de noqueira-pecã, aferido através das variáveis, comprimento da parte aérea e diâmetro do colo 90 dias após a instalação do experimento.

Tratamentos	Comprimento da parte aérea (cm)		Diâmetro (mm)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	16,69 Aa*	16,48 Ab	3,28 ^{ns}	3,33 ^{ns}
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	15,98 Aa	14,45 Ab	3,31	3,41
Filtrado 1	16,25 Ba	20,79 Aa	3,21	3,58
Filtrado 2	16,39 Aa	16,86 Ab	3,25	3,38
Testemunha	16,54 Aa	17,21 Ab	3,55	3,63
CV (%)	14,57		6,33	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. ns: não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

No geral, os tratamentos com a microbiolização das sementes com os antagonistas e com os filtrados de cultura, apresentaram valores superiores para massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), tanto na presença quanto na ausência do patógeno, em relação à testemunha (Tabela 10). Para esses tratamentos houve diferença estatística para MFPA, contudo para essa variável, a presença ou ausência do patógeno, não apresentou diferença estatística.

Em contrapartida a presença ou ausência do patógeno demonstrou diferença estatística para a MFR. O menor valor para MFR foi 17,47 g, seguido de 20,65 g, relativos ao tratamento presença do patógeno não tratado e presença do patógeno tratado com o filtrado 2. Na ausência do patógeno, os valores de MFR foram maiores, apresentando até 30,41 g para o tratamento com o filtrado 1, diferenciando-se somente do tratamento testemunha que obteve 20,73 g.

A incorporação da suspensão de esporos de *T. asperellum*, dos filtrados de cultura e a inoculação de *F. equiseti* influenciaram a massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) das mudas de noqueira-pecã, apresentando diferença estatística entre os tratamentos e interação entre os fatores (Tabela 11). Na maior parte dos tratamentos, a presença de *F. equiseti* afetou negativamente o acúmulo de MSPA e MSR, comparados aos tratamentos em que as plantas não foram expostas ao inóculo. Para a MSR somente a microbiolização com o isolado Qt de *T. asperellum*, manteve a MSR com valores próximos de quando não ocorreu a incorporação do patógeno ao substrato.

Tabela 10 - Efeito dos tratamentos de controle biológico sobre *Fusarium equiseti* na qualidade final das mudas de noqueira-pecã, avaliados através das variáveis, massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca da raiz (MFR).

Tratamentos	MFPA (g)		MFR (g)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	7,34 Ab*	7,85 Aa	23,48 Aa	25,48 Aa
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	9,65 Aa	9,77 Aa	24,51 Aa	28,57 Aa
Filtrado 1	9,02 Aa	7,06 Aa	22,23 Ba	30,41 Aa
Filtrado 2	6,44 Ab	7,94 Aa	20,65 Bb	29,90 Aa
Testemunha	5,64 Ab	5,64 Ab	17,47 Bb	20,73 Ab
CV (%)	9,59		9,36	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

Para a MSPA a testemunha na presença de *F. equiseti* resultou em 2,32 g, sendo o menor valor para a variável se diferenciando dos demais tratamentos, na ausência do patógeno a MSPA variou de 3,27 g a 4,62 g, para os tratamentos testemunha e com o filtrado 1, nessa ordem. A testemunha na presença do patógeno novamente apresentou menor acúmulo de MSR (4,95 g), diferenciando-se dos demais tratamentos. Em contrapartida, sem o patógeno o menor acúmulo de MSR foi para a testemunha.

Tabela 11 - Efeito dos tratamentos de controle biológico sobre *Fusarium equiseti* na qualidade final das mudas de noqueira-pecã, avaliadas por meio da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR).

Tratamentos	MSPA (g)		MSR (g)	
	Presença do patógeno	Ausência do patógeno	Presença do patógeno	Ausência do patógeno
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	3,40 Aa*	3,73 Ab	8,60 Aa	9,70 Aa
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	2,59 Ba	4,51 Aa	8,09 Ba	11,08 Aa
Filtrado 1	2,91 Ba	4,62 Aa	7,47 Ba	12,93 Aa
Filtrado 2	2,96 Aa	3,59 Ab	8,05 Ba	11,55 Aa
Testemunha	2,32 Ab	3,27 Ab	4,95 Bb	8,49Ab
CV (%)	8,11		12,62	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

Na Tabela 12 é possível observar que a incidência da doença apresentou valores que variaram de 71,42% a 0,00%, para o tratamento na presença de *F. equiseti* sem tratamento nas

sementes de noqueira-pecã, e zero o tratamento na presença do patógeno e sementes tratadas com o filtrado 2. Devido à ausência de plantas doentes, nos tratamentos sem a incorporação de grãos de milho colonizado por *F. equiseti* ao substrato, optou-se por não adicionar esses tratamentos na análise estatística.

Quanto as notas de severidade da doença, é importante salientar que houve diferença estatística entre os tratamentos. No tratamento com a presença do patógeno sem uso de nenhum controle biológico, pode-se notar que o crescimento das raízes laterais foi restrito e seu apodrecimento foi visível com um índice de podridão de raízes de 3,38 na escala de 0 a 5. Os sistemas radiculares sintomáticos apresentaram poucas raízes finas e aspecto de podridão em alguns lugares da raiz principal, todavia, os tratamentos com a suspensão de esporos dos isolados de *T. asperellum* Qt e TR1 diminuíram a gravidade da podridão radicular com notas 1,08 e 1,46, nessa ordem.

Os resultados mais promissores para o controle da doença foram obtidos pelos tratamentos em que foram utilizados os filtrados de cultura com 0,62 para o filtrado 1, e o filtrado 2 em que as plantas não apresentaram nenhum sintoma aparente relacionados a inoculação do patógeno. Além dos sintomas radiculares, algumas plantas também demonstraram sintomas na parte aérea, como a murcha da parte aérea e necrose foliar, sendo esses sintomas relacionados diretamente a podridão das raízes que dificultou a absorção de água e nutrientes pelas plantas afetadas. Os sintomas na parte aérea foram observados com maior frequência e intensidade no tratamento testemunha, reforçando a relação direta da podridão de raízes e dos sintomas da parte aérea.

Tabela 12 – Incidência (%), notas de severidade da podridão de raízes causada por *Fusarium equiseti* e percentagem de tecido radicular afetado, obtidos no teste de controle *in vivo*.

Tratamentos	Incidência (%)	Notas	Percentagem
<i>Trichoderma asperellum</i> Qt	42,85 b*	1,08 b	10,77 b
<i>Trichoderma asperellum</i> TR1	50,00 b	1,46 b	18,46 b
Filtrado 1	41,22 b	0,62 c	4,96 c
Filtrado 2	0,00 c	0,00 c	0,00 c
Testemunha	71,42 a	3,38 a	48,08 a
CV (%)	18,19	20,11	28,09

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

7.4 DISCUSSÃO

O controle biológico pode ser aplicado de diversas formas, dependendo da doença a ser controlada, como também da fase do ciclo da planta em que o patógeno causa prejuízo. Entre as formas de aplicação de controle biológico podem ser citadas: o tratamento de sementes, aplicação no substrato de plantio, aplicação por meio da água de irrigação e pulverização da parte aérea. Para doenças radiculares, o mais usual é o tratamento de sementes, pois esta é a forma de aplicação que proporciona maiores chances de estabelecimento dos microrganismos antagonistas, sendo uma forma prática de aplicação. Outra forma muito comum de aplicação do controle biológico, é diretamente no substrato, contudo, nesse caso, há maior gasto de produto, mas é uma forma muito eficiente de controle de patógenos radiculares (MEDEIROS et al., 2018). Por isso, no presente trabalho, essas duas formas de aplicação foram exploradas.

Nos dois experimentos realizados na presente pesquisa, com a incorporação dos tratamentos de controle biológico no substrato e microbiolização de sementes, houve aumento da emergência de plântulas de noqueira-pecã. O aumento da emergência de plântulas devido ao tratamento de sementes com *Trichoderma* sp., já foi relatado por Silva et al. (2019), em seu estudo os autores utilizaram sementes de *Pinus taeda*, naturalmente infectadas com *Fusarium* e as microbiolizaram com *Trichoderma* sp., o tratamento de sementes resultou em aumento da emergência de plântulas, bem como no aumento da velocidade de emergência.

No experimento com a incorporação dos tratamentos de controle biológico no substrato, na avaliação realizada 45 dias após a instalação do experimento, não houve influência dos tratamentos no comprimento da parte aérea das plantas de noqueira-pecã. No trabalho realizado por Junges et al. (2016), também não foi observada diferença estatística no incremento da parte aérea de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*), mesmo com a aplicação de *Trichoderma* spp. por diferentes formas (rega do substrato ou no tratamento de sementes), e mesmo testando a aplicação em diferentes momentos do processo de produção de mudas (20 dias antes da semeadura, na semeadura e 20 dias após a semeadura).

No geral, para o diâmetro do colo as avaliações não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Rodrigues et al. (2018), testando doze isolados de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole para *Ceratocystis cacaofunesta*, também observaram que não houve diferença estatística no diâmetro do caule de plantas de cacauero (*Theobroma cacao* L), mesmo com a utilização de biocontroladores. No mesmo trabalho, os autores relataram que a

inoculação do patógeno não interferiu no diâmetro do caule, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

No experimento de incorporação dos tratamentos de controle biológico ao substrato na avaliação efetuada aos 90 dias e no experimento de microbiolização nas duas avaliações (45 e 90 dias) foi possível observar a ação de *Trichoderma* como promotor de crescimento de plantas. Esta, por sua vez, ocorre por meio de interações de fatores bioquímicos e produção de várias enzimas e compostos benéficos (MACHADO, 2012). Medeiros et al. (2018) destacam que a promoção de crescimento influencia de forma indireta no controle da doença, contribuindo na produção de hormônios, na rusticidade, aquisição de nutrientes e absorção de água pela planta. Silva et al., (2019), estudando o efeito da microbiolização de sementes de *Pinus taeda* naturalmente infectadas com *Fusarium* sp., relataram que as sementes tratadas com *Trichoderma* sp. por meio de imersão na suspensão de esporos (1×10^6), geraram plântulas com maior comprimento da parte aérea, mesmo em lotes que apresentavam alta incidência de *Fusarium* sp. (94%).

No experimento de microbiolização de sementes, nas duas avaliações realizadas aos 45 e 90 dias após a instalação do mesmo, tanto na presença quanto na ausência do patógeno, o filtrado 1 promoveu o crescimento em comprimento da parte aérea das plantas de nogueira-pecã. No experimento de incorporação do controle biológico ao substrato na avaliação aos 90 dias os filtrados de cultura também se mostraram como promotores de crescimento aumentando o comprimento da parte aérea das plantas em comparação com a testemunha. Nesse sentido, para a produção do filtrado de cultura, *Trichoderma* spp. é submetido ao crescimento em meio líquido, durante o crescimento, metabólitos secundários são produzidos pelo fungo, alguns deles expressam nas plantas funções semelhantes à auxina, que possuem efeito positivo no crescimento das plantas, esse fato pode explicar o incremento no comprimento da parte aérea (VINALE et al., 2014)/.

Para as variáveis MFPA, MFR, MSPA e MSR, nos dois experimentos realizados, foi possível observar que a presença do patógeno, na maioria das avaliações, interferiu negativamente nessas variáveis. Esse resultado se deve as características e a forma com que o fungo causador de podridão de raízes atua na planta. Patógenos causadores dessa doença são agressivos, atuam destruindo a raiz por mecanismos químicos e mecânicos, obtendo nutrientes às custas da decomposição da mesma, logo devido a diminuição da quantidade de raízes funcionais, há menor acúmulo de massa seca da raiz e da parte aérea, devido à redução da absorção de água e nutrientes (BEDENDO, 2018).

Por outro lado, a incorporação do controle biológico no substrato, interferiu de forma positiva nessas variáveis. O maior acúmulo de MFR e MSR pode ser explicado pelo maior crescimento das raízes, que pode ter ocorrido por *Trichoderma* spp. produzir metabólitos que interferem no índice mitótico, que estimula a divisão celular das raízes, e promove o crescimento das mesmas (AGUIAR et al., 2015). Nesse sentido, a maior quantidade de raízes faz com que a planta se torne mais eficiente na absorção de água e nutrientes e assim, ocorre maior desenvolvimento da parte aérea, acumulando mais MFPA e MSPA.

Quanto ao índice de doença, nota-se que quando os tratamentos de controle biológico foram aplicados no substrato, a suspensão de esporos dos isolados de *T. asperellum* demonstraram controle mais efetivo do que os filtrados de cultura. Em contraponto, quando os tratamentos foram aplicados diretamente na semente, os filtrados de cultura foram mais eficientes no controle da doença. Esse fato pode ser explicado pelo modo com que os diferentes tratamentos agem, pois quando se aplica a suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. no substrato, ocorre a colonização, tornando-o um meio inadequado para o desenvolvimento patógeno. Contudo, a aplicação dos filtrados de cultura 14 dias antes da incorporação do patógeno no substrato pode ter ocasionado a volatilização ou degradação de compostos com ação fungicida que estavam presentes nos filtrados de cultura, antes mesmo da introdução do patógeno no solo. Já no caso da microbiolização, o fato dos isolados de *T. asperellum* terem menor período de contato com a semente, e por outro lado os filtrados de cultura terem perdido menos compostos devido ao menor tempo de exposição as condições ambientais, explica os filtrados de cultura terem apresentado maior capacidade de controle dos sintomas de podridão de raízes.

Segundo Medeiros et al. (2018), os microrganismos antagonísticos quando incorporados ao substrato, se associam rapidamente ao tecido da planta hospedeira, pois possuem velocidade de crescimento superior ao do patógeno e por isso não resta espaço para o patógeno colonizar o tecido. Assim, o antagonista evita que o patógeno cause qualquer tipo de dano no tecido da planta hospedeira, ou seja, *Trichoderma* spp. está controlando o patógeno pelo mecanismo de competição.

Pode-se inferir que *Trichoderma asperellum* colonizou externa e/ou internamente as raízes e que atuou como escudo ou barreira, impedindo a invasão das raízes, estabelecimento e/ou multiplicação de *Fusarium equiseti*, reduzindo a podridão de raízes. Khan et al. (2019), estudando plantas de feijão-da-índia (*Vigna radiata* L.) obtidas de sementes inoculadas com *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* cultivadas em solo previamente tratado com

Trichoderma spp., relataram a diminuição da ocorrência e da severidade dos sintomas ocasionados pelos patógenos. Sanchez et al. (2019), estudando o efeito de diferentes isolados de *Trichoderma* spp., aplicados por meio de suspensão de esporos (10^6 conídios/mL) no tratamento preventivo de plantas de pêra (*Pyrus communis*), relataram até 96% de controle da extensão dos sintomas da podridão de colo causada por *Phytophthora cactorum*.

Os filtrados de cultura utilizados na presente pesquisa estavam totalmente sem a presença de estruturas de *T. asperellum*, ou seja, os mecanismos de ação: competição, parasitismo e predação não podem explicar o controle dos sintomas causados pelo patógeno, resultantes desses tratamentos. Dessa forma, a antibiose é o mecanismo que estava relacionado à diminuição da doença nesses casos, pois ela é o mecanismo de ação em que uma ou mais moléculas afetam o crescimento ou a fisiologia do patógeno, sendo que um mesmo microrganismo pode produzir mais de uma molécula com ação sobre fitopatógenos, evitando a formação de cepas de patógenos resistentes (MEDEIROS et al., 2018). Vinale et al. (2008), relata que os metabólitos produzidos por *Trichoderma*, como os presentes no filtrado de cultura, podem estar ligados a respostas sistêmicas de defesa da planta, que podem agir diminuindo a severidade de doenças.

7.5 CONCLUSÃO

Os tratamentos de controle biológico, aplicados na forma de suspensão de esporos ou de filtrados de cultura, diminuíram a severidade dos sintomas relacionados a podridão de raízes em mudas de noqueira-pecã expostas ao inóculo de *Fusarium equiseti*. Além disso, os tratamentos interferiram de forma positiva nas variáveis: emergência, comprimento da parte aérea, diâmetro, massa fresca da parte aérea, massa fresca radicular, massa seca da parte aérea, massa seca radicular, na presença ou na ausência de inóculo de *Fusarium equiseti*. Portanto, o controle biológico constitui-se de uma técnica promissora para o controle de podridão de raízes em noqueira-pecã.

7.6 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N., 2005. Plant Pathology. Elsevier-Academic Press.

AGUIAR, A. R. et al. Efeito de metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o índice mitótico em células das pontas de raízes de *Allium cepa*. **Bioscience journal**, Uberlândia, v. 31, n. 3, p. 934-940, maio/junho, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v31n3a2015-23292>>. Acesso em: 20 out. 2019.

BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In: AMORIM, L.; REZENDE, A.M.; BERGAMIN FILHO, A., Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 5ed. Ouro Fino MG: Agronômica Ceres, 573 p. 2018.

CONG Y.; FAN H.; MA Q.; LU Y.; XU L., ZHANG P.; CHEN K. Mixed culture fermentation between *Rhizopus nigricans* and *Trichoderma pseudokoningii* to control cucumber *Fusarium* wilt. **Crop Protection** v. 124, 104857, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104857>>. Acesso em: 20 out. 2019.

Dos SANTOS, R.F.; et al. *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**. v. 55, p. 293–300, 2016.

El KOMY, M.H.; et al. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. **Plant Pathology**. J. v. 31, n. 1, p. 50–60, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.5423/Ppj.Oa.09.2014.0087> > Acesso em: 20 out. 2019.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, dez. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-0542011000600001&script=sci_arttext&tlng=pt.> Acesso em: 15 set. 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de recuperação automática (SIDRA): Banco de dados agregados. Sistema produção da extração vegetal e da Silvicultura. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pnadcm>. Acesso em: 15 set. 2019.

JUNGES E.; et al. (2018) Bioproducts from *Trichoderma harzianum* as inducer of resistance to anthracnose in beans. In: Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos.

JUNGES, E. et al. *Trichoderma* spp. na Produção de Mudanças de Espécies Florestais. **Floresta e Ambiente**, v. 23, n. 2, p. 237–244, fev. 2016.

KHAN, M. R. et al. Management of root-rot disease complex of mungbean caused by *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* through soil application of *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 119, p. 24–29, 1 maio 2019.

KLINGELFUSS, L.H.; YORINORI, J.T.; DESTRO, D. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, jan./fev. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v32n1/07.pdf>> Acesso em: 15 out. 2019.

LAZAROTTO, M. et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9390–9402, nov. 2014. Disponível em: <<https://www.geneticsmr.org/articles/morphological-and-molecular-characterization-of-fusarium-spp-pathogenic-to-pecan-tree-in-brazil.pdf>>. Acesso em: 4 Nov. 2020.

MACHADO A. R.; PINHO D. B.; PEREIRA O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the *Botryosphaeriaceae* associated with collar and root rot of the biofuelplant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 231–247. 2014. DOI 10.1007/s13225-013-0274-1.

MAO, L.G., et al. 2012. Evaluation of the combination of 1,3-dichloropropene and dazomet as an efficient alternative to methyl bromide for cucumber production in China. **Pest Managment Science**, v. 68, n. 4, p. 602–609. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.2303>. Acesso em: 15 out. 2019.

MEDEIROS, F.H.V.; SILVA, J.C.P. da; PASCHOLATI, S.F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, A.M.; BERGAMIN FILHO, A., Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 5ed. Ouro Fino MG: Agronômica Ceres, 573 p. 2018.

POLETTI, T. et al. Dormancy overcome methods in seeds of pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Revista Árvore**, v.39, n.6, p.1111-1118, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v39n6/0100-6762-rarv-39-06-1111.pdf>>. Acesso em: 18 set. de 2018.

RODRIGUES, G.S. et al. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da Murcha de *Ceratocystis* em cacauzeiro. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, p.72-78, 2018.

SANCHEZ, A.D.; OUSSET, M.J.; SOSA, M.C. Biological control of *Phytophthora* collar rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. **Biological Control**, v. 135, p. 124–134, 2019. Disponível em: doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.05.012. Acesso em: 20 out. 2020.

SILVA, T. W. R. et al. Pine Seeds Treatment with *Trichoderma* for *Fusarium* Control. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2179-80872019000200149&script=sci_arttext>. Acesso em: 26 out. 2019.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.72, p.80-86, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576508000568>>. Acesso em: 20 out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>.

VINALE, F. et al. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/264264987_Trichoderma_Secondary_Metabolites_Active_on_Plants_and_Fungal_Pathogens>. Acesso em: 17 out. 2019. DOI: 10.2174 / 1874437001408010127.

8 DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo, buscou-se aprofundar os conhecimentos sobre formas eficientes de controle de duas doenças importantes para a cultura da noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), a podridão de raízes, causada por diferentes espécies de *Fusarium* spp. e o cancro do tronco causado por fungos da família Botryosphaeriaceae. Os agentes causais dessas doenças são fungos pouco específicos, muito agressivos e pouco evoluídos quanto ao parasitismo, que por suas características se encaixam no Grupo III de doenças relatados por Mec New em 1970 (AMORIM et al., 2018). Por serem agressivos, esses patógenos geralmente, causam a morte das plantas, acarretando prejuízos financeiros na produção, e pela perda de plantas, é necessária a reposição destas, acarretando custos extras aos agricultores, demandando medidas de manejo das doenças. Devido à baixa especificidade dos patógenos citados anteriormente, o controle genético por meio de cultivares resistentes torna-se inviável, o controle químico, não é recomendado, pois são patógenos habitantes do solo e os fungicidas químicos são pouco eficientes no controle desses.

Assim, o controle biológico surge como forma promissora para o manejo dessas doenças. Entre os microrganismos de controle biológico, os mais estudados são os fungos do gênero *Trichoderma* spp., estes por sua vez são fungos habitantes naturais do solo e, podem ser encontrados em formulações comerciais disponíveis no mercado. Apesar disso, fungos desse gênero que já estão associados a rizosfera da cultura estudada, podem apresentar uma associação mais próxima e por isso ter potencial benéfico maior. No capítulo I, quando foi realizado o isolamento de *Trichoderma* spp. do solo, foi encontrada a espécie *T. asperellum*, identificada através da análise molecular da região do fator de alongação, amparada pela caracterização morfológica. Nos estudos, além dos isolados mencionados anteriormente, também foi utilizado um isolado da mesma espécie proveniente de um produto comercial. Estes isolados de *T. asperellum* foram testados quanto as suas potenciais características de antagonismo frente a isolados de fungos do gênero *Fusarium* spp., causadores de podridão de raízes e fungos da família Botryosphaeriaceae, causadores de cancro do tronco, através dos testes de confronto direto e de metabólitos voláteis.

Os resultados dos testes *in vitro*, estudados nos capítulos I e II foram influenciados diretamente pelas características de crescimento micelial dos isolados dos fitopatógenos. No confronto direto, a maior inibição foi observada para o isolado de *Lasiodiplodia theobromae*, em um dos ensaios e no outro para o isolado de *Fusarium graminearum*. É importante salientar

que em cada um dos testes, esses isolados foram os que apresentaram maior crescimento micelial, resultando em maior confronto com as hifas destes com as hifas dos isolados de *T. asperellum*. A redução do crescimento micelial dos patógenos ocorreu devido a competição por espaço e nutrientes, e devido aos isolados de maior crescimento micelial estarem mais próximos dos isolados de *T. asperellum* outros mecanismos foram beneficiados, como o parasitismo e a antibiose. No caso dos isolados dos patógenos com o crescimento micelial mais lento, a inibição era menor, pois somente o mecanismo de antibiose estava agindo na maior parte do teste, devido a distância das hifas dos fitopatógenos e dos antagonistas durante o teste de confronto direto.

No teste de metabólitos voláteis, ainda nos capítulos II e III, a tendência foi a mesma, onde os isolados com o crescimento micelial mais rápido demonstraram resultados maiores de inibição, contudo apresentando variação em alguns casos. Não houve diferença significativa entre os isolados de *T. asperellum*, pois como todos eram da mesma espécie, apresentaram características semelhantes de crescimento micelial e liberação de metabólitos voláteis durante os testes. Após a avaliação inicial da capacidade antagonista dos isolados de *T. asperellum*, no capítulo I e II, estes foram submetidos a diferentes formas de cultivo em meio líquido, visando a obtenção de filtrados de cultura com potencial fungicida frente aos patógenos de noqueira-pecã.

Foram testados diferentes parâmetros no cultivo, pH, agitação, quantidade de sacarose e concentração de esporos, tendo como respostas, a produção de biomassa seca, a atividade da enzima quitinase, a composição dos metabólitos presentes no filtrado de cultura, além da inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos. Todas as formas de cultivo apresentaram condições adequadas para o desenvolvimento dos isolados de *T. asperellum*, mas apesar de serem da mesma espécie, o isolado TR1 mostrou maior biomassa fúngica no final do processo, mostrando melhor adaptação ao cultivo submerso. As maiores percentagens de inibição do crescimento micelial, foram obtidas para os filtrados oriundos do mesmo isolado no controle de *L. theobromae*, sendo a maior inibição de 49,12%.

Quanto aos metabólitos dos filtrados de cultura, foi possível observar a produção de compostos com potencial bioativo, entre eles o ácido hexadecanóico e alfa-humuleno, descritos como inseticidas, enquanto outros têm ação antimicrobiana, como é o caso de derivados do pirano, Celidoniol, deoxy, Pentadecanoicacid, 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl, Propanoicacid, 1-methylethyl ester e ácido 9-octadecenoico (BENELLI et al., 2018; LEE et al., 2007; BARRETO & VOOTLA, 2018; CHHOUK et al., 2018; ROGALSKA, 2021; FOO et al., 2015; WALTERS et al., 2004; ALI et al., 2017). Esses compostos bioativos apesar de presentes, apresentavam baixa abundância relativa, que pode estar ligada diretamente a presença de 2-

Furancarboxaldehyde, 5-(Hydroxymetil), que é um composto derivado da degradação da sacarose, que estava em abundância relativa alta nas amostras estudadas (próximo ou acima de 50%) (KUCHEROV et al., 2018).

Na inibição do crescimento micelial dos isolados fitopatogênicos, foi possível observar que o filtrado de cultura obtido da condição 8 (pH 5, Agitação 100 rpm, Sacarose 50 g/L, concentração inóculo 10^5 esporos/mL) do crescimento dos diferentes isolados de *T. asperellum* em fermentação submersa, foi o que causou a maior inibição do crescimento micelial dos isolados fitopatogênicos, tanto para os patógenos responsáveis pela podridão de raízes, bem como para os isolados causadores de cancro do tronco *in vitro*.

Muitos compostos voláteis são liberados pelo antagonista e pelo patógeno, estes compostos por sua vez, podem exercer diferentes funções, dentre elas podemos citar a toxicidade para animais, plantas e até mesmo contra outras espécies fúngicas. Entre os compostos orgânicos voláteis de *Fusarium graminearum*, estudados no capítulo III, foram identificados o longiborneol, trichodiene e o longifolene, que são elementos chave na produção de substâncias tóxicas para animais, estando também ligados a patogenicidade do fungo em plantas (GIROTTI et al., 2012; MALBRÁN et al., 2020). Por outro lado, os isolados de *T. asperellum*, quando cultivados sem a presença do patógeno, produziram 2H-Pyran-2-one, 6-pentyl- (6PAP) com abundância maior que 50% de todos os COVs.

Quando confrontados os isolados de *T. asperellum* com *F. graminearum*, houve diminuição da abundância relativa de importantes COVs de *F. graminearum*, ligados a toxicidade em animais e patogenicidade em plantas. Essas mudanças no perfil e na abundância dos compostos propõem que esses microrganismos podem alterar seu metabolismo secundário e, alterar o padrão de expressão dos compostos voláteis, para competir com outros microrganismos, sendo importante ressaltar a ação dos COVs de *Trichoderma* spp. na inibição de compostos ligados a capacidade fitopatogênica do isolado de *F. graminearum*. Com os estudos *in vitro*, foi possível compreender os diferentes mecanismos de biocontrole com que os isolados de *T. asperellum* atuaram sobre os agentes fitopatogênicos, para posterior realização dos testes *in vivo*.

Nos testes *in vivo*, estudados nos Capítulos IV e V, os tratamentos de controle biológico, aplicados na forma de suspensão de esporos ou na forma de filtrados de cultura de *Trichoderma asperellum*, reduziram a severidade dos sintomas relacionados a podridão de raízes e cancro do tronco em mudas de nogueira-pecã expostas ao inóculo de *Fusarium equiseti* e *Lasiodiplodia theobromae*. Observou-se em alguns tratamentos, incremento nas variáveis emergência,

comprimento da parte aérea, diâmetro, massa verde da parte aérea, massa verde radicular, massa seca da parte aérea, massa seca radicular. Nos testes *in vivo*, a vinculação de *Trichoderma asperellum* ou dos filtrados de cultura pelo substrato, mostrou efeitos positivos e isso pode estar ligado a própria natureza do fungo, que por ser habitante de solo, possui maior habilidade de se adaptar a esse local e assim ter uma influência maior no controle de fungos fitopatogênicos e na indução de emergência e crescimento de mudas de noqueira-pecã.

Dessa forma, percebe-se que a utilização de *Trichoderma* e de seus bioprodutos é uma técnica promissora, que melhora vários aspectos da produção e da qualidade de mudas de noqueira-pecã. Entre eles podemos citar a redução de perdas de plantas pelo ataque de patógenos associados as sementes, ao aumento da emergência de plantas, melhoria da qualidade inicial das mudas, melhor estabelecimento de plantas no campo, pois as mesmas chegam mais saudias a ele, menores perdas de plantas já estabelecidas no campo. Assim, a produção e o estabelecimento de plantas no campo torna-se mais sustentável, com menores riscos de perdas financeiras para os pecanicultores.

9 CONCLUSÕES

Dessa maneira, conclui-se que os isolados de *Trichoderma asperellum* diminuíram o crescimento micelial dos fitopatógenos causadores de podridão de raízes e de cancro do tronco no teste de pareamento de culturas, metabólitos voláteis, bem como por metabólitos não voláteis. A melhor condição de cultivo de *T. asperellum* para a produção de filtrado de cultura com potencial fungicida foi na condição de crescimento 8 (Água de Maceração de Milho (AMM) 20 g/L, extrato de levedura 7,5 g/L, pH5, agitação de 100 rpm, sacarose 50g/L e concentração inicial de esporos de *T. asperellum* de 10^5). Os isolados de *T. asperellum* produziram quitinase e moléculas com potencial fungicida em meio líquido, que demonstraram seu potencial no controle de fitopatógenos.

Quando foram identificados os compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados pelos isolados de *T. asperellum*, foi identificado o 6PAP (2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-), composto descrito como inibidor de patógenos e indutor de crescimento vegetal. Por outro lado, *Fusarium graminearum* produziu compostos ligados à sua toxicidade em animais e a patogenicidade em plantas. Em confronto os compostos orgânicos voláteis de *T. asperellum* inibiram a formação de compostos voláteis de *F. graminearum*, dentre eles o longiborneol, trichodiene e longifolene, conhecidos como precursores de toxinas que afetam animais e contribuem com a patogenicidade da espécie em vegetais.

Os isolados de *T. asperellum* e os filtrados de cultura estimularam o crescimento inicial de plantas de nogueira-pecã, além de diminuir a incidência e a severidade da doença cancro do tronco em nogueira-pecã, independente da forma de aplicação. Os tratamentos de controle biológico, aplicados na forma de esporos ou de filtrados de cultura de *T. asperellum*, diminuíram a severidade dos sintomas relacionados a podridão de raízes, em mudas de nogueira-pecã expostas ao inóculo de *Fusarium equiseti*. Sendo que os tratamentos também interferiram de forma positiva nas variáveis: emergência, comprimento da parte aérea, diâmetro, massa fresca da parte aérea, massa fresca radicular, massa seca da parte aérea, massa seca radicular, na presença ou na ausência de inóculo de *F. equiseti*.

10 REFERÊNCIAS

- ALI, A.; JAVAID, A.; SHOAIB, A. GC-MS analysis and antifungal activity of methanolic root extract of *Chenopodium album* against *Sclerotium rolfsii*. **Planta Daninha**, v. 35, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-83582017000100245&script=sci_arttex>. Acesso em: 25 Jan. 2019.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. V. 1, Editora: Agronômica Ceres. 704 p. 2018.
- BENELLI, G. et al. Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 781–786, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29190597/>> Acesso em: 25 Jan. 2019.
- CHHOUK, K.; WAHYUDIONO; KANDA, H.; GOTO, M. Efficacy of supercritical carbon dioxide integrated hydrothermal extraction of Khmer medicinal plants with potential pharmaceutical activity. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, p. 2944–2956, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343718302185>>. Acesso em: 17 Jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.036>.
- FOO, L.W.; SALLEH, E.; MAMAT, S.N.H. P-53: Extraction and qualitative analysis of *Piper betle* leaves for antimicrobial activities. **International Journal of Engineering Technology Science and Research**, v. 2, p. 1–8, 2015.
- GIROTTI, J. R. et al. Early detection of toxigenic *Fusarium graminearum* in wheat. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, n. 2, p. 143-152, 2012. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/wagac/wmj/2012/00000005/00000002/art00005>>. Acesso em: 09 jan. 2021. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1348>.
- MALBRÁN, I. et al. Commercially available natural inhibitors of trichothecene production in *Fusarium graminearum*: A strategy to manage *Fusarium* head blight of wheat. **Crop Protection**, v. 138, p. 105313, 2020.
- PROCTOR, R. H.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. **Molecular plant-microbe interactions**, v.8 n.4, p. 593, 1995. Disponível em:<<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/24895>>. Acesso em: 19 dez. 2020.
- WALTERS, D.; et al. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**, v. 157, p. 87–90, 2004.