

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE DEFESA FITOSSANITÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

Alexsandra Cezimbra Quevedo

CARACTERIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. E BIOCONTROLE SOBRE *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, AGENTES CAUSAIS DA PODRIDÃO-DE-RAÍZES DE ERVA-MATE

Santa Maria, RS, Brasil
2022

Alexsandra Cezimbra Quevedo

CARACTERIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. E BIOCONTROLE SOBRE *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, AGENTES CAUSAIS DA PODRIDÃO-DE-RAÍZES DE ERVA-MATE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal.**

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

Santa Maria, RS, Brasil
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Quevedo, Alexsandra Cezimbra
CARACTERIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. E BIOCONTROLE
SOBRE *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, AGENTES
CAUSAIS DA PODRIDÃO-DE-RAÍZES DE ERVA-MATE / Alexsandra
Cezimbra Quevedo.- 2022.
86 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fatima Brião Muniz
Coorientadora: Maristela Machado Araujo
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2022

1. Controle Biológico 2. *Ilex paraguariensis* 3.
Promoção de crescimento I. Muniz, Marlove Fatima Brião
II. Araujo, Maristela Machado III. 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, ALEXSANDRA CEZIMBRA QUEVEDO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) 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.

Alexsandra Cezimbra Quevedo

CARACTERIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. E BIOCONTROLE SOBRE *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, AGENTES CAUSAIS DA PODRIDÃO-DE-RAÍZES DE ERVA-MATE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.


Aprovada em 16 de fevereiro de 2022:



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



Igor Poletto, Prof. Dr. (UNIPAMPA) - Videoconferência



Júlio Carlos Pereira da Silva, Prof. Dr. (UFSM) - Videoconferência

Santa Maria, RS, Brasil
2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Elmira Costa Teixeira (in memoriam), que não está mais entre nós, mas continua sendo minha maior força na vida. Sua lembrança me inspira e me faz persistir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente, pela força e fé 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 durante todos estes anos, bem como a todos os professores que fizeram parte da minha formação.

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

Aos meus pais, Nelson Fernandes Quevedo e Ivone Alzira Cezimbra Quevedo, por serem a minha inspiração de todos os dias, meus exemplos de caráter, dedicação e perseverança. Obrigada pelo amor, pelo carinho, pela confiança, pelo apoio, por estarem junto comigo nesta caminhada e por compreenderem o motivo da minha ausência. Amo vocês!

Ao meu namorado, pela paciência, ajuda, apoio e amor dedicados a mim não só no período de desenvolvimento do trabalho como em todos os momentos de minha vida.

À equipe de trabalho do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, agradeço pela disponibilidade e pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos, pela troca de conhecimentos, pela parceria e amizade. Vocês foram fundamentais para a conclusão deste projeto!

Aos membros da banca por aceitarem o convite de avaliar e contribuir com a pesquisa.

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

A todas as demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu sincero reconhecimento e gratidão.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1.1 REFERÊNCIAS.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 <i>Ilex paraguariensis</i>	14
2.2 PODRIDÃO-DE-RAÍZES.....	15
2.3 O GÊNERO <i>Fusarium</i>	16
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO.....	17
2.5 <i>Trichoderma</i> spp. COMO AGENTE ANTAGONISTA E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS.....	18
2.6 REFERÊNCIAS.....	21
3 CAPÍTULO I – <i>Trichoderma</i> spp. NO BIOCONTROLE <i>in vitro</i> DE <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium solani</i>.....	27
3.1 INTRODUÇÃO.....	28
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.2.1 Local de realização dos experimentos e origem dos isolados fúngicos.....	29
3.2.2 Identificação molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	31
3.2.3 Caracterização morfológica dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	32
3.2.4 Teste de pareamento de culturas.....	34
3.2.5 Teste de metabólitos voláteis.....	35
3.2.6 Procedimento estatístico.....	36
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.3.1 Caracterização molecular e morfológica dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	36
3.3.2 Teste de pareamento de culturas.....	43
3.3.3 Teste de metabólitos voláteis.....	47
3.4 CONCLUSÕES.....	50
3.5 REFERÊNCIAS.....	50

4 CAPÍTULO II – <i>Trichoderma</i> spp. NO BIOCONTROLE <i>in vivo</i> DE <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium solani</i> E NO CRESCIMENTO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE ERVA-MATE.....	56
4.1 INTRODUÇÃO.....	57
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.2.1 Local de realização dos experimentos e origem dos isolados fúngicos.....	59
4.2.2 Produção dos inóculos fúngicos e incorporação ao substrato.....	60
4.2.3 Organização dos tratamentos.....	60
4.2.4 Avaliações em plantas.....	62
4.2.5 Procedimento estatístico.....	63
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.4 CONCLUSÕES.....	79
4.5 REFERÊNCIAS.....	80
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	86

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. E BICONTROLE SOBRE *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* AGENTES CAUSAIS DA PODRIDÃO-DE-RAÍZES DE ERVA-MATE

AUTORA: Aleksandra Cezimbra Quevedo
ORIENTADORA: Prof.^a. Dr.^a. Marlove Fatima Brião Muniz

Fusarium spp. é um dos patógenos mais importantes da mateicultura, causando a doença conhecida como podridão-de-raízes em erva mate (*Ilex paraguariensis*). Esses patógenos são de difícil controle, por serem habitantes nativos do solo e apresentarem comportamento cosmopolita, atacando diversas espécies de plantas. Diante disso, a utilização de organismos antagonistas pode ser uma medida efetiva no manejo desses patógenos, auxiliando também na promoção do crescimento das plantas. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar e avaliar a ação de isolados de *Trichoderma* spp. como promotor de crescimento e na indução de resistência na planta, bem como o potencial de biocontrole *in vitro* e *in vivo* sobre *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, agentes causais da podridão-de-raízes em erva-mate. Para tanto, foram utilizados sete isolados de *Trichoderma* spp. e dois isolados patogênicos de *Fusarium* spp., sendo um de *Fusarium oxysporum* e o outro de *Fusarium solani* provenientes de solo rizoférico de plantios de erva-mate e que estavam armazenados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia “Eloicy Minussi” da UFSM. Os isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de solo rizoférico de plantios de erva-mate foram cultivados individualmente, para posterior identificação molecular (baseada na região TEF-1 α , ITS e RPB2) e caracterização morfológica. O biocontrole *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* spp. foi realizado através de pareamento de culturas, avaliado por meio de escalas de notas e do percentual de inibição e da produção de metabólitos voláteis. Os três isolados antagonistas com maior percentual de inibição *in vitro* foram selecionados para testes *in vivo*. Para esses testes, foi feita a aplicação da suspensão de esporos dos antagonistas e dos patógenos no substrato. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes em controlar o crescimento micelial de *Fusarium* spp. tanto no pareamento de culturas como por metabólitos voláteis. A aplicação da suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. foi capaz de diminuir os sintomas da doença podridão-de-raízes, causada por *Fusarium* spp. em erva-mate. *Trichoderma* spp. possui efeito positivo sobre o crescimento das raízes e parte aérea de erva-mate bem como na indução de resistência.

Palavras-chave: Controle Biológico. *Ilex paraguariensis*. Promoção de crescimento.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) é uma árvore perenifólia de 10 a 15 m de altura, de tronco reto, de coloração acinzentada e bastante curto. Na floresta, pode atingir até 25 m de altura e 70 cm de diâmetros (DANIEL, 2009). É uma espécie nativa de região de clima temperado, resistindo às temperaturas baixas. A área de ocorrência natural está restrita a três países da América do Sul: Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil, a área de ocorrência da erva-mate abrange os três estados da região sul: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, ocorrendo ainda em parte do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais (MACCARI JUNIOR, 2005). Sua madeira apresenta boas propriedades, contudo, no Brasil, o cultivo da erva-mate visa produtos oriundos das folhas, que são consumidas como chimarrão, tereré, chá-mate, chá a granel e sachê, chá líquido e chá líquido saborizado, além de aplicações na indústria farmacêutica e química (KAAP JUNIOR *et al.*, 2017).

Quanto à produção, em 2019, o estado do Paraná atingiu uma produção de 314.728 toneladas (t) de folhas verdes, seguido pelos estados de Santa Catarina com 23.981 t, Rio Grande do Sul com 23.835 t e Mato Grosso do Sul com produção aproximada a 7.000 t (SIDRA-IBGE, 2019). Com o aumento da área plantada, nos últimos anos foram encontrados alguns problemas fitossanitários nos ervais, como a podridão-de-raízes (POLETTO *et al.*, 2010). Estas causam sérios danos à cultura, com redução da produtividade e da qualidade do produto final (POLETTO *et al.*, 2006; POLETTO *et al.*, 2007).

Fungos do gênero *Fusarium* são conhecidos por causarem diversas doenças, entre elas a podridão-de-raízes em erva-mate, que diminuem a produtividade e levam a planta à morte. Além de causar a podridão-de-raízes, a doença é conhecida por apresentar também sintomas reflexos como a estagnação do crescimento, o amarelecimento ascendente das folhas, a queda intensa das folhas mais velhas e, em vários casos, a morte da planta. Como consequência do ataque do patógeno, as raízes escurecem e apodrecem, comprometendo o desenvolvimento dos ervais. (POLETTO *et al.*, 2006).

Por serem muito agressivos, o controle desses fitopatógenos se torna uma prática imprescindível para a produção de mudas de qualidade, e, até o momento, não há registro de fungicidas químicos para uso na cultura da erva-mate. Também frente aos problemas ocasionados pelo uso de produtos químicos, tem-se uma grande demanda por métodos de controle de doenças

em plantas que são menos agressivos, que não apresentam riscos ao meio ambiente e aos seres vivos (GRIGOLETTI JÚNIOR *et al.*, 2000). O uso de produtos químicos sem o acompanhamento técnico pode causar uma série de problemas como contaminação ambiental, desequilíbrio da biota natural do solo, diminuição da população de microrganismos responsáveis pela ciclagem de nutrientes e antagonistas (BOUBAKRI *et al.*, 2015).

Dessa forma, a utilização de microrganismos antagonistas apresenta-se como possibilidade de manejo do ecossistema da erva-mate, de forma sustentável e ecológica. Entre os fungos antagonistas mais estudados e utilizados no controle biológico destacam-se as espécies do gênero *Trichoderma*, que têm sido usadas como agentes ativos em formulações de biocontrole e biofertilizantes (YASSIN *et al.*, 2021; ESLAHI *et al.*, 2021; JI *et al.*, 2021). Esses fungos são habitantes naturais do solo e possuem elevada capacidade de competição saprofítica, contribuindo para o controle biológico, com a vantagem de não serem nocivos às plantas.

Além da capacidade do *Trichoderma* spp. em controlar diretamente o crescimento de fitopatógenos, há relatos de que eles também podem induzir resistência sistêmica e localizada em plantas contra a diversos patógenos (YEDIDIA *et al.*, 2001). A indução de resistência em plantas é um processo fisiológico que aumenta a capacidade defensiva provocada por estímulos específicos. As plantas podem desenvolver indução de resistência como resultado de uma infecção por um agente patogênico, em resposta a inseto, após a colonização das raízes por alguns micróbios benéficos e após tratamentos com produtos químicos. O interesse da indução de resistência a doenças em plantas tem aumentado, baseado em duas formas conhecidas como resistência sistêmica induzida e resistência sistêmica adquirida, ambas podendo ser induzidas pela simbiose entre as raízes de plantas e *Trichoderma* spp. (HARMAN *et al.*, 2004, HERMOSA *et al.*, 2012).

Dessa forma, na presente pesquisa foram realizados estudos, o quais estão organizados em dois capítulos. No Capítulo I, objetivou-se identificar e caracterizar os isolados de *Trichoderma* spp. associados à rizosfera de *Ilex paraguariensis*, bem como avaliar a ação desses isolados no controle *in vitro* de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, agentes causais da podridão-de-raízes. No Capítulo II, objetivou-se avaliar a ação de dois isolados de *Trichoderma asperelloides* e um isolado de *Trichoderma koningiopsis* no controle *in vivo* de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, bem como a promoção de crescimento e a indução de resistência em plantas de erva-mate.

1.1 REFERÊNCIAS

- 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>>. Acesso em: 03 nov. 2021.
- DANIEL, O. **Erva-mate, Sistema de produção e processamento industrial**. Editora UFGD, Dourados, MS, 2009.
- 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, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104304>>. Acesso em: 15 nov. 2021.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A. *et al.* Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**. Colombo – PR, v. 30, n. 12, 2000. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/2362>>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 2, p. 43 - 56, 2004. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro797>>. Acesso em: 01 nov. 2021.
- HERMOSA, R. *et al.* Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, Londres, v. 158, p. 17 - 25, 2012. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.052274-0>>. Acesso em 14 nov. 2021.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/289>>. Acesso em: 03 dez. 2021.
- JI, S. *et al.* *Trichoderma* biofertilizer (mixTroTha) mediates *Malus sieversii* resistance to *Alternaria alternata*. **Biological Control**, v. 156, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104539>>. Acesso em: 12 dez. 2021.
- KAAP JUNIOR, C. *et al.* A cultura da Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em sistema de cultivo convencional e orgânico como alternativa de renda ao pequeno proprietário rural. XXIV congresso Brasileiro de Custos- **Anais**. Florianópolis, 2017.
- MACCARI JUNIOR, A. **Análise do pré-processamento da erva-mate para chimarrão**; Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

POLETTI, I. *et al.* Influência da inoculação de *Fusarium* spp. e níveis de sombreamento no crescimento e desenvolvimento da erva mate. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 513 - 521, 2010.

POLETTI, I. *et al.* Primeira ocorrência de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. causando podridão-de-raízes em ervais no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 65 - 71, 2007.

POLETTI, I. *et al.* Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. st.-hil.) na região do Vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1 - 10, 2006. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1882>>. Acesso em: 06 dez. 2021.

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**, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101363>>. Acesso em: 21 dez. 2021.

YEDIDIA, I. *et al.* Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v. 235, p. 235 - 242, 2001. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1011990013955#:~:text=An%20increased%20growth%20response%20was,was%20observed%20in%20inoculated%20roots.>>. Acesso em: 22 out. 2021.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Ilex paraguariensis*

A espécie *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., popularmente conhecida por erva-mate, pertence à família Aquifoliaceae, possui porte arbóreo, é considerada esciófila (tolerante a sombra) e ombrófila (prefere ambientes sombreados e úmidos) (MAZUCHOWSKI, 1991). A erva-mate é uma árvore perenifólia, sua altura é variável, pois quando cultivada apresenta de 3 a 5 m, contudo, na floresta ela pode chegar até 30 m de altura e 100 cm de diâmetro na altura do peito (DAP) quando adulta. Essa planta exibe tronco reto ou pouco tortuoso, fuste normalmente curto, mas pode alcançar até 11 m de comprimento. A sua copa é baixa, com folhas verde-escuras e a casca tem espessura de até 20 mm com coloração externa cinza clara acastanhada, áspera a rugosa, com lenticelas formando linhas longitudinais com cicatrizes transversais (CARVALHO, 2003). O período de floração ocorre geralmente de setembro a novembro no estado Paraná; de setembro a dezembro em Santa Catarina; e de setembro a outubro no Rio Grande do Sul (BRITO *et al.*, 2019).

A área de ocorrência da erva-mate abrange, aproximadamente, 540.000 mil km², podendo ser encontrada no Brasil, na Argentina e no Paraguai. No Brasil, sua dispersão natural está centralizada nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, e em menores proporções, nos estados de Minas Gerais e São Paulo (ANDRADE, 2002).

A região sul do Brasil é considerada a maior produtora nacional de folha verde com uma produção média de 347 toneladas/ano. O estado do Paraná tem liderado a produção com 86,39%, enquanto que Santa Catarina produz 8,32%, Rio Grande do Sul 5,24% e Mato Grosso do Sul 0,05% (IBGE, 2018).

Na região de ocorrência da espécie, o cultivo da erva-mate é uma atividade com importância na geração de emprego e renda aos produtores rurais (BERGER, 2006). A colheita da cultura se caracteriza pela remoção dos ramos e galhos para o aproveitamento dos ramos finos e folhas, os quais são largamente utilizados para produção de diversas bebidas como o chimarrão (FLEIG, 2003).

Nos últimos anos foram encontrados alguns problemas fitossanitários nos ervais, como a podridão-de-raízes. No Brasil, a podridão-de-raízes é considerada a principal doença da erva-mate, atacando desde plântulas, mudas nos viveiros, a árvores adultas em ervais. A doença é ocasionada,

principalmente, pelo gênero fúngico *Fusarium*, o qual provoca danos no sistema radicular e, na maioria das vezes, causa a morte da planta (POLETTO *et al.*, 2015).

2.2 PODRIDÃO-DE-RAÍZES

Entre as principais doenças da erva-mate está a podridão-de-raízes, que foi descrita no Brasil, primeiramente, por Grigoletti e Auer (2001), em ervais localizados no estado do Paraná. Poletto *et al.* (2006) constaram a podridão-de-raízes em plantações no Rio Grande do Sul, no ano de 2004, em municípios pertencentes à região do Vale do Taquari.

Grigoletti Junior *et al.* (1996) afirmam que fungos do gênero *Fusarium* são os principais patógenos associados à doença podridão-de-raízes. Essa doença em erva-mate é observada, em muitos casos, em reboleiras de tamanho variável, mas, ocasionalmente, as plantas com sintomas ou mortas apresentam-se espalhadas por todo erval (POLETTO *et al.*, 2006). Alguns sintomas como a estagnação do crescimento, a queda excessiva de folhas, o amarelecimento ascendente das folhas, a morte parcial e, em estágios mais avançados da doença, a morte total, são observados na parte aérea das plantas. O patógeno, contudo, encontra-se no sistema radicular provocando, primeiramente, manchas necróticas na superfície das raízes e estrias escuras no xilema, avançando para necrose total desses tecidos (POLETTO *et al.*, 2006; POLETTO *et al.*, 2007).

A podridão-de-raízes acontece de forma distanciada em mudas já transplantadas ou na sementeira. Os sintomas reflexos predominantes são observados na parte aérea da planta como a estagnação do crescimento, a murcha, o amarelecimento foliar, a queima e a seca de folhas que começam a partir da extremidade do limbo, e, por último, a morte da muda. No sistema radicular, ocorre a inibição do crescimento, escurecimento e necrose das raízes (POLETTO *et al.*, 2015).

Entre os fatores que predispõem as plantas à podridão-de-raízes, pode-se citar a composição física do substrato, a umidade inadequada e a contaminação de recipientes das mudas e do próprio substrato. Como medidas preventivas de controle da doença, podem ser adotadas a desinfestação do substrato e o manejo correto da água. Do mesmo modo, é pertinente fazer a retirada de plântulas sintomáticas para prevenir a disseminação do patógeno (GRIGOLETTI JUNIOR *et al.*, 1996).

2.3 O GÊNERO *Fusarium*

O gênero *Fusarium* pertence à família Nectriaceae e, atualmente, está na ordem Hypocreales, classe Sordariomycetes, filo Ascomycota. O fungo foi classificado e descrito pela primeira vez em 1809 pelo micólogo alemão Link. Atualmente, já foram identificadas em torno de 895 espécies e subespécies pertencentes ao gênero, sendo essas encontradas nos alimentos, nas plantas, no solo e no ar (INDEX FUNGORUM, 2020).

Devido à ampla distribuição geográfica e aos sérios problemas econômicos ocasionados pela ação como fitopatógeno, *Fusarium* é um dos gêneros mais estudados. A alta distribuição geográfica combinada com sua densidade populacional pode estar relacionada ao clima, à microbiota, aos nutrientes, ao tipo de vegetação e ao solo (SAREMI *et al.*, 1999).

A ocorrência de *Fusarium* spp. é um dos problemas mais restritivos em viveiros, pois esse patógeno é de difícil controle, já que o fungo é habitante nativo do solo e apresenta comportamento cosmopolita. Há relatos da combinação desse patógeno com várias espécies como a erva-mate, na qual o fungo causa deterioração e escurecimento do sistema radicular (POLETTTO, 2008).

O gênero *Fusarium* apresenta grande variabilidade genética em nível de espécies, fazendo-se necessária a utilização de ferramentas que viabilizem a diferenciação entre populações do fungo. O gênero possui diferentes características morfológicas, de virulência e patogenicidade, o que resulta em uma classificação em seções, *forma especiales* e raças (OLIVEIRA; COSTA, 2002).

A indispensabilidade do reconhecimento de espécies de *Fusarium*, responsáveis por causar determinadas doenças, faz com que sejam necessários profundos estudos levando em conta características morfológicas e moleculares dos isolados pertencentes ao gênero. Para a identificação de *Fusarium* devem ser compreendidos três conceitos de espécies: o biológico, fundado na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie; o filogenético, que é caracterizado com base na análise de sequências gênicas; e o morfológico, fundado na similaridade dos caracteres observados, denominados de marcadores morfológicos (O'DONNELL *et al.*, 2000; SUMMERELL *et al.*, 2006).

O *damping-off* e as podridões radiculares causadas por *Fusarium* spp. são constatadas em espécies como *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. cultivados no Brasil (KRUGNER; AUER, 2005). Além disso, espécies de *Fusarium* spp. também são patógenos de sementes de erva-mate (POLETTTO *et al.*, 2005). Segundo Maciel (2012), em plântulas de *Pinus elliottii* os principais sintomas

observados foram o tombamento, a murcha, o apodrecimento dos cotilédones e a lesão seguida de ruptura do hipocótilo, em decorrência da infecção das sementes com *F. sambucinum*.

Poletto *et al.* (2006) ao realizar o zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate na região do Vale do Taquarí, RS, identificou espécies do gênero *Fusarium*, predominando *Fusarium oxysporum* Schlecht. e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., presentes em todos os municípios amostrados. As árvores inspecionadas apresentaram sintomas de amarelamento das folhas, estagnação do crescimento, queda excessiva das folhas mais velhas, morte parcial (de alguns galhos da planta) e, em casos mais adiantados da doença, morte total da planta.

Mezzomo *et al.* (2018) ao caracterizar morfológicamente isolados de *Fusarium* spp. coletados em plantas doentes de erva-mate, encontrou 39 isolados obtidos a partir de necroses das raízes e em viveiros produtores a partir de mudas com sintomas de tombamento. Os principais sintomas observados foram amarelecimento do ápice e das folhas, amarelecimento seguido de encarquilhamento e posterior necrose das folhas.

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico é a capacidade de um organismo patogênico ou das características de uma doença causada por um patógeno serem reduzidas e/ou serem limitadas à sua quantidade, à viabilidade e ao desenvolvimento por certos organismos antagonistas. Nesse sentido, um organismo pode ser considerado biostático quando acaba por inibir as atividades do outro ou biocida quando ocasiona a morte do outro (ZAMBOLIM, 2010).

A utilização de microrganismos antagonistas apresenta-se como uma excelente possibilidade de manejo do ecossistema da erva-mate, de forma sustentável e ecológica. Dessa forma, o controle biológico constitui uma alternativa para a redução da aplicação de fungicidas químicos e também quando outros tipos de controle (cultural e genético) não são viáveis, já que muitas vezes esses microrganismos antagonistas apresentam persistência no campo onde foram introduzidos e efeito a longo prazo (MEDEIROS *et al.*, 2018).

O termo antagonista, na Fitopatologia, é dado a todos os organismos capazes de intervir no metabolismo e no desenvolvimento de outros organismos. Os fungos antagonistas, mesmo que indiretamente, reduzem as chances de desenvolvimento de patógenos resistentes, já que no período

de desenvolvimento submetem os agentes etiológicos a várias formas de combate (RIBEIRO, 2009). Diversos tipos de organismos são usados no controle biológico como fungos, plantas, bactérias ou animais. *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. são os fungos mais utilizados nesse tipo de controle (MORANDI; BETTIOL, 2009).

O sucesso desses antagonistas deve-se aos variados mecanismos empregados por eles para “vencer” o agente patogênico. Vários estudos têm comprovado que mecanismos como antibiose, parasitismo, predação e competição podem ser empregados simultaneamente pelo antagonista frente a um agente patogênico *in vitro*. Além dos anteriormente citados, pode-se destacar ainda a indução de resistência e a hipovirulência em plantas (MEYER *et al.*, 2019).

2.5 *Trichoderma* spp. COMO AGENTES ANTAGONISTAS E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS

O gênero *Trichoderma* spp. pertence à subdivisão *Deuteromycotina*, ordem *Hifomicetes* e família *Moniliaceae*. A classificação dos isolados em espécies é difícil devido a elas apresentarem características muito semelhantes, que se sobrepõem dentro de um mesmo grupo ou seção (MELO, 1991). *Trichoderma* spp. abrange um conjunto de fungos saprófitas microparasitas ativos da microbiota do solo e é largamente empregado no controle biológico (DRUZHININA *et al.*, 2011).

As espécies de fungos do gênero *Trichoderma* vêm sendo as mais utilizadas no controle de fitopatógenos através do controle biológico, por serem facilmente encontradas e cultivadas, por apresentarem rápido crescimento e por não serem patogênicos para as plantas e para o homem. São capazes de inibir os fungos fitopatógenos por parasitismo, produção de metabólitos secundários, competição e microparasitismo de estruturas dos patógenos, como esporos e escleródios, que são de difícil destruição (MACHADO *et al.*, 2012).

Fungos do gênero *Trichoderma* fazem parte dos principais microrganismos de importância para o aumento do crescimento vegetal. Este fungo pode influenciar positivamente na germinação de sementes, no desenvolvimento e rendimento da cultura devido, também, à produção de substâncias promotoras de crescimento e melhoria na nutrição das plantas, principalmente pela solubilização de fósforo (OLIVEIRA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012) e síntese de ácido indol acético (OLIVEIRA *et al.*, 2012; CHAGAS *et al.*, 2016). Pela importância da ação de biocontrole, as pesquisas que envolvem o gênero *Trichoderma* têm aumentado significativamente devido às

facilidades de isolamento e quantificação de propágulos em meios de cultura (PAPAVIZAS, 1982), assim como o desenvolvimento de novas técnicas de sobrevivência e proliferação desses microrganismos no solo e na rizosfera (CHAO *et al.*, 1986) e, ainda, à existência de novos biotipos resistentes a fungicidas (ADB-ELMOITY *et al.*, 1982; PAPAVIZAS, 1982).

Vários isolados de *Trichoderma* spp. dispõem de crescimento acelerado, formando esporos e antibióticos. Esses atributos transformam esses fungos em organismos ecologicamente bem sucedidos, capazes de serem encontrados em restos culturais, solos, ar, sementes e raízes de muitas espécies vegetais. Bastante empregado na agricultura e na indústria, esse microrganismo dispõe de simples reprodução, pela ampla quantidade de conídios que produz e pelas diferentes formulações possíveis, como seca (granulado e pó molhável) e líquida (água e óleo) (MILANESI *et al.*, 2013).

Em estudos *in vitro*, isolados comerciais de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum* reduziram o crescimento micelial de isolados *Phytophthora palmivora* de pupunheira (*Bactris gasipaes*) em até 94%. As aplicações preventivas *in vivo* de *T. harzianum* e *T. asperellum* proporcionaram menor incidência da doença e maior sobrevivência de mudas, além do efeito adicional em altura, diâmetro do colo e no peso fresco das raízes. Em plantas adultas, as touceiras sintomáticas tratadas com *Trichoderma* mostraram redução da incidência e severidade da doença (FUZITANI, 2018)

Ethur *et al.* (2008) relataram que a incorporação de *T. harzianum* em substrato que estava sendo cultivado com pepineiro (*Cucumis sativus*) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*) diminuiu a população de *Fusarium solani* e *F. oxysporum*, e foi eficaz na redução da fusariose nessas culturas. Além disso, a incorporação também influenciou no estabelecimento e no aumento da densidade populacional de *Trichoderma* spp. na rizosfera durante o ciclo das culturas. Menezes *et al.* (2010), avaliando a introdução de diversos isolados de *Trichoderma* spp. ao substrato para o controle biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, causador de murcha-vascular em crisântemo (*Dendranthema grandiflora*), obtiveram 100% de controle com o isolado UFSMT15.1. Chagas Junior *et al.* (2018), ao testar 50 isolados de *Trichoderma* spp. pelo teste de pareamento de culturas sobre *Fusarium* sp., observaram que 41 isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial.

O sucesso no uso de organismos antagonistas no controle de doenças está relacionado ao conhecimento da ecologia e fisiologia. É necessário saber qual é o nível de resistência suportado pelo antagonista, como é seu comportamento e crescimento em diferentes substratos, qual sua

resistência à produtos químicos e como é a relação entre patógeno, hospedeiro e o ambiente em que ambos estão inseridos (solo, planta, etc.) (MORANDI *et al.*, 2014).

A influência de micro-organismos sobre o desenvolvimento das plantas é ampla, incluindo os efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plântulas, crescimento e produtividade de grãos. A utilização de promotores de crescimento de plantas para o aumento de produções agrícolas e na silvicultura será provavelmente uma das táticas mais importantes para a atualidade no mundo. Isso se deve à demanda emergente para a diminuição da dependência de fertilizantes minerais e da necessidade para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável (MACHADO *et al.*, 2012).

A produção de inoculantes de baixo custo com microrganismos promotores de crescimento de plantas é uma alternativa para diminuir os riscos ambientais causados pela utilização inadequada e, às vezes, excessiva de insumos e agrotóxicos. Os promotores de crescimento das plantas também contribuem para aumentar a produção agrícola, tornar o produto mais competitivo e diferenciado, e, ainda, diminuir os custos para o produtor (POMELLA; RIBEIRO, 2009; MACHADO *et al.*, 2012).

Trichoderma spp. também podem estimular a indução de resistência sistêmica contra patógenos, melhorando a parede celular e alterando as reações fisiológicas-bioquímicas das plantas, levando à síntese de compostos relacionados à defesa que se envolvem no mecanismo de resistência (CHRISTOPHER *et al.*, 2010). Segundo Choudhary *et al.* (2007), a indução de resistência pode ser considerada um estado fisiológico que aumenta a capacidade de defesa ativada por estímulos específicos, onde a defesa natural vegetal é potencializada contra desafios bióticos. A possibilidade da ativação dos genes responsáveis por esses mecanismos de resistência criou oportunidades para os estudos envolvendo a indução de resistência em plantas (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Khaledi e Taheri (2016) realizaram estudos para averiguar o controle de *Macrophomina phaseolina* em plantas de soja (*Glycine max*). Os resultados de casa-de-vegetação mostraram que o tratamento de sementes com *Trichoderma* sp. foi eficaz em reduzir a severidade da doença e que, apesar de ter sido verificado efeito direto dos isolados de *T. harzianum* sobre *M. phaseolina*, o aumento no conteúdo fenólico e na atividade da peroxidase sugerem que parte do controle pode estar relacionado à indução de resistência.

Silva *et al.* (2012), ao aplicarem diferentes espécies de *Trichoderma* no solo, observaram que promoveram a ativação da resistência sistêmica em pepineiro (*Cucumis sativus*) contra a antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) pelo aumento da atividade enzimática das plantas, respondendo ao ataque patogênico na parte aérea. Muthukumar *et al.* (2011) também verificaram a indução de resistência por *T. viride* contra o tombamento de plântulas de pimenta (*Capsicum annum*), ocasionada pelo patógeno de solo *Pythium aphanidermatum*.

Desse modo, *Trichoderma* contribui em incremento no crescimento das plantas, na resistência às doenças e na tolerância aos estresses abióticos, além de possuir habilidade de crescer dentro e fora das raízes, provocando uma resposta sistêmica que a planta é capaz de ativar na presença de estresses bióticos e abióticos (RUBIO *et al.*, 2014).

2.6 REFERÊNCIAS

ADB-EL MOITY, T. H.; PAPAVIDAS, G. L.; SHATLA, M. N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 4, p. 394 - 400, 1982. Disponível em: <https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_396.PDF>. Acesso em: 02 nov. 2021.

ANDRADE, F. M. Exploração, manejo e potencial socioeconômico da erva-mate. In: SIMOES, L. L.; LINO, F. C. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestas**. São Paulo: Ed. SENAC, 2002.

BERGER, G. **Biomassa em plantios de erva-mate (*Ilexparaguariensis* A. St. Hil.), no município de Nova Prata, RS**. 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

BRITO, F. C. *et al.* **Estágios de maturação dos frutos de erva-mate, *Ilex paraguariensis***. Colombo, PR: Embrapa, 2019. 10p. (EMBRAPA. Comunicado Técnico, 433).

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Agri-Environmental Sciences**, Palmas-TO, v. 4, n. 2, 2018. Disponível em: <<https://revista.unitins.br/index.php/agri-environmental-sciences/article/view/420>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

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**, São Paulo-SP, v. 38, n. 4, p. 1 - 11, 2016. Disponível em:

<<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201700179116>>. Acesso em: 14 nov. 2021.

CHAO, W. L. *et al.* Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 1, p. 60 - 65, Jan. 1986. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2002.01523.x>>. Acesso em: 29 out. 2021.

CHOUDHARY, D. K.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 289 - 297, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3450033/>>. Acesso em: 05 dez. 2021.

CHRISTOPHER J., SUTHINRAJ T., USHARANI S., UDHAYAKUMAR R. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum f sp. Lycopersici*. **Journal of Biopesticides**, v. 3, n. 1, 2010. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133182471>>. Acesso em: 18 dez. 2021.

DRUZHININA, I. S. *et al.* *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, p. 794 - 759, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro2637>>. Acesso em: 01 nov. 2021.

ETHUR, L. Z. *et al.* Presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico cultivado com tomateiro e pepineiro, em horta e estufa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.19 - 26, 2008. Disponível em: <https://oasisbr.ibict.br/vufind/Record/UFSM-2_0a2627dad9ffa07f27e22ee8b1e02943>. Acesso em: 29 dez. 2021.

FLEIG, F. D.; SCHNEIDER, P. R. ; FINGER, C. A. G. Influência do espaçamento e idade da brotação na morfometria de povoamentos de *Ilex paraguariensis* St. Hill. **Ciência Florestal**, v. 13, n.1, p. 73 - 88, 2003. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1725>>. Acesso em: 05 dez. 2021.

FUZITANI, E. J. **Controle Biológico da podridão da base do estipe (*Phytophthora palmivora*) em pupunheira com espécies de *Trichoderma***. 2018. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Podridão de raízes em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) causada por *Fusarium* sp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, 2001. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes//publicacao/307300/podridao-de-raizes-em-erva-mate-ilex-paraguariensis-causadapor-fusarium-sp>>. Acesso em: 16 nov. 2021.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; MASCHIO, L. M. A. Doenças em erva-mate (*Ilexparaguariensis* A. St.-Hill) na região sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 32/33, p. 43 - 51, Embrapa Florestas. Colombo, 1996. Disponível em: <<http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/doen%C3%A7as%20erva%20mate.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2021.

IBGE. **Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Produção da extração vegetal e silvicultura, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>>. Acesso em: 22 out. 2021.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp?strGenus=Fusarium>. Acesso em: 06 jun. 2020.

KHALEDI, N.; TAHERI, P. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 56, n. 1, p. 21 - 31, 2016. Disponível em: <<http://www.plantprotection.pl/Biocontrol-mechanisms-of-Trichoderma-harzianum-against-soybean-charcoal-rot-caused,93994,0,2.html>>. Acesso em: 11 dez. 2021.

KRUGNER, T. L., AUER, C. G. Doenças dos pinheiros (*Pinus* spp.). In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**, 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005, v. 2, p. 517 - 522. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103417/1/cap07.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2021.

MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, 1, jun. 2012. Disponível em: <<https://revistas.rcaap.pt/index.php/rca/article/view/16182>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

MACIEL, C. G. ***Fusariumsambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle.** 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, 2012.

MENEZES, J. P. *et al.* Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132 - 139, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cagro/a/HjR9qvpt4zCnxFnmbQNQGcg/?lang=pt>>. Acesso em: 05 out. 2021.

MAZUCHOWSKI J. Z. **Manual da Erva-mate (*Ilexparaguariensis* St. Hill).** Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural – EMATER-Paraná: Curitiba, Brasil, 1991. 2ª ed. 104 p.

MEDEIROS, F. H.V. de; SILVA, J. C. P da; PASCHOLATI, S. F. Controle Biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos** 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. p. 261 - 274. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/002905536>>. Acesso em: 02 nov. 2021.

MELO, I. S. Potencialidades da utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas.** Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, 1991. p. 135 - 156.

MEYER, M.C. *et al.* **Trichoderma: uso na agricultura**. 1 ed. Brasília Embrapa Soja, 2019, 538 p.

MEZZOMO, R. *et al.* Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to *Ilex paraguariensis*. **Cerne**, v. 24, n. 3, p. 209 - 218, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cerne/a/QgknMh4mthmdVqsZqrLq3HM/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 08 dez. 2021.

MILANESI, P. M. *et al.* Detecção de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e antagonismo de *Trichoderma* sp. em soja sob plantio direto. **Semina. Ciências Agrárias (Online)**, v. 34, 2013. Disponível em: <<https://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/12043/13619>>. Acesso em: 24 dez. 2021.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W.; JÚNIOR, T. J. P. Controle biológico de doenças em plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JÚNIOR, W.C.J.; RODRIGUES, F.A. **O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas**. 22 ed., Viçosa, MG: UFV, DFP, 2014. p. 177 - 225.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2009, p.07 - 17.

MUTHUKUMAR, A.; ESWARAN, A.; SANGEETHA, G. Induction of systemic resistance by mixtures of fungal and endophytic bacterial isolates against *Pythium aphanidermatum*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 5, p. 1933 - 1944, 2011. Disponível em: <<https://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-87c08934-1c1d-4237-9180-fc407d7fd28d>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v. 92, n. 5, p. 919 - 938, 2000. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3761588?seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em: 11 nov. 2021.

OLIVEIRA, A. G. *et al.* Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 7, n. 3, p. 149 - 155, 2012. Disponível em: <<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/1338>>. Acesso em: 04 nov. 2021.

OLIVEIRA, V. C; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* sp. *phaseoli* de *F. solani* sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 631 - 634, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010041582002000600013>. Acesso em 27 nov. 2021.

PAPAVIZAS, G. C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and pea and bean rhizospheres. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 121 - 125, Jan. 1982. Disponível em: <<https://www.cabi.org/ISC/abstract/19821383087>>. Acesso em: 16 dez. 2021.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Ceres, 2018. p. 424 - 450.

POLETTI, Igor *et al.* Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, v. 25, p. 281 - 291, 2015. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/18445>>. Acesso em: 05 dez. 2021.

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

POLETTI, I. *et al.* Primeira ocorrência de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. causando podridão-de-raízes em ervais no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 1, p. 65 - 71, 2007. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1936>>. Acesso em 22 nov. 2021.

POLETTI, I. *et al.* Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. st.-hil.) na região do Vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1 - 10, 2006. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1882>>. Acesso em: 05 dez. 2021.

POLETTI, I. *et al.* Ocorrência de *Fusarium* sp. causando mortalidade de mudas de erva-mate em viveiro na região alta do Vale do Taquari, RS. In: SEMINÁRIO SOBRE REFLORESTAMENTO E RECUPERAÇÃO AMBIENTAL: ambiente e tecnologia: o desenvolvimento sustentável, 2005, Lajeado. **Anais...** Lajeado: UNIVATES, 2005. p. 126 - 132.

POMELLA; A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 239 - 244.

RIBEIRO, T. da S. **O fungo *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos: Dificuldades e perspectivas**. 2009. 26 p. Monografia (Especialização) – Pósgraduação Latu Sensu Tecnologias Inovadoras no Manejo Integrado de Pragas e Doenças de Plantas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RUBIO, M. B. *et al.* Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1864 - 1873, 2014. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.03375-13>>. Acesso em: 05 dez. 2021.

SAREMI, H. *et al.* Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 941 - 947, 1999. Disponível em:

<https://www.academia.edu/24040874/Temperature_effects_on_the_relative_abundance_of_Fusarium_species_in_a_model_plant_soil_ecosystem>. Acesso em 13 nov. 2021.

SILVA, V. N. *et al.* Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 12, p. 1609 -1618, 2012. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/pab/a/KKPwCh9KBsbPfXQsGTKqKfj/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 05 nov. 2021.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **PlantDisease**, Minnesota, v. 87, n. 2, p. 117 - 128, 2006. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2003.87.2.117>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

ZAMBOLIM, L. **Manejo Integrado de Doenças de Plantas**. Viçosa – MG. 2010. 80 p. Disponível em: <<https://www.ebah.com.br/content/ABAAAg7-0AD/manejointegrado-doencas-plantas>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

3 CAPÍTULO I - *Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE *in vitro* DE *Fusarium oxysporum* E *Fusarium solani*

Resumo: *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* são patógenos causadores da podridão-de-raízes em erva-mate e ainda não existe uma forma eficaz de controle. Devido às características desses patógenos, o controle biológico pode ser uma medida promissora de manejo. O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e caracterizar *Trichoderma* spp. associados a rizosfera de *Ilex paraguariensis*, bem como avaliar a ação desses isolados no controle *in vitro* de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, agentes causais da podridão-de-raízes. Fungos do gênero *Trichoderma* spp. foram isolados do solo por meio da técnica de diluição seriada, após foram identificados molecularmente, utilizando a região espaçador transcrito interno (ITS), o fator de alongação (TEF-1 α), o segmento do gene da RNA polimerase II subunidade 2 (RPB2) e, posteriormente, os mesmos foram caracterizados morfológicamente. A ação antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp. obtidos do solo rizosférico foi avaliada por meio do pareamento de culturas e pela técnica de metabólitos voláteis sobre *F. oxysporum* e *F. solani*. Os isolados obtidos do solo foram identificados molecularmente como pertencentes às espécies *T. asperelloides*, *T. hamatum* e *T. koningiopsis*. Os isolados testados diminuíram o crescimento micelial de *F. oxysporum* (I6AR2) e *F. solani* (I8AR1) no teste de pareamento de culturas, com inibição entre 13,59% (I6AR2 x AJII) e 30,17% (I8AR1 x AVRIII), bem como por metabólitos voláteis com variação de 28,32% (I6AR2 x PVZII) a 57,71% (I8AR1 x AJII). Com isso, pôde-se observar que os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram resultados positivos na ação antagonista *in vitro* contra *F. oxysporum* e *F. solani*, demonstrando potencial para o controle dos patógenos causadores de podridão-de-raízes em erva-mate.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Pareamento de culturas. Metabólitos voláteis.

Trichoderma spp. IN THE *in vitro* BIOCONTROL OF *Fusarium oxysporum* AND *Fusarium solani*

Abstract: *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* are pathogens that cause root rot in different species and for this disease in yerba mate, there is still no effective way to control it. Due to the characteristics of these pathogens, biological control can be a promising management measure. The objective of this work was to identify and characterize *Trichoderma* spp. associated with the rhizosphere of *Ilex paraguariensis*, as well as evaluating the action of these isolates in the *in vitro* control of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, causal agents of root rot. Fungi of the genus *Trichoderma* spp. were isolated from soil using the serial dilution technique, then molecularly identified using the internal transcribed spacer region (ITS), elongation factor (TEF-1 α) and RNA polymerase II subunit 2 (RPB2) gene segment and, later they were characterized morphologically. The antagonistic action of two *Trichoderma* spp. obtained from rhizospheric soil was evaluated by pairing cultures and by the technique of volatile metabolites on *F. oxysporum* and *F. solani*. The isolates obtained from the soil were molecularly identified as belonging to the species *T. asperelloides*, *T. hamatum* and *T. koningiopsis*. The tested isolates decreased the mycelial growth of *F. oxysporum* (I6AR2) and *F. solani* (I8AR1) in the culture pairing test, with inhibition between 13.59% (I6AR2 x AJII) and 30.17% (I8AR1 x AVRIII), as well as by volatile metabolites ranging from 28.32% (I6AR2 x PVZII) to 57.71% (I8AR1 x AJII). Thus, it can be seen that the isolates of

Trichoderma spp. showed positive results in the antagonist action in vitro against *F. oxysporum* and *F. solani*, demonstrating potential for the control of pathogens causing root rot in yerba mate.

Keywords: *Ilex paraguariensis*. Crop pairing. Volatile metabolites.

3.1 INTRODUÇÃO

Ilex paraguariensis A. St.-Hil, conhecida popularmente como erva-mate, pertence à família Aquifoliaceae, nativa do Paraguai, Brasil e Argentina, países considerados como os únicos produtores mundiais dessa espécie (RESENDE *et al.*, 2000), compreendendo, entre os três países, aproximadamente 540.000 km² de área de ocorrência natural (ANDRADE, 1999). A área brasileira corresponde a 450.000 km², representando cerca de 5% do território nacional e 3% da América do Sul (ROTTA; OLIVEIRA, 2007). No Brasil, estima-se que atualmente existem mais de 700 mil ha destinados ao cultivo da erva-mate, distribuídos em aproximadamente 480 municípios e com 180 mil propriedades. Grande parte da área cultivada se concentra na região Sul do país (MEDRADO; VILCAHUAMAN, 2014).

Devido à importância econômica e ao aumento das áreas de cultivo da erva-mate, o número de doenças relatadas para a cultura aumentou nos últimos anos, sobretudo as de origem fúngica. Essas doenças causam sérios danos à cultura, com redução da produtividade, da qualidade do produto final e até mesmo a morte das plantas nos ervais. Entre as doenças relatadas está a podridão-de-raízes causada por *Fusarium* spp., tendo como sintomas principais a ocorrência de necroses localizadas que logo evoluem para todas as raízes. Nas mudas, a morte acontece alguns dias depois de aparecerem os sintomas, atacando as plântulas na sementeira ou mudas já nas embalagens (POLETTTO *et al.*, 2006; POLETTTO *et al.*, 2007). Várias espécies de *Fusarium* spp. causam podridão-de-raízes em ervais como, por exemplo, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. decemcellulare*, *F. tabacinum* e *F. tricinctum* identificadas por Poletto *et al.* (2006) em plantas adultas na região do Vale do Taquarí. Segundo esses autores, todas as espécies foram patogênicas quando inoculadas em plantas de erva-mate e *F. oxysporum* e *F. solani* foram os fungos mais comuns.

O controle de fungos do gênero *Fusarium* com fungicidas químicos é difícil de ser obtido, por eles serem habitantes nativos do solo e apresentarem comportamento cosmopolita (GRIGOLETTI; AUER, 1996). Além disso, o uso de fungicidas pode causar prejuízos como a

contaminação ambiental, o desequilíbrio da biota natural do solo e 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 (SANCHEZ *et al.*, 2019), 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 à doenças (CHEN *et al.*, 2016). Além disso, fungos do gênero *Trichoderma* spp. destacam-se por atuarem de diversas formas sobre o patógeno, e também por possuírem mecanismos que auxiliam na promoção do crescimento das plantas (CHAGAS *et al.*, 2017; MILANESI *et al.*, 2013).

No controle biológico, é necessário que se tenha conhecimento prévio acerca dos antagonistas e da sua forma de ação sobre os patógenos envolvidos, para que se estabeleça métodos de controle ou de prevenção de quaisquer doenças. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e caracterizar *Trichoderma* spp. associados a rizosfera de *Ilex paraguariensis*, bem como avaliar a ação desses isolados no controle *in vitro* de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, agentes causais da podridão-de-raízes.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de realização dos experimentos e origem dos isolados fúngicos

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária (DCF), Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Os isolados de *Fusarium* spp. utilizados neste estudo (Tabela 1) estavam armazenados na coleção de culturas na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi. Eles encontram-se identificados em nível de espécie através de análise molecular e conservados em tubos eppendorf contendo água destilada e esterilizada. Tais isolados foram obtidos de raízes de plantas adultas de

erva-mate com sintomas de podridão-de-raízes, de plantios localizados no município de Ilópolis, Rio Grande do Sul (MEZZOMO *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Isolado, espécie, data da coleta, município, estado, coordenadas e código do Genbank e SisGen dos isolados patogênicos que serão utilizados

Isolado	Espécie	Data da coleta	Município / Estado	Coordenadas (GMS)	Número de acesso no GenBank	Número do cadastro do SisGen
I6AR2	<i>Fusarium oxysporum</i>	jan/15	Ilópolis - RS	28°53'58,1" S 52°04'48,0" W	MF318446	AE050F7
I8AR1	<i>Fusarium solani</i>	jan/15	Ilópolis - RS	28°55'48,6" S 52°10'40,1" W	MF318442	AE050F7

Fonte: Autores.

Para obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp., foram coletadas amostras de solo rizosférico de plantas adultas de erva-mate localizadas em diferentes municípios do Rio Grande do Sul (Tabela 2). Todos os locais de coleta foram georreferenciados com o auxílio de um GPS (Global Positioning System).

As amostras de solo rizosférico coletadas foram devidamente identificadas, de acordo com o município e local de coleta, e encaminhadas para o Laboratório. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas e, para tanto, utilizadas 10 g de solo de cada amostra, diluídas em 90 mL de água destilada e esterilizada acrescida de duas gotas do emulsificante Tween 80[®]. A suspensão foi agitada por três minutos em agitador magnético e, dessa suspensão, foram realizadas diluições seriadas até a diluição 10⁻⁵. De cada uma das diluições, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL⁻¹ distribuída em seis placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acrescido com 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio. As placas foram colocadas em câmara de incubação, do tipo BOD por sete dias com temperatura de 25 °C (± 2 °C) e fotoperíodo de 12 h. Transcorrido o período de incubação, pequenas porções do micélio foram observadas em microscópio óptico para verificação da presença de estruturas morfológicas do gênero *Trichoderma*. Em caso positivo, estruturas do fungo foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA sob as mesmas condições de incubação descritas acima (ALFENAS; MAFIA 2007). Após sete dias de crescimento, os isolados foram purificados

conforme a técnica de cultura monospórica (FERNANDES, 1993), para manutenção das características antagônicas dos fungos para posterior utilização.

Tabela 2 - Isolado, data de coleta, município, estado, coordenadas geográficas e código do SisGen dos isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de solo rizosférico de plantios de erva-mate

Isolado	Data de Coleta	Município / Estado	Coordenadas (GMS)	Número de cadastro do SisGen
ACI	12/03/2020	Anta Gorda / RS	28°59'386" S 52°04'660" W	AE00C37
AJII	12/03/2020	Anta Gorda / RS	28°57'985" S 51°59'492" W	AE00C37
AVRIII	12/03/2020	Anta Gorda / RS	28°57'292" S 51°59'090" W	AE00C37
IJII	12/03/2020	Ilópolis / RS	28°58'094" S 52°09'038" W	AE00C37
IMDI	12/03/2020	Ilópolis / RS	28°55'398" S 52°09'096" W	AE00C37
PNII	12/03/2020	Putinga / RS	28°58'343" S 52°11'472" W	AE00C37
PVZII	12/03/2020	Putinga / RS	28°59'501" S 52°11'966" W	AE00C37

Fonte: Autores.

3.2.2 Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp.

A identificação molecular dos isolados foi realizada na Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada (ULRBMA) pertencente ao Instituto Biológico localizado em São Paulo/SP. A extração do DNA dos isolados foi realizada de acordo com método CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) descrito por Doyle e Doyle (1987) a partir do micélio do fungo cultivado em meio BDA e triturado em microtubos com auxílio de pistilo de plástico. O DNA genômico foi submetido à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) localizada entre os genes codificadores dos RNAs ribossomais 18S e 28S, de

segmento do gene codificador do fator de alongação da tradução 1 α (EF) e segmento do gene da RNA polimerase II subunidade 2. Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE *et al.*, 1990), para o fator de alongação foram tef71F (5' – CAAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC – 3') e tef997R (5' – CAGTACCGGCRGCRATRATSAG – 3') (SHOUKOUHI; BISSETT, 2008) e para a RNA polimerase foram RPB2-5F2 (5' – GGGGWGAYCAGAAGAAGGC – 3') (SUNG *et al.*, 2007) e RPB2-7cR (5' – CCCATRGCTTGYTTRCCCAT – 3') (LIU *et al.*, 1999). A PCR foi realizada empregando-se os primers na concentração final de 0,2 μ M, dNTPS a 0,2 mM, 1U da enzima GoTaq Green (Promega), em volume final de 50 μ L. O programa utilizado tanto para ITS quanto para EF foi: desnaturação inicial a 94 °C/2 min, 40 ciclos de 94 °C/30 s – 54 °C/30 s – 72 °C/40 s, extensão final a 72 °C/4 min. A verificação dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ; RIESNER, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 xL (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas com sequências de espécimes identificados por especialistas depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih), por meios da ferramenta Blastn.

3.2.3 Caracterização morfológica dos isolados de *Trichoderma* spp.

As culturas puras de *Trichoderma* spp. foram primeiramente transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidas a 25 °C (\pm 2 °C) com fotoperíodo de 12 h durante sete dias. Posteriormente, discos de aproximadamente 8 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias e transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA. Em seguida, as placas foram incubadas a 25 °C (\pm 2 °C) com fotoperíodo de 12 h. O crescimento micelial de cada isolado foi avaliado através da mensuração diária das colônias, com auxílio de um paquímetro digital. Foram realizadas medidas em sentidos diametralmente opostos até que um dos isolados preencheu a superfície do meio de cultura. Posteriormente, foi determinada a média de

crescimento para cada placa (mm/dia). Esses dados foram utilizados para o cálculo do IVCM (Índice de Velocidade de Crescimento Micelial) do fungo, empregando-se a fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = \sum ((D - D_a) / N), \text{ em que:} \quad (1)$$

IVCM = índice de velocidade de crescimento Micelial.

D = diâmetro médio atual da colônia.

D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior.

N = número de dias após a transferência.

As leituras foram realizadas após 24 h de instalação do experimento, até três dias após a instalação, que correspondeu à colonização total da superfície do meio de cultura. Para determinação do diâmetro da colônia (mm) foram aproveitadas as mesmas medidas anteriores.

A avaliação da coloração das colônias dos isolados foi realizada após sete dias de incubação das culturas puras em meio BDA a 25 °C (± 2 °C) e fotoperíodo de 12 h. Foram observadas as faces superiores das placas. A cor foi determinada com auxílio da cartilha de cores de Munsell Color (2009).

Para avaliação da esporulação, foi realizada a suspensão de esporos de cada isolado, através da adição de 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa. Após fez-se a raspagem das colônias com auxílio da alça de Drigalski e peneiramento em camada dupla de gaze. Na suspensão resultante foi adicionado Tween 80[®] e, logo após, foi realizada a estimativa da concentração de conídios (conídios mL⁻¹), com auxílio da câmara de Neubauer. Para a caracterização de conídios, foram confeccionadas lâminas com uma suspensão de conídios em água destilada esterilizada. A medição foi realizada em microscópio óptico, com micrômetro acoplado, na ocular de 40x. Para cada isolado foram caracterizados 60 conídios por meio da mensuração da largura e comprimento.

3.2.4 Teste de pareamento de culturas

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. contra os isolados de *Fusarium* spp. foi avaliado por meio de confronto direto. Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições, onde cada repetição foi composta por uma placa de Petri de 90 mm.

Os isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, armazenadas em câmara de incubação, do tipo BOD, a 25 °C (± 2 °C), com fotoperíodo de 12 h durante sete dias. Posteriormente, foram transferidos para placas de Petri (90 mm de diâmetro) a 0,5 cm da extremidade, contendo meio de cultura BDA, um disco de micélio de 8 mm de diâmetro retirados das bordas das colônias de *Fusarium* spp. As placas foram vedadas e incubadas a 25 °C (± 2 °C) durante 48 h. Após esse período, foram acrescentados discos de micélio (8 mm de diâmetro) de *Trichoderma* spp. na extremidade oposta das placas com os isolados de *Fusarium* spp., exceto no tratamento testemunha, no qual foi acrescentado apenas o patógeno em uma das extremidades da placa. Novamente, as placas foram vedadas e transferidas para câmara de incubação a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

Durante o tempo de incubação, foram realizadas medições diárias do diâmetro das colônias dos isolados de *Fusarium* spp., com auxílio de um paquímetro digital. O percentual de inibição médio do crescimento micelial foi calculado ao final do teste, conforme o método proposto por Jeyaseelan *et al.* (2012), através do cálculo:

$$\% \text{ inibição} = [(R1 - R2)/R1] \times 100, \text{ em que:} \quad (2)$$

% inibição = porcentagem de inibição.

R1 = crescimento radial da testemunha.

R2 = crescimento radial do tratamento.

Para avaliação do potencial de biocontrole de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* spp. foram adotadas duas escalas de notas. Uma delas, seguindo a escala de Bell *et al.* (1982) que se baseia na observação visual, atribuindo notas de 1 a 5, e outra seguindo a escala de Rodrigues (2010), que atribui notas variando de 1 a 7 (Tabela 3).

Tabela 3 - Escalas de notas a serem utilizadas no teste de pareamento de culturas

Notas	Escala de avaliação proposta por Bell et al. (1982)
1	Antagonista cresce e ocupa toda a placa.
2	Antagonista cresce e ocupa uma parte do patógeno (2/3 da placa).
3	Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa (nenhum domina o outro).
4	Patógeno cresce e ocupa uma parte do antagonista (2/3 da placa).
5	Patógeno cresce e ocupa toda a placa.

Notas	Escala de avaliação proposta por Rodrigues (2010)
1	Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco o patógeno.
2	Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não sobrepõe-se sobre o disco do patógeno.
3	Antagonista cresce sobre 3/4 da placa.
4	Antagonista cresce sobre 2/3 da placa.
5	Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa.
6	Patógeno cresce sobre 2/3 da placa.
7	Patógeno cresce por toda a placa de Petri.

Fonte: Autores.

3.2.5 Teste de metabólitos voláteis

Para avaliação do potencial inibidor de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* (I6AR2) e *Fusarium solani* (I8AR1), foram realizados ensaios baseados na metodologia descrita por El-Hasan *et al.* (2018), com adaptações. Foram utilizadas

seis repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída pela união de duas bases de placas de Petri.

Primeiramente, foi transferido um disco de meio de cultura de 8 mm de diâmetro contendo micélio de *Trichoderma* spp. no centro das placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio de cultura BDA. As placas foram vedadas e mantidas por sete dias em câmara de incubação a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h. Decorrido esse período de incubação, foi realizada a transferência dos isolados de *F. oxysporum* (I6AR2) e *F. solani* (I8AR1) no centro de novas placas de Petri, com as mesmas dimensões e também contendo meio de cultura BDA. Posteriormente, as placas contendo os antagonistas foram sobrepostas às de *Fusarium* spp. e unidas com parafilme, impedindo a saída dos metabólitos voláteis. As bases foram sobrepostas e armazenadas de maneira que as placas contendo o antagonista permanecessem na face inferior. As placas foram então transferidas para câmara de incubação sob as condições de temperatura e fotoperíodo citadas anteriormente por sete dias. Como testemunha, foi sobreposta uma base contendo o patógeno e outra contendo apenas meio BDA.

3.2.6 Procedimento estatístico

Para os testem em placa contra os fungos do gênero *Fusarium*, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o programa de análise estatística SISVAR (FERREIRA, 2014).

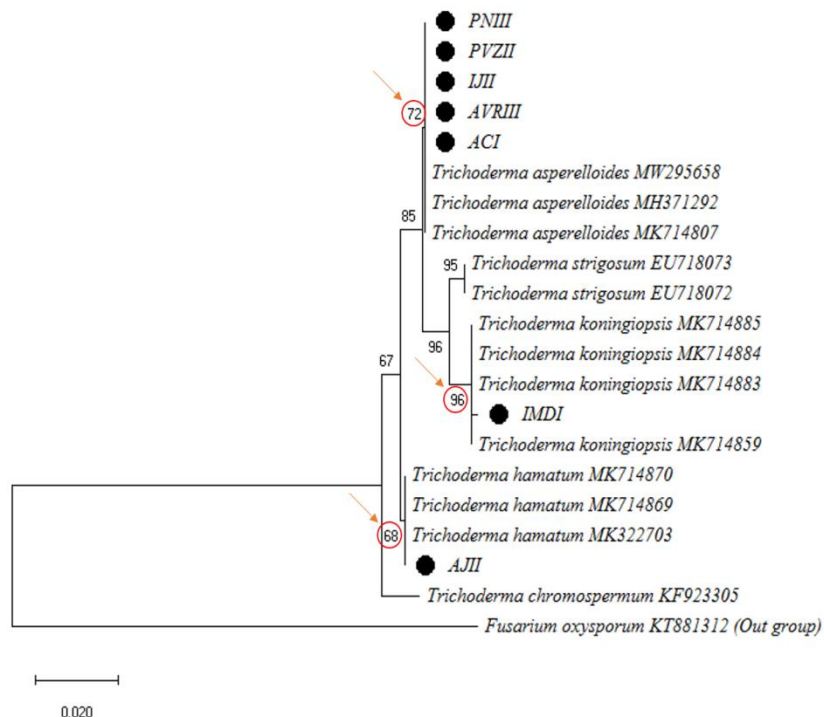
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

O sequenciamento da região Internal Transcribed Spacer (ITS) dos isolados de *Trichoderma* geraram sequências com tamanho variando de 585 a 610 pares de base. O dendrograma resultante da análise filogenética agrupou os isolados ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII num mesmo clado, juntamente com outras sequências de referência de *Trichoderma*

asperelloides. Para esse clado, o suporte estatístico *bootstrap* foi de 72% (Figura 1). O isolado AJII foi alocado em outro clado, juntamente com sequência de *Trichoderma hamatum* e o isolado de IMDI foi alocado no clado de *Trichoderma koningiopsis*. O suporte estatístico *bootstrap* foi de 68% e 96%, respectivamente (Figura 1). Com a realização da análise das sequências ITS, não foi possível definir com segurança as espécies de *Trichoderma* obtidas neste estudo. Geralmente, suportes estatísticos abaixo de 90% diminuem a confiabilidade da análise e impedem a definição precisa de espécies fúngicas, necessitando a complementação da análise com o sequenciamento de outras regiões genômicas conservadas, aumentando a confiabilidade da análise.

Figura 1 - Árvore filogenética obtida a partir da sequência da região Internal transcribed spacer (ITS), dos isolados de *Trichoderma* spp., obtidos de solo rizosférico de plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), mostrando as relações filogenéticas entre espécies de acordo com o método estatístico “Maximum Likelihood”, com o modelo Kimura 2-parameter. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições)

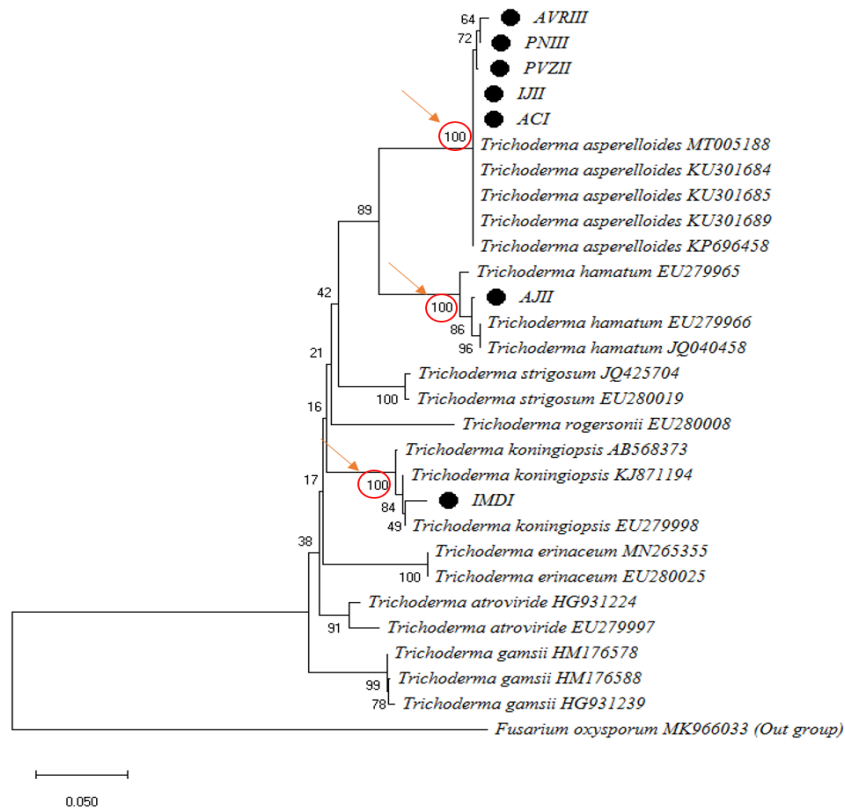


Fonte: Autores.

O sequenciamento do gene parcial Fator de alongação (*tef1*- a) gerou sequências com aproximadamente de 835 pares de base. O dendrograma resultante da análise filogenética agrupou

os isolados ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII em um mesmo clado, contendo sequências de referência de *Trichoderma asperelloides* (Figura 2). O suporte estatístico *bootstrap* para esse clado foi de 100%. O isolado AJII foi alocado no clado *Trichoderma hamatum*, e o isolado IMDI foi alocado no clado de *Trichoderma koningiopsis*. Ambos tiveram suporte de *bootstrap* de 100% (Figura 2).

Figura 2 - Árvore filogenética obtida a partir da sequência do gene parcial fator de alongação (*tefl-a*), dos isolados de *Trichoderma* spp., obtidos de solo rizosférico de plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), mostrando as relações filogenéticas entre espécies de acordo com o método estatístico “Maximum Likelihood”, com o modelo Kimura 2-parameter. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições)



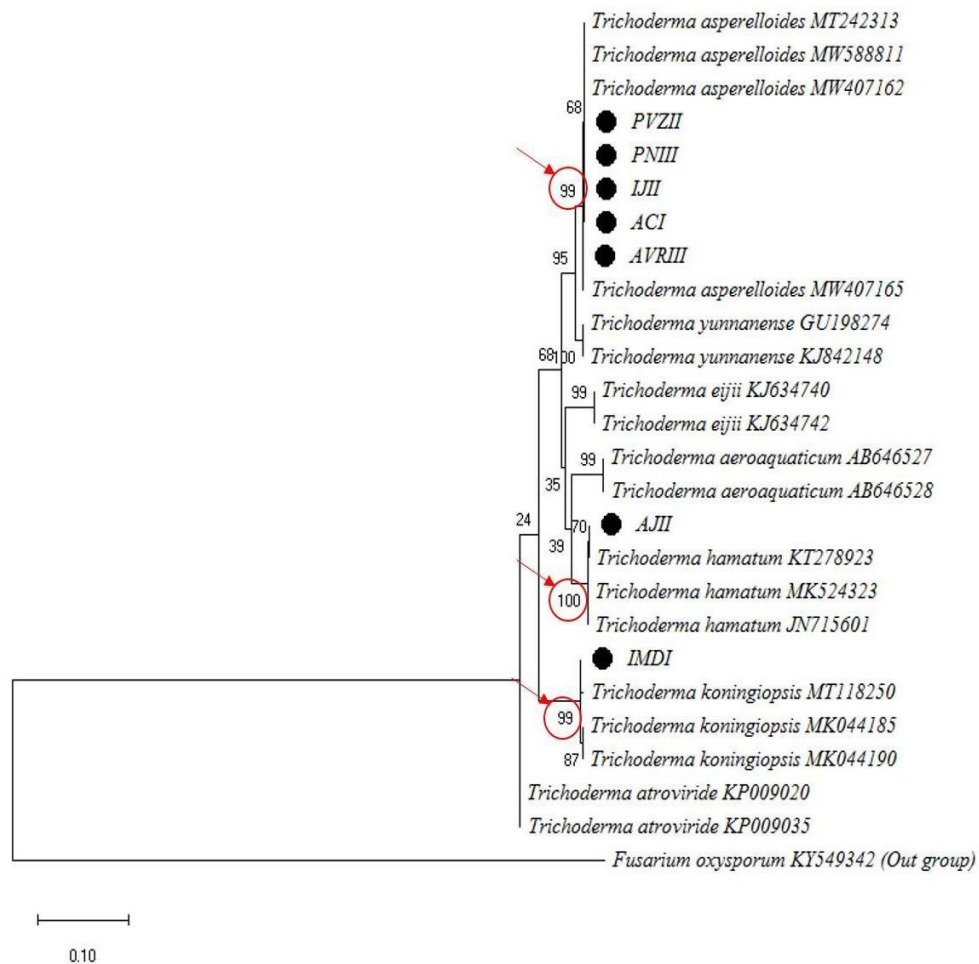
Fonte: Autores.

O sequenciamento do gene parcial RNA polimerase subunidade II (RPB2), gerou sequências com aproximadamente 850 pares de base. Observou-se no dendrograma filogenético que os isolados ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII foram alocados no mesmo clado contendo sequências de *Trichoderma asperelloides* (Figura 3). O suporte estatístico *bootstrap* para esse clado

foi de 99%. Já o isolado AJII foi alocado no clado de *Trichoderma hamatum*, e o isolado de IMDI foi alocado no clado de *Trichoderma koningiopsis*, ambos com suporte de *bootstrap* de 100 e 99%, respectivamente (Figura 3).

A realização da análise filogenética poligênica a partir do sequenciamento de uma região do RNA ribossomal (ITS) e mais dois genes parciais do DNA nuclear (RPB2 e *tef1-a*), permitiu a identificação precisa das espécies *T. asperelloides*, *T. hamatum* e *T. koningiopsis*, obtidas neste estudo.

Figura 3 - Árvore filogenética obtida a partir da sequência do gene parcial RNA polimerase subunidade II (RPB2), dos isolados de *Trichoderma* spp., obtidos de solo rizosférico de plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), mostrando as relações filogenéticas entre espécies de acordo com o método estatístico “Maximum Likelihood”, com o modelo Kimura 2-parameter. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições)



Fonte: Autores.

Avaliando os dados referentes à caracterização morfológica dos isolados de *Trichoderma* spp., verifica-se que houve diferença estatística entre os isolados de *Trichoderma asperelloides*, sendo que o isolado ACI obteve a melhor média com esporulação igual a $2,19 \times 10^8$ esporos mL^{-1} , diferenciando estatisticamente dos demais isolados da mesma espécie AVRII, IJII, PNIII e PVZII que alcançaram valores de $3,08 \times 10^7$, $7,02 \times 10^7$, $4,26 \times 10^7$ e $6,40 \times 10^7$, respectivamente (Tabela 4).

Para a variável diâmetro final das colônias, as maiores médias foram de 87,51, 89,87 e 89,29 mm, para os isolados AVRII, IMDI e PNIII, respectivamente. No entanto, os isolados PNIII e AVRIII não diferiram estatisticamente do isolado AJII com média igual a 86,77. O isolado IMDI também obteve o maior índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) com média igual a $19,67 \text{ mm dia}^{-1}$, diferenciando-se estatisticamente dos demais isolados analisados. Sharma e Singh (2014), ao caracterizarem e estimarem a variabilidade morfológica entre trinta isolados de *Trichoderma* spp. coletados da rizosfera de diferentes culturas, mostraram que todos os isolados atingiram diâmetros variando de 42,5 a 56,5 mm após 72 h a 25 °C. Já Krahn (2017), analisando 12 isolados de *Trichoderma* spp., observou que o diâmetro final das colônias ao final de sete dias apresentou médias variando entre 73,72 e 77,7 mm. Assim, pode-se afirmar que o crescimento micelial de isolados de *Trichoderma* spp. apresenta padrões específicos para cada isolado. O maior crescimento micelial não determina maior esporulação dos isolados fúngicos e a resposta dos isolados aos fatores analisados foram independentes quando comparados às mesmas espécies nos diferentes estudos.

Os isolados PVZII e IMDI apresentaram menores valores de comprimento dos conídios, 3,27 e 3,34 μm respectivamente, enquanto que o isolado AVRIII apresentou maior média, com 4,29 μm . Esses resultados corroboram com estudo de Anees *et al.* (2010) que, ao caracterizarem 16 isolados de *Trichoderma* spp., observaram que os conídios apresentaram medidas médias semelhantes às encontradas neste estudo.

Tabela 4 - Características morfológicas de isolados de *Trichoderma* spp. cultivados em meio BDA

Isolado	Esp. (esporos mL ⁻¹)	D.C. (mm)	IVCM (mm.dia ⁻¹)	Conídio		Coloração da colônia
				Comp. (µm)	Larg. (µm)	
ACI	2,19x10 ⁸ a*	86,00 cd	15,66 d	3,70 c	3,13 ab	Verde acinzentado
AJII	9,63x10 ⁴ c	86,77 bc	16,34 cd	3,59 c	2,95 bc	Branco
AVRIII	3,08x10 ⁷ bc	87,51 abc	17,32 bc	4,29 a	3,21 a	Cinza claro esverdeado
IJII	7,02x10 ⁷ b	85,85 cd	15,96 d	3,99 b	3,36 a	Verde claro
IMDI	3,33x10 ⁵ c	89,87 a	19,67 a	3,34 d	2,71 c	Branco
PNIII	4,26x10 ⁷ bc	89,29 ab	17,78 b	3,60 c	2,93 bc	Verde amarelado
PVZII	6,40x10 ⁷ b	83,32 d	15,75 d	3,27 d	2,80 c	Verde amarelado
CV (%)	50,76	1,87	3,30	3,65	4,62	-

Fonte: Autores.

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Esp.: Esporulação aos sete dias; D. C.: Diâmetro da colônia; IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial; Comp.: comprimento; Larg.: largura; Mic. Aéreo: Micélio Aéreo. CV= Coeficiente de Variação. ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII: *T. asperelloides*; AJII: *T. hamatum* e IMDI: *T. koningiopsis*.

Os isolados caracterizados no presente trabalho apresentaram coloração verde acinzentado a verde amarelado (Figura 4). Segundo Saito *et al.* (2011), a cloração da colônia é influenciada pela quantidade de conídios, podendo variar entre tons de verde, às vezes muito claro. De acordo com Gams e Bisset (1998), a maioria das espécies de *Trichoderma* apresentam colônias formadas por massas de micélio com aparência flocosa, de coloração branca (cor gelo) nos primeiros dias, substituindo por tons verdes ao longo dos dias e em alguns casos tons amarelados.

Figura 4 - Isolados de *Trichoderma* spp. aos sete dias de incubação em meio BDA



Fonte: Autores.

ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII: *Trichoderma asperelloides*; AJII: *Trichoderma hamatum* e IMDI: *Trichoderma koningiopsis*.

Segundo Milan *et al.* (2015), as características dos isolados de *Trichoderma* estão mais associadas à natureza do microrganismo do que às condições a que os conídios estão submetidos. Porém, embora pertencendo à mesma espécie, Sánchez López *et al.* (2012) salientam que algumas características são específicas de cada isolado, dependendo do seu habitat natural e das condições a que estavam submetidos.

Samuels *et al.* (2006) relatam que o odor de colônias é de uso limitado para identificação, mas que para *Trichoderma* spp. o odor de coco é característico no meio BDA, causado pelo antibiótico antifúngico 6-pentil- α -pirona, é típico para algumas espécies. No presente estudo, as

colônias dos sete isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas, apresentaram cheiro de coco conforme o relatado pelo autor citado.

3.3.2 Teste de pareamento de culturas

No pareamento de culturas houve interação significativa entre os fatores (*Trichoderma* spp. x *Fusarium* spp.) (Tabela 5). Todos os isolados de *Trichoderma* spp. reduziram o crescimento micelial diferindo estatisticamente da testemunha com 63,15 e 56,97 mm para I6AR2 e I8AR2, respectivamente. Para o isolado de *Fusarium oxysporum* (I6AR2), os isolados de *Trichoderma* spp. que foram mais eficientes foram AVRIII, IMDI e PVZII. No entanto, AVRII e PVZII não diferenciam estatisticamente dos demais isolados de *Trichoderma* spp. Para o isolado de *Fusarium solani* (I8AR1), os isolados de *Trichoderma* spp. mais eficientes foram ACI, AVRII e IMDI, porém os isolados ACI e IMDI não diferenciam estatisticamente dos isolados IJII e PNIII. Sendo assim, esses foram os antagonistas que obtiveram os menores valores referente ao crescimento micelial e, conseqüentemente, são os isolados que obtiveram maior percentagem de inibição, em que AVRII, IMDI e PVZII obtiveram as maiores percentagens de inibição sobre *Fusarium oxysporum* (I6AR2). No entanto, AVRII e PVZII não diferenciam estatisticamente dos demais isolados de *Trichoderma* spp. e para *Fusarium solani* (I8AR1) as maiores inibições foram para ACI, AVRII e IMDI, respectivamente, diferenciando estatisticamente dos isolados AJII e PVZII que obtiveram as menores médias.

Em relação a análise entre os isolados de *Fusarium* spp., observa-se que todos os isolados de *Trichoderma* spp., com exceção do AJII, obtiveram uma maior redução no crescimento micelial quando confrontado com *Fusarium solani* (I8AR1). Isso pode ocorrer devido ao fato de I8AR1 apresentar um crescimento mais lento, beneficiando o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. no meio, que muitas vezes crescem sobre o patógeno.

Utilizando a técnica de pareamento de culturas para avaliar a ação antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* spp., Krahn (2017), verificou-se que todos os isolados de *Fusarium* spp. apresentaram redução no crescimento micelial, variando de 18,84 a 29,92 mm. De Sá *et al.* (2019), utilizando a mesma técnica para avaliar a ação antagonista de bactérias do gênero *Bacillus* e do fungo *Trichoderma* sp. no controle de *Fusarium* sp. responsável por danos em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), obtiveram resultados satisfatórios de redução do

crescimento micelial do patógeno em 56 mm quando pareado com *Trichoderma* sp. Eesses resultados corroboram com os encontrados no presente estudo, tendo em vista que os isolados de *Trichoderma* spp. reduziram o crescimento micelial do patógeno (*Fusarium* spp.).

Diversas espécies de *Trichoderma* são utilizadas no âmbito das pesquisas científicas que visam tecnologias limpas para o manejo fitopatógenos e a ação de controle pode ocorrer por diferentes mecanismos como competição, antibiose ou micoparasitismo (RAJESH *et al.*, 2016). Alguns autores relatam a efetividade da utilização de *Trichoderma* spp. como antagonista, através da inibição do crescimento micelial de patógenos. Os estudos realizados por Medeiros *et al.* (2020), por exemplo, avaliaram o crescimento micelial de *T. viride*, *T. harzianum*, *T. asperellum* e *Trichoderma* spp. sobre *F. moniliforme* no teste de pareamento de culturas, obtiveram resultados que variaram de 9,86, a 28,44 mm.

Tabela 5 - Crescimento micelial, percentual de inibição do teste de pareamento de culturas *in vitro* de *Fusarium* spp. sobre *Trichoderma* spp. em meio BDA

<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.			
	Crescimento (mm)		Inibição (%)	
	I6AR2	I8AR1	I6AR2	I8AR1
ACI	53,80 Ab*	40,72 Bde	14,80 Bb	28,52 Aabc
AJII	54,57 Ab	47,46 Bb	13,59 Ab	16,70 Ae
AVRIII	51,95 Abc	39,78 Be	17,74 Bab	30,17 Aa
IJII	53,77 Ab	43,79 Bcd	14,85 Bb	23,13 Acd
IMDI	48,84 Ac	40,52 Bde	22,67 Ba	28,88 Aab
PNIII	52,56 Ab	43,49 Bcd	16,78 Bb	23,67 Abcd
PVZII	51,73 Abc	44,42 Bbc	18,08 Bab	22,03 Ade
TESTEMUNHA	63,15 Aa	56,97 Ba	-	-
CV (%)	4,03		15,28	

Fonte: Autores.

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de Variação.

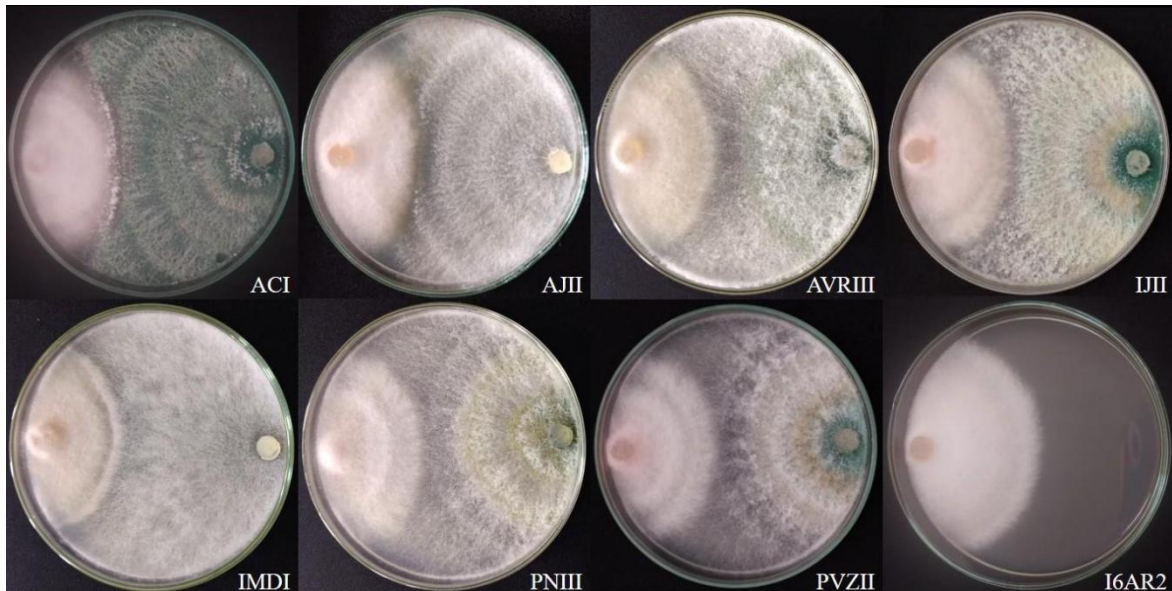
ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII: *T. asperelloides*; AJII: *T. hamatum* e IMDI: *T. koningiopsis*; I6AR2: *F. oxysporum*; I8AR1: *F. solani*.

Para a avaliação do potencial de biocontrole dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* spp. utilizando a escala de notas proposta por Rodrigues (2010), observou-se que os isolados foram separados nas classes 2 e 3. O isolado ACI obteve nota 3 em relação ao isolado de *Fusarium oxysporum* (I6AR2) e nota 2 para o isolado de *Fusarium solani* (I8AR1). Os isolados AJII e IJII obtiveram notas 3 para ambos os isolados de *Fusarium* spp., e os isolados AVRII, IMDI, PNIII e PVZII obtiveram nota 2 para ambos os isolados *Fusarium* spp. (Figuras 5 e 6). Essas notas também foram encontradas por diversos autores ao utilizarem a escala de Rodrigues (2010) para avaliar o biocontrole de *Trichoderma* spp. com diferentes patógenos (DILDEY *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015; NOZAKI *et al.*, 2018).

Já para a escala de notas proposta por Bell *et al.* (1982), todos os isolados de *Trichoderma* spp. obtiveram notas médias igual a 2,00 para ambos isolados de *Fusarium* spp. De acordo com os autores, é considerado como um bom potencial antagonista quando se atinge notas com valor médio ≤ 2 .

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os observados por Silva *et al.* (2019), nos quais os autores verificaram que, no geral, os isolados de *Trichoderma* spp. obtiveram notas iguais ou inferiores a 2 utilizando a escala de Bell *et al.* (1982), indicando o potencial de *Trichoderma* spp. em competir por espaço e nutrientes com *Fusarium subglutinans*. Os resultados também corroboram com os de Junior *et al.* (2018), que detectaram 22 isolados de *Trichoderma* spp. com potencial de biocontrole sobre *Rhizoctonia solani*.

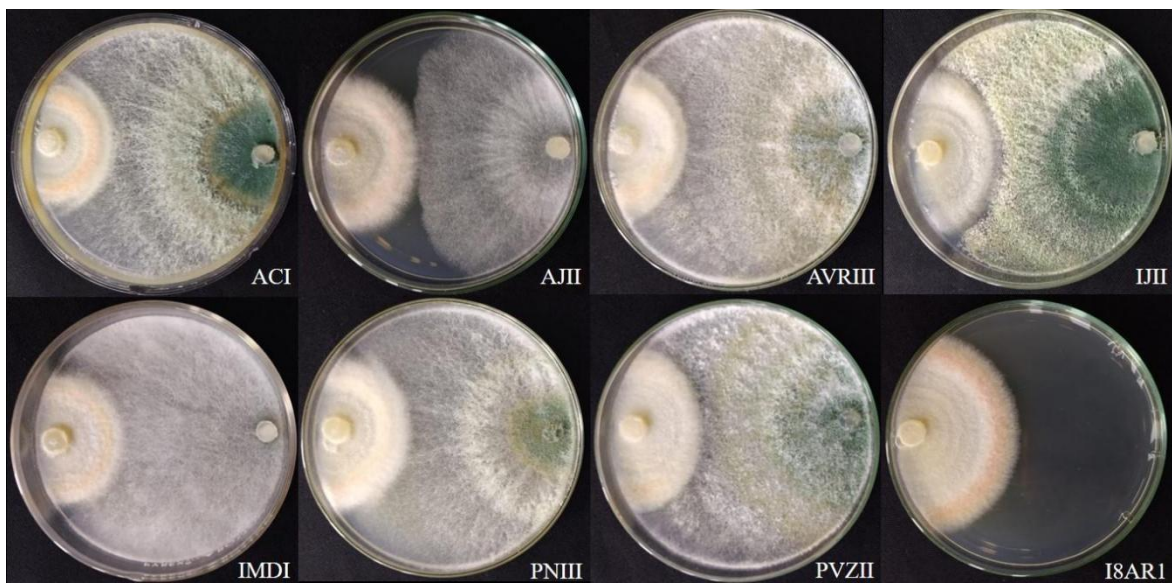
Figura 5 - Teste de pareamento de culturas utilizando isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* em meio BDA



Fonte: Autores.

ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII = *T. asperelloides* x *F. oxysporum* (I6AR2); AJII = *T. hamatum* x *F. oxysporum* (I6AR2) e IMDI = *T. koningiopsis* x *F. oxysporum* (I6AR2); I6AR2 = Testemunha.

Figura 6 - Teste de pareamento de culturas utilizando isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium solani* em meio BDA



Fonte: Autores.

ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII = *T. asperelloides* x *F. solani* (I8AR1); AJII = *T. hamatum* x *F. solani* (I8AR1) e IMDI = *T. koningiopsis* x *F. solani* (I8AR1); I8AR1 = Testemunha.

3.3.3 Teste de metabólitos voláteis

Na ação dos metabólitos voláteis, houve interação significativa entre os fatores (*Trichoderma* spp. x *Fusarium* spp.) (Tabela 6). Para o isolado de *Fusarium oxysporum* (I6AR2), todos os isolados de *Trichoderma* spp. reduziram o crescimento micelial diferindo estatisticamente da testemunha com 69,92 mm. Os isolados de *Trichoderma* spp. mais eficientes foram o IJII, juntamente com AJII e AVRIII. Porém, AJII e AVRIII não diferenciam estatisticamente de ACI e PNII. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes na redução do crescimento micelial do isolado de *Fusarium solani* (I8AR1), variando de 17,05 a 21,22 mm com exceção do isolado PVZII que, quando confrontado com *Fusarium solani* (I8AR1), o patógeno apresentou o maior crescimento, não diferenciando estatisticamente da testemunha. Sendo assim, quanto maior a velocidade de crescimento micelial do patógeno, menor a eficiência de competição do *Trichoderma* por espaço e, conseqüentemente, menor percentual de inibição.

Em relação a análise entre os isolados de *Fusarium* spp., observou-se que todos os isolados de *Trichoderma* spp. obtiveram uma maior redução no crescimento micelial quando confrontado com o isolados de *Fusarium solani* (I8AR1). Isso deve-se ao fato do isolado I8AR1 apresentar um crescimento mais lento, beneficiando o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. no meio.

Quanto à inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* (I6AR2), percebeu-se que o isolado IJII obteve o maior percentual, diferindo estatisticamente apenas dos isolados IMDI e PVZII. Para *Fusarium solani* (I8AR1), todos os isolados obtiveram percentagem de inibição maior que 40%, com exceção do isolado PVZII que obteve média igual a 21,61%.

Em relação à análise entre os isolados de *Fusarium* spp., observou-se que a maioria dos isolados não diferiram estatisticamente, com exceção dos isolados AVRIII, IMDI e PNIII que obtiveram um menor percentual de inibição sobre *Fusarium oxysporum* (I6AR2). Isso deve-se ao fato do isolado I6AR2 apresentar um crescimento mais rápido que o isolado de *Fusarium solani* (I8AR1), competindo mais pelo substrato de cultivo frente a alguns dos isolados de *Trichoderma* spp.

Tabela 6 - Crescimento micelial e percentual de inibição do teste de metabólitos voláteis *in vitro* de *Fusarium* spp. sobre *Trichoderma* spp. em meio BDA

<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.			
	Crescimento (mm)		Inibição (%)	
	I6AR2	I8AR1	I6AR2	I8AR1
ACI	41,90 Abc*	20,89 Bb	40,07 Aabc	48,20 Aa
AJII	37,31 Acd	17,05 Bb	46,65 Aab	57,71 Aa
AVRIII	38,88 Acd	17,18 Bb	44,40 Babc	57,40 Aa
IJII	33,05 Ad	20,12 Bb	52,74 Aa	50,11 Aa
IMDI	48,91 Ab	21,22 Bb	30,05 Bbc	47,38 Aa
PNIII	44,20 Abc	19,66 Bb	36,78 Babc	51,23 Aa
PVZII	50,12 Ab	31,61 Ba	28,32 Ac	21,61 Ab
TESTEMUNHA	69,92Aa	40,32 Ba	-	-
CV (%)	11,34		18,72	

Fonte: Autores.

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Kukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de Variação.

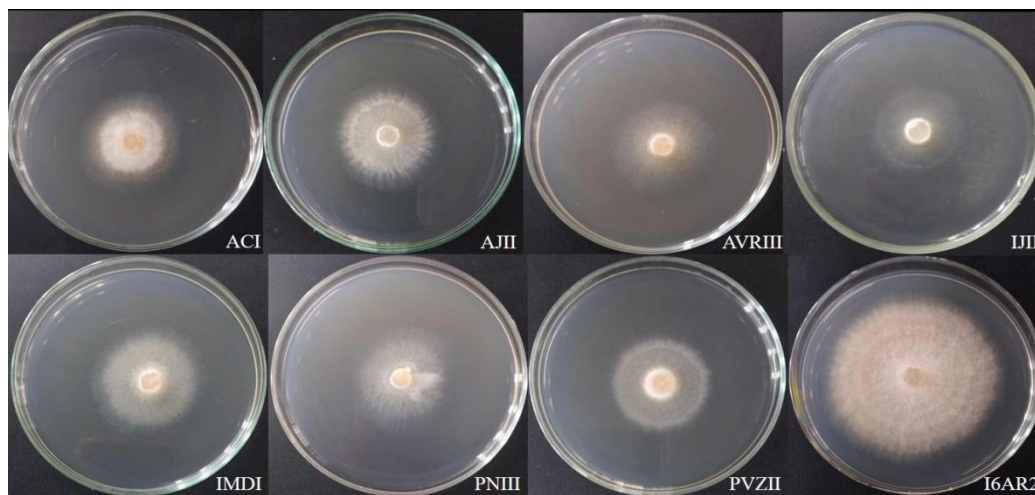
ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII: *T. asperelloides*; AJII: *T. hamatum* e IMDI: *T. koningiopsis*; I6AR2: *F. oxysporum*; I8AR1: *F. solani*.

Utilizando metodologia semelhante, Bezerra *et al.* (2019) obtiveram redução no crescimento micelial de *Fusarium guttiformei*, através de metabólitos voláteis liberados por *Trichoderma* spp., onde os percentuais de inibição promovidos pela ação antagonista variam de 67,30 a 71,66%, mostrando que os isolados dos antagonistas atuam diretamente na inibição de crescimento do agente patogênico por ação de metabólitos voláteis. Azevedo *et al.* (2020), testaram isolados de *Trichoderma* sp. como antagonista para *F. solani* e *F. oxysporum*, e concluíram que os isolados de *Trichoderma* sp. foram eficientes competidores e produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial das duas espécies de *Fusarium*, e que *Trichoderma* sp. demonstram uma grande versatilidade nos mecanismos de ação, principalmente relacionados à produção de

compostos orgânicos voláteis. Além disso, os resultados do presente estudo se justificam com a hipótese levantada por Dennis e Webster (1971), os quais atestam que espécies do gênero *Trichoderma* são eficazes na produção de metabólitos voláteis capazes de inibir o crescimento de muitos microrganismos em meio de cultura.

Nas figuras 7 e 8, é possível observar o crescimento do patógeno no teste de metabólitos voláteis.

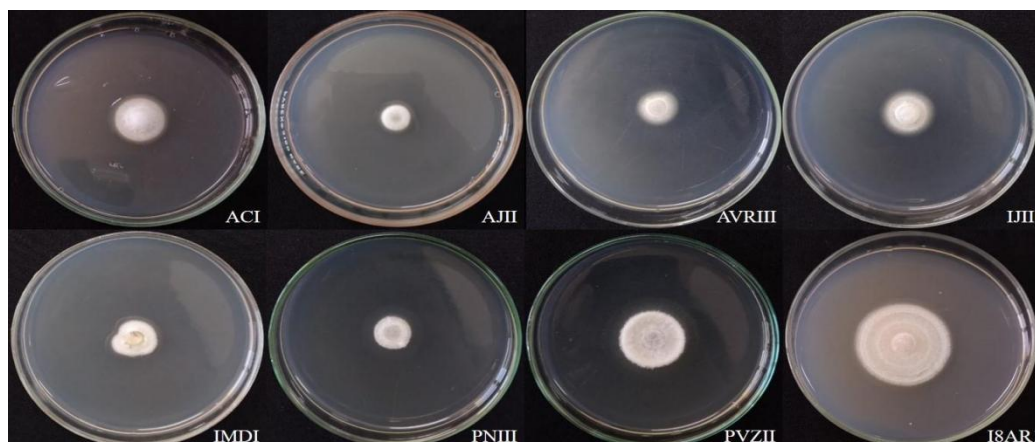
Figura 7 - Teste de metabólitos voláteis utilizando isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* em meio BDA



Fonte: Autores.

ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII = *T. asperelloides* x *F. oxysporum* (I6AR2); AJII = *T. hamatum* x *F. oxysporum* (I6AR2) e IMDI = *T. koningiopsis* x *F. oxysporum* (I6AR2); I6AR2 = Testemunha.

Figura 8 - Teste de metabólitos voláteis utilizando isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium solani* em meio BDA



Fonte: Autores.

ACI, AVRIII, IJII, PNIII e PVZII = *T. asperelloides* x *F. solani* (I8AR1); AJII = *T. hamatum* x *F. solani* (I8AR1) e IMDI = *T. koningiopsis* x *F. solani* (I8AR1); I8AR1 = Testemunha.

O isolamento e identificação de organismos antagonistas para o controle biológico é importante para a finalidade de obtenção de isolados com grande potencial para controle de fitopatógenos e, conseqüentemente, reduzir o uso de fungicidas químicos. *Trichoderma* spp. é um dos gêneros já relatados por possuir potencial antagonista em testes *in vitro*, tanto no pareamento de culturas como no teste de metabólitos voláteis, sendo esses testes fundamentais para prosseguir com os estudos *in vivo* e verificar qual isolado apresenta maior efetividade de controle.

3.4 CONCLUSÕES

Foram isolados das amostras de solo rizosférico da erva-mate *T. asperelloides*, *T. hamatum* e *T. koningiopsis*. Os isolados variaram em relação à esporulação, à velocidade de crescimento micelial, ao diâmetro da colônia e ao tamanho de conídios, bem como, à coloração da colônia, que variou de tons de verde, branco e cinza.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes em controlar o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* (I6AR2) e *Fusarium solani* (I8AR1) tanto no pareamento de culturas como por metabólitos voláteis.

3.5 REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. *et al.* Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em fitopatologia**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007.

ANDRADE, F.M. A exploração e utilização do recurso *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (erva-mate), seus impactos sócio-econômicos atuais e potencialidades de manejo sustentável. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE RECURSOS FLORESTAIS DA MATA ATLÂNTICA, 1., 1999, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo, SP: Horto Florestal, 1999. p. 24 - 33.

ANEES, M. *et al.* Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. **Fungal biology**, 114(9), 691 - 701, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878614610000851>>. Acesso em 15 nov. 2021.

AZEVEDO, D. M. Q. *et al.* Antagonistic effect of *Trichoderma* isolates and its metabolites against *Fusarium solani* and *F. oxysporum* in chickpea/Efeito antagonista de isolados de *Trichoderma* e seus metabólitos contra *Fusarium solani* e *F. oxysporum* em grão-de-bico.

Brazilian Journal of Development, v.6, n.6, p. 36344 - 36361, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-251>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

BELL, D. K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Ecology and Epidemiology**, Järfälla, v. 72, n. 4, 1982, p. 379 - 382. Disponível em: <<https://www.cabi.org/ISC/abstract/19821384099>>. Acesso em 20 out. 2021.

BEZERRA, G. A. et al. Identificação e seleção de espécies de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromélias de restingas como agentes de biocontrole da fusariose em frutos de abacaxi. **Summa Phytopathologica**, v.45, n.2, p.172 - 178, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0100-5405/189165>>. Acesso em 11 dez. 2021.

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>>. Acesso em 27 dez. 2021.

CHAGAS, L. F. B. et al. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 4, n. 3, p. 97 - 102, jul./set. 2017. Disponível em: <<http://periodicosonline.uems.br/index.php/agrineo/article/view/1529/1563>>. Acesso em 12 dez. 2021.

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 06 nov. 2021.

DE SÁ, Mylenna Nádja Ferreira et al. Seleção in vitro de agentes de biocontrole visando o controle de *Fusarium* sp. **Acta Brasiliensis**, v. 3, n. 1, p. 14 - 16, 2019.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species - groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, Manchester, v. 57, p. 363 - 369, 1971. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153671800505>>. Acesso em 02 nov. 2021.

DILDEY, O. D. F. et al. Inibição do crescimento in vitro de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, 2014. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2747>>. Acesso em 15 dez. 2021.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n. 1, p.11 - 15, 1987. Disponível em: <<https://worldveg.tind.io/record/33886/>>. Acesso em 16 nov. 2021.

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 22 dez. 2021.

FERNANDES, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo – RS: EMATER – CNPT, p. 128, 1993.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109 - 112, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cagro/a/yyWQQVwqNcH6kzf9qT9Jdhv/?format=pdf&lang=em>>. Acesso em 02 dez. 2021.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of trichoderma, p. 3 - 74. In C.P. Kubicek, G.E. Harman and K.L. Ondik (eds.), **Trichoderma e Gliocladium: Basic biology, taxonomy, and genetics**. Taylor & Francis, London, 1998, UK.

GRIGOLETTI, A. J.; AUER, C. G. Doenças da erva-mate: identificação e controle. Colombo: Embrapa Florestas, 1996. 18 p. (Embrapa Florestas. **Circular Técnica**, 25).

JEYASEELAN, E. R.; THARMILA, S.; NIRANJAN, K. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. **Archives of Applied Science Research**, v. 4, n. 4, p. 1623 - 1627, 2012. Disponível em: <<https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/antagonistic-activity-of-trichoderma-spp-and-bacillus-spp-against-pythium-aphanidermatum-isolated-from-tomato-damping-of.pdf>>. Acesso em 07 nov. 2021.

JUNIOR, A. F. C. *et al.* Ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Agri-Environmental Sciences**, v.4, n.2, p. 9 - 15, 2018. Disponível em: <<https://revista.unitins.br/index.php/agri-environmental-sciences/article/view/420/916>>. Acesso em 29 dez. 2021.

KRAHN, J. R. T. **Microbiota do solo em três sistemas de cultivo de citros e patogenicidade de *Fusarium* spp.** 2017. 95p. Dissertação (Mestrado) - Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2017.

LIU, Y.J.; WHELEN, S.; HALL, B.D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 1799 - 1808, 1999. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article/16/12/1799/2925412?login=false>>. Acesso em 11 dez. 2021.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176 - 177, 1962. Disponível em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/2/2/CS0020020176>>. Acesso em 05 jan. 2022.

MEDEIROS, J. C. D.; MARTINS, W. S.; MIRANDA, F. F. R. de. Antagonismo de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Fusarium moniliforme* na cultura do milho. **Revista Sítio Novo**, v. 4, n. 4, p. 169 - 178, 2020. Disponível em: <<https://sitionovo.ifto.edu.br/index.php/sitionovo/article/view/717>>. Acesso em 24 out. 2021.

MEDRADO, M. J. S., VILCAHUAMAN, L. J. M. **Cultivo da erva-mate. Importância socioeconômica e ambiental**. 2.ed. Embrapa Florestas, 2014.

MEZZOMO, R. *et al.* Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to *Ilex paraguariensis*. **Cerne**, v. 24, n. 3, p. 209 - 218, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cerne/a/QgknMh4mthmdVqsZqrLq3HM/?lang=en&format=pdf>>. Acesso em: 22 out. 2021.

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: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632015000400434>. Acesso em 16 dez. 2021.

MILANESI, P. M. *et al.* Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 347 -356, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2013000300010>. Acesso em 02 nov. 2021.

Munsell Color. **Munsell soil color charts**. New Windsor: Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporation, 2009.

NOZAKI, M. H. *et al.* Controle in vitro de *Alternaria solani* por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Cultivando o Saber**, v. 11, n. 4, p. 9 - 16, 2018. Disponível em: <https://www.fag.edu.br/upload/revista/cultivando_o_saber/5c06b293d20b8.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2021.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumissativus* L.) e pimentão (*Capsicumannum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 1991.

POLETTI, I. *et al.* Primeira ocorrência de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. causando podridão-de-raízes em ervais no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 65 - 71, 2007. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1936>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

POLETTI, I. *et al.* Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causador de podridão-de-raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.) na região do Vale do Taquarí-RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1 - 10, 2006. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1882>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

RAJESH, R. W.; RAHUL, M. S.; AMBALAL, N. S. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952–

1965, 2016. Disponível em: <<https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-full-text-pdf/01E890258810>>. Acesso em: 24 dez. 2021.

RESENDE, M. D. V. *et al.* **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela EMBRAPA: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones.** Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2000.

RODRIGUES, J. ***Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*– feijoeiro.** 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ROTTA, E.; OLIVEIRA, Y.M. **Cultivo da erva-mate** - Distribuição geográfica. Disponível em: <[www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/ FontesHTML/Erva-mate](http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate)>. Acesso em: 13 dez. 2007.

SAITO, L. R. *et al.* Aspects of the effects of the fungus *Trichoderma* spp. in biocontrol of pathogens of agricultural crops. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 2, n. 3, p. 203 - 216, 2011. Disponível em: <<https://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/view/1515>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

SAMUELS G.J. *et al.* The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**, v. 56, p. 67 - 133, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016606161460138X>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

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](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.05.012)>. Acesso em 11 out. 2021.

SÁNCHEZ LÓPEZ, V. *et al.* Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. **Revista Mexicana de Micología**, v. 36, p. 17 - 26, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v36/v36a4.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311-313, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16725102/>>. Acesso em: 15 out. 2021.

SHARMA, K. K.; SINGH, U. S. Cultural and morphological characterization of rhizospheric isolates of fungal antagonist *Trichoderma*. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 6, n. 2, p. 451 - 456, 2014. Disponível em: <<https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/481>>. Acesso em: 11 out. 2021.

SHOUKOUHI, E. **Preferred primers for sequencing the 5'end of the translation elongation factor 1-alpha gene (EF1- α 1) and subunit 2 of the RNA polymerase B gene (RPB2).** 2008. Disponível em: <<http://www.isth.info/methods>>. Acesso em 14 nov. 2021.

SILVA, G. B. P. *et al.* Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, v. 28, p. 33 - 42, 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rcaat/a/TzWgDkGx59N554wsJ8rgsHJ/?lang=pt>>. Acesso em 11 dez. 2021.

SILVA, T. W. R. *et al.* Pine Seeds Treatment with *Trichoderma* for *Fusarium* Control. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, p. 1 - 8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/2179-8087.087517>>. Acesso em 02 jan. 2022.

SUNG, G. H. *et al.* A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 1204 - 1223, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17555990/>>. Acesso em 06 nov. 2021.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315 - 322 In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky; T. J. White. Academic Press, Inc., New York, 1990.

4 CAPÍTULO II - *Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE *in vivo* DE *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* E NO CRESCIMENTO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE ERVA-MATE

Resumo: O controle biológico de doenças de plantas é utilizado como alternativa ao uso de produtos químicos ou como complemento a eles, pois além de não ser tóxico ao meio ambiente e aos seres vivos, tem se mostrado mais eficiente no manejo de patógenos do solo, como fungos do gênero *Fusarium* spp. Estudos com antagonistas do gênero *Trichoderma* spp. vêm mostrando resultados positivos em relação ao controle biológico e ao crescimento de plantas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de dois isolados de *Trichoderma asperelloides* e um isolado de *Trichoderma koningiopsis* no controle *in vivo* de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, bem como a promoção de crescimento e a indução de resistência em plantas de erva-mate. Para tanto, foram realizados ensaios conduzidos em casa de vegetação. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram incorporados ao substrato, em forma de suspensão de esporos, em diferentes momentos em relação a aplicação das suspensões dos isolados de *Fusarium* spp., com exceção do tratamento testemunha que não foi inoculado. Foram avaliadas as seguintes variáveis em folhas: número total, clorose, necrose, murcha, amarelecimento e encarquilhamento. Além disso, avaliou-se o comprimento da parte aérea, diâmetro do coleto, comprimento da raiz, massa fresca da parte aérea e da raiz e massa seca da parte aérea e da raiz. Nas raízes, foram realizadas as seguintes análises bioquímicas: conteúdo de peróxido de hidrogênio, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD), concentração total de proteínas solúveis e peroxidação de lipídios de membrana. A comparação das médias foi pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com o software SISVAR. Nos tratamentos, quando se utilizou o biocontrole, houve a redução dos sintomas, aumento do comprimento da parte aérea, diâmetro do coleto, comprimento de raízes, maior acúmulo de massa fresca da parte aérea e radicular e massa seca da parte aérea e radicular. As menores atividades da SOD e da POD foram observadas nos tratamentos submetidos a inoculação de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. no mesmo dia, juntamente com os tratamentos em que *Trichoderma* spp. foram inoculados 30 dias antes que *Fusarium* spp. Além disso, os tratamentos em que *Trichoderma* spp. foram inoculados 30 dias antes que *Fusarium* spp. apresentaram maior conteúdo de proteínas solúveis totais. De maneira geral, os tratamentos com *Trichoderma* spp., incorporados ao substrato, atuaram promovendo a qualidade das mudas e diminuíram os sintomas da podridão de raízes, bem como, induziram a resistência e promoveram o crescimento das plantas de erva-mate.

Palavras-chave: Controle biológico. Erva-mate. Promoção de crescimento.

Trichoderma spp. ON IN VIVO BIOCONTROL OF *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* AND ON GROWTH AND RESISTANCE INDUCTION IN YERBAM PLANTS.

Abstract: The biological control of plant diseases is used as an alternative to the use of chemical products or as a complement to them, as in addition to being non-toxic to the environment and living beings, it has been shown to be more efficient in the management of soil pathogens, such as soil fungi. genus *Fusarium* spp. Studies with antagonists of the genus *Trichoderma* spp. have shown positive results in relation to biological control and plant growth. Thus, the objective of this work was to evaluate the action of two *Trichoderma asperelloides* isolates and one *Trichoderma*

koningiopsis isolate in the *in vivo* control of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, as well as the promotion of growth and the induction of resistance in weed plants of herb tea. Therefore, tests were carried out in a greenhouse. *Trichoderma* spp. were incorporated into the substrate in the form of a spore suspension at different times in relation to the application of the suspensions of *Fusarium* spp. isolates, with the exception of the control treatment, which was not inoculated. The following variables were evaluated in leaves: total number, chlorosis, necrosis, wilt, yellowing and wrinkling. In addition, shoot length, stem diameter, root length, shoot and root fresh weight and shoot and root dry weight were evaluated. In the roots, the following biochemical analyzes were performed: hydrogen peroxide content, activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and guaiacol peroxidase (POD), total concentration of soluble proteins and membrane lipid peroxidation. Means were compared using the Scott-Knott test at 5% probability of error, using the SISVAR software. In the treatments, when biocontrol was used, there was a reduction in symptoms, increase in shoot length, stem diameter, root length, greater accumulation of shoot and root fresh mass and shoot and root dry mass. The lowest activities of SOD and POD were observed in treatments submitted to inoculation of *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. on the same day, together with treatments in which *Trichoderma* spp. were inoculated 30 days before *Fusarium* spp. Furthermore, treatments in which *Trichoderma* spp. were inoculated 30 days before *Fusarium* spp. had higher content of total soluble proteins. In general, treatments with *Trichoderma* spp., incorporated into the substrate, acted by promoting the quality of the seedlings and decreasing the symptoms of root rot, as well as induced resistance and promoted the growth of mate plants.

Keywords: Biological control. Mate herb. Growth promotion.

4.1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é uma espécie pertencente à família Aquifoliaceae, possui importância socioeconômica, principalmente no sul do Brasil e países próximos, como Argentina, Paraguai e Uruguai, sendo utilizada na indústria alimentícia para produção de chimarrão, tererê e chá-mate (SOUZA; LORENZI, 2012). Também é utilizada na indústria farmacêutica, por conter uma variedade de compostos com propriedades neuroprotetivas, anti-inflamatórias, antioxidantes e diuréticas (LIMA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015).

As doenças causadas por fungos podem provocar grandes prejuízos e inviabilizar o cultivo da erva-mate (GOMES *et al.*, 2001; GRIGOLETTI JUNIOR; AUER, 2003). Nos últimos anos, com o aumento da área plantada, a ocorrência de pragas e doenças foi intensificada e a podridão-de-raízes se tornou um dos principais problemas fitossanitários encontrados na cultura da erva-mate (POLETTO *et al.*, 2010).

O gênero *Fusarium* é o principal patógeno associado à podridão-de-raízes que pode ocorrer tanto em sementeiras, mudas repicadas (GRIGOLETTI JUNIOR *et al.*, 1996), mudas no viveiro e acometer árvores adultas em ervais (POLETTO *et al.*, 2015). Poletto *et al.* (2006), ao testar a

patogenicidade de diferentes espécies de *Fusarium* spp. isoladas de plantas adultas de erva-mate, relatou que *F. oxysporum* e *F. solani* foram as espécies mais comuns quando inoculadas em plantas de erva-mate.

Fungos do gênero *Fusarium* podem sobreviver no solo por longos períodos infectando plantas, onde o fungo penetra através das raízes, colonizando rapidamente o sistema vascular (TÖFOLI, 2019). O controle de fungos que podem sobreviver no solo era realizado por meio da fumigação com produtos químicos. Contudo, devido à pouca eficiência desse procedimento e às preocupações relacionadas à segurança alimentar, bem como à poluição ambiental, a utilização desses produtos está sendo reduzida (MAO *et al.*, 2012).

Dessa maneira, outras formas de controle devem ser estudadas. Dentre elas, pode-se destacar o controle biológico, o qual apresenta diversas vantagens como custo reduzido, menores riscos ao ambiente e à saúde humana. Os microrganismos são fáceis tanto de serem multiplicados, dispersados e produzidos em laboratórios, quanto de serem aplicados em campo, além de sua alta eficiência no controle de fitopatógenos (SIMONATO *et al.*, 2014). Além disso, diferentemente do que ocorre com os fungicidas, que têm efeito temporário e precisam ser reaplicados ao longo do ciclo da cultura, os agentes de biocontrole têm capacidade de estabelecimento, colonização e dispersão no ecossistema (CARVALHO *et al.*, 2011). Entre os microrganismos estudados, o fungo *Trichoderma* apresenta grande potencial para utilização como agente de controle biológico de doenças de plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

As espécies do gênero *Trichoderma* são encontradas naturalmente em quase todos os tipos de solo e agem contra fitopatógenos por diferentes mecanismos de ação, como antibiose, micoparasitismo, produção de enzimas degradadoras de parede celular, competição por nutrientes e substrato, promoção do crescimento das plantas e indutores de resistência contra diversos patógenos, com efeitos benéficos para as plantas (AZEVEDO *et al.*, 2020). Na competição, o patógeno e o antagonista disputam os mesmos recursos para sobreviver. Já na antibiose, o antagonista produz uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a reprodução do fitopatógeno no ambiente ou na planta. No parasitismo, o antagonista se alimenta do fitopatógeno, enfraquecendo ou causando a sua morte. No processo de indução de resistência, ocorre a estimulação de mecanismos de defesa da planta com produção de proteínas voltadas a patogênese, acumulação de fitoalexinas e sinalização nas rotas de indução de resistência (DRUZHININA *et al.*, 2011; HARMAN *et al.*, 2004; HERMOSA *et al.*, 2012; LUCON *et al.*, 2014).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de dois isolados de *Trichoderma asperelloides* e um isolado de *Trichoderma koningiopsis* no controle *in vivo* de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, bem como a promoção de crescimento e a indução de resistência em plantas de erva-mate.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local de realização dos experimentos e origem dos isolados fúngicos

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Santa Maria, na cidade de 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. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia.

Foram utilizados três isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de solo rizosférico de plantas adultas de erva-mate, *Trichoderma asperelloides* (28°59'386" S - 52°04'660"W), codificado como ACI, *Trichoderma asperelloides* (28°57'292" S - 51°59'090" W), codificado como AVRIII e *Trichoderma koningiopsis* (28°55'398" S - 52°09'096" W), codificado como IMDI (Capítulo I). Os três isolados estão cadastrados no SISGEN pelo código AE00C3.

Como patógenos, foram utilizados dois isolados causadores de podridão-de-raízes em erva-mate, *Fusarium oxysporum* (28°53'58,1" S 52°04'48,0" W) codificado como I6AR2, cuja sequência de DNA da região do fator de alongação está depositada no GenBank sob número MF318446 e *Fusarium solani* (28°55'48,6" S 52°10'40,1" W) codificado como I8AR1, cuja sequência de DNA da região do fator de alongação está depositada no GenBank, sob número MF318446 (MEZZOMO et al., 2018), sendo que ambos os isolados estão cadastrados no SISGEN pelo código AE050F7. Os isolados estavam armazenados em tubos eppendorf contendo água destilada esterilizada na micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi.

4.2.2 Produção dos inóculos fúngicos e incorporação ao substrato

Discos de micélio de isolados de *F. oxysporum* (I6AR2) e *F. solani* (I8AR1) foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e esses foram mantidas por 10 dias a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h em câmara BOD. Após, discos de meio de cultura contendo micélio dessas colônias foram transferidas para frascos de Erlenmeyer contendo grãos de arroz (sem casca, tipo parboilizado) previamente umedecido e autoclavado (30 min a 121 °C a 1 atm). Depois de inoculados, os frascos permaneceram em câmara de incubação a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h por 20 dias. Após esse período, os grãos de arroz foram colocados em um recipiente com água esterilizada (1000 mL de água para cada 200 g de arroz) e agitados por 10 min. A suspensão resultante foi coada e foi contado o número de esporos com auxílio da câmara de Neubauer em microscópio ótico. A suspensão foi ajustada para 10^6 esporos mL⁻¹ e inoculados 40 mL da suspensão por vaso, incorporados no substrato, de acordo com a metodologia adaptada de Poletto (2008).

Para a produção do antagonista, discos de micélio, de 8 mm de diâmetro, dos isolados de *Trichoderma* spp. foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidos por 7 dias a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h em câmara BOD. Após esse período, foi preparada a suspensão de esporos pela diluição em água destilada esterilizada e ajustada a concentração para 10^6 esporos mL⁻¹, pela contagem em Câmara de Neubauer e microscópio ótico. Na sequência, foram colocados 100 mL da suspensão por vaso, sendo incorporados ao substrato.

4.2.3 Organização dos tratamentos

Foram utilizadas mudas de erva-mate com 11 meses de idade, produzidas em um viveiro particular no município de Ilópolis – RS. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram testados em diferentes momentos em relação a aplicação dos isolados de *Fusarium* spp., conforme os seguintes tratamentos:

T1: Testemunha

T2: *Trichoderma koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes de *Fusarium oxysporum* (I6AR2)

T3: *Trichoderma asperelloides* (ACI) 30 dias antes de *Fusarium oxysporum* (I6AR2)

T4: *Trichoderma asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes de *Fusarium oxysporum* (I6AR2)

- T5: *Trichoderma koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes de *Fusarium solani* (I8AR1)
T6: *Trichoderma asperelloides* (ACI) 30 dias antes de *Fusarium solani* (I8AR1)
T7: *Trichoderma asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes de *Fusarium solani* (I8AR1)
T8: *Trichoderma koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *Fusarium oxysporum* (I6AR2)
T9: *Trichoderma asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *Fusarium oxysporum* (I6AR2)
T10: *Trichoderma asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *Fusarium oxysporum* (I6AR2)
T11: *Trichoderma koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *Fusarium solani* (I8AR1)
T12: *Trichoderma asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *Fusarium solani* (I8AR1)
T13: *Trichoderma asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *Fusarium solani* (I8AR1)
T14: *Trichoderma koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois de *Fusarium oxysporum* (I6AR2)
T15: *Trichoderma asperelloides* (ACI) 30 dias depois de *Fusarium oxysporum* (I6AR2)
T16: *Trichoderma asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois de *Fusarium oxysporum* (I6AR2)
T17: *Trichoderma koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois de *Fusarium solani* (I8AR1)
T18: *Trichoderma asperelloides* (ACI) 30 dias depois de *Fusarium solani* (I8AR1)
T19: *Trichoderma asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois de *Fusarium solani* (I8AR1)
T20: *Trichoderma koningiopsis* (IMDI)
T21: *Trichoderma asperelloides* (ACI)
T22: *Trichoderma asperelloides* (AVRIII)
T23: *Fusarium oxysporum* (I6AR2)
T24: *Fusarium solani* (I8AR1)

Para todos os tratamentos, exceto a testemunha, após 30 dias da transferência das mudas para os vasos contendo substrato, foram inoculadas as suspensões do patógeno. Foram utilizadas sete repetições, sendo cada repetição composta por uma planta, e essas foram cultivadas em vasos de polietileno preto acrescidos de 2 litros de substrato comercial (MECPLANT®) com irrigações diárias através de sistema de gotejamento por espaguete temperatura ajustada para 28 °C (± 2 °C), e umidade relativa do ar a 70% e mantidas em casa de vegetação durante toda a execução do experimento.

4.2.4 Avaliações em plantas

Após a inoculação de *Fusarium* spp. até o final do experimento (6 meses), foram realizadas avaliações semanais, contando o número de folhas totais, folhas com clorose, folhas com necrose, folhas murchas, folhas com amarelecimento e folhas com encarquilhamento. Com base nessas informações foi realizado o cálculo da área abaixo da curva de progresso do sintoma (AACPS), utilizando a fórmula conforme Campbell e Madden, 1990:

$$\sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i), \text{ em que:} \quad (1)$$

N= número de avaliações

Y= valor da variável avaliada em proporção

T= tempo em que a variável em questão foi avaliada

Ao final do experimento, foram medidos o diâmetro do colo das plantas com o auxílio de um de paquímetro digital, a altura a partir do colo e o comprimento das raízes com uma régua milimétrica, e para os tratamentos T1, T20, T21, T22, T23 e T24 foi medido, com auxílio do paquímetro digital, o comprimento e a largura da maior folha de cada planta. Para a avaliação da massa fresca e massa seca das raízes e parte aérea, foram utilizadas três repetições por tratamento. As plantas foram separadas em raiz e parte aérea, para a avaliação da massa fresca das raízes, sendo que as mesmas foram lavadas e ambas as partes foram pesadas em balança analítica de precisão 0,001 g. Para a avaliação da massa seca, as raízes e a parte aérea foram acondicionadas separadamente em sacos de papel e, em seguida, secas em estufa com circulação forçada de ar regulada a 60 ± 3 °C, até o material atingir peso constante.

Para as quatro repetições restantes, foram realizadas análises bioquímicas do sistema radicular. O material vegetal coletado foi depositado em envelopes de papel alumínio, devidamente identificados e mantidos em nitrogênio líquido até o final da coleta. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até realização das análises. As análises bioquímicas compreenderam a determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de acordo com a metodologia de Loreto e Velikova (2001); a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis; Ries (1977); a atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) segundo Zeraik *et al.* (2008), utilizando o guaiacol como substrato; a concentração total de proteínas solúveis foi medida utilizando uma curva padrão de

albumina sérica bovina de acordo com o Método de Bradford (BRADFORD, 1976) e; a peroxidação de lipídios de membrana foi estimada pelo método de El-Moshaty et al. (1993).

4.2.5 Procedimento estatístico

O delineamento foi o inteiramente casualizado (DIC) e os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-knott ($p < 0,05$), usando o programa de análise estatística SISVAR (FERREIRA, 2014).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

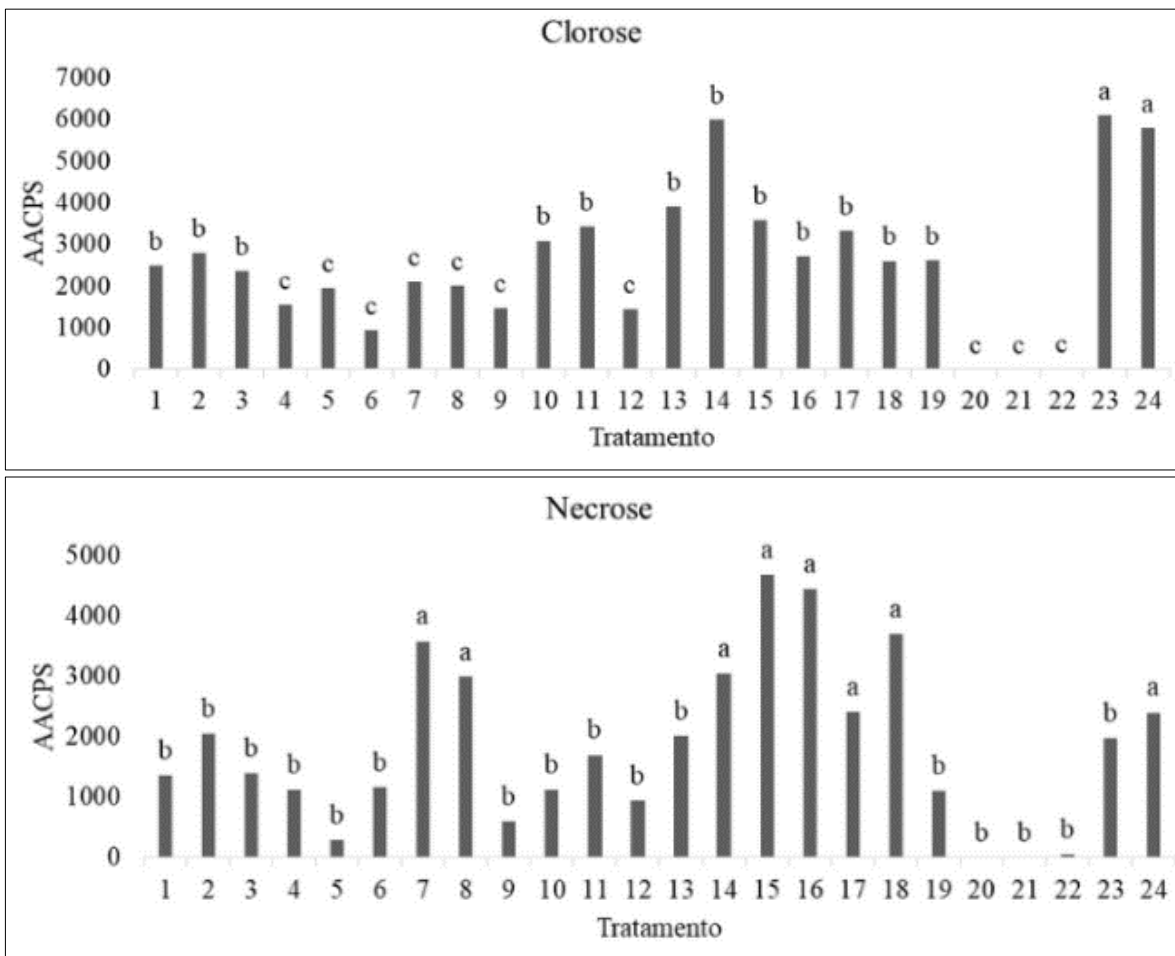
A partir da análise dos resultados da Área Abaixo da Curva de Progresso do Sintoma (AACPS), determinada a partir da avaliação semanal dos sintomas de *Fusarium oxysporum* (I6AR2) e *Fusarium solani* (I8AR1) em plantas de erva-mate (Figura 1), observou-se que houve diferença estatística entre os tratamentos. Sendo assim, os tratamentos foram agrupados em três grupos distintos para as variáveis Clorose e Encarquilhamento, e para Necrose, Murcha e Amarelecimento, em dois grupos distintos.

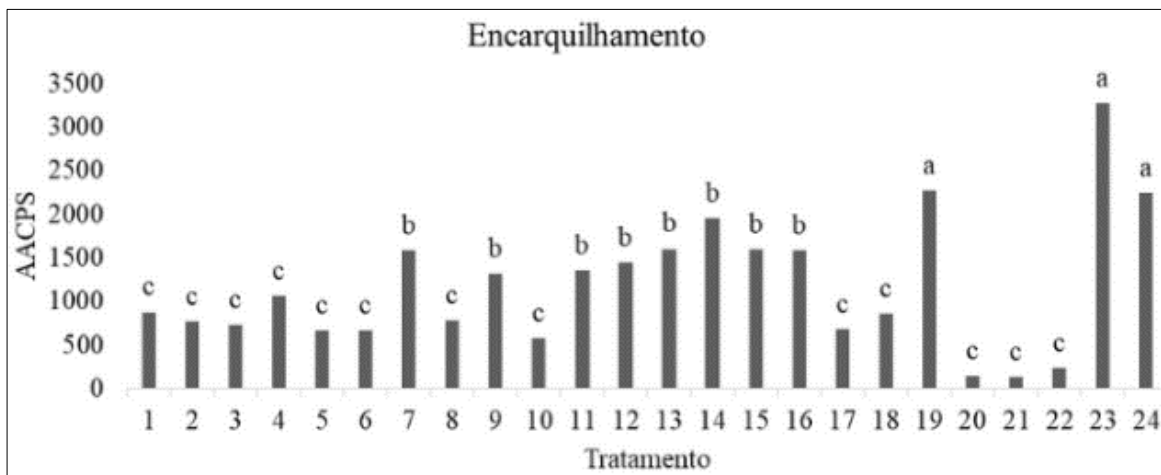
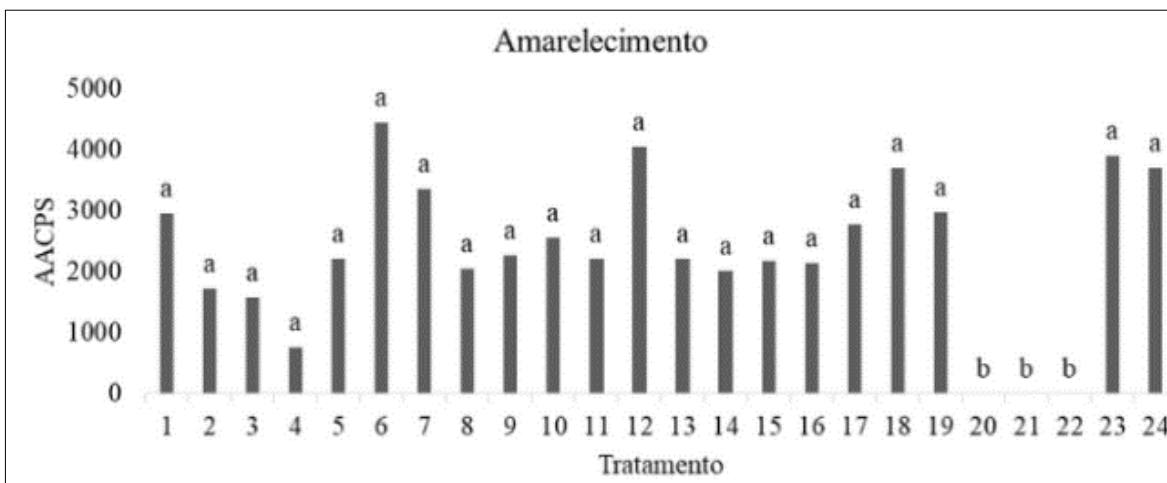
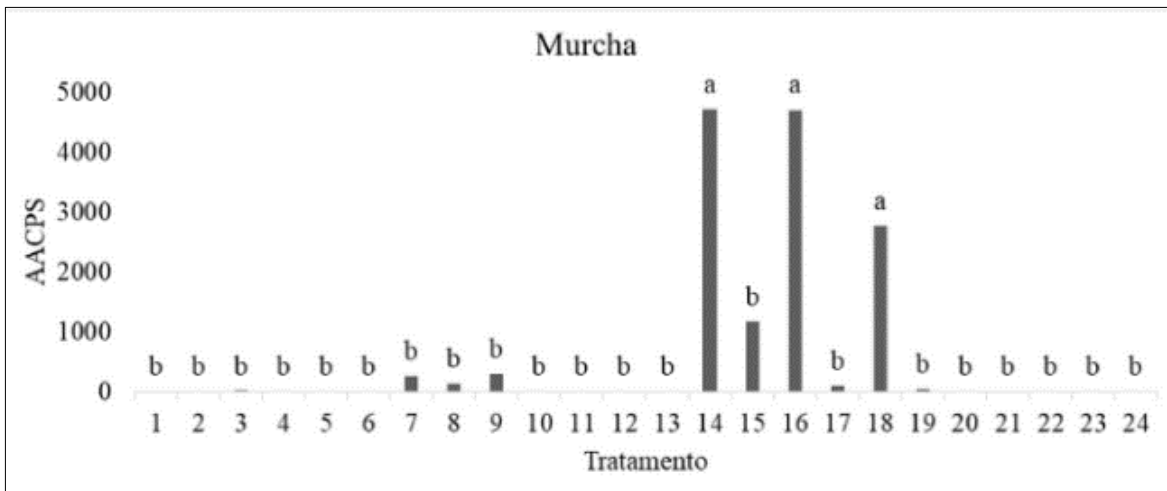
Para clorose, os maiores valores da AACPS ficaram com T23 e T24 tratados apenas com *Fusarium* spp., seguido do segundo grupo de médias, dando um destaque especial para os tratamentos T1 (testemunha) e T14, T15, T16, T17, T18 e T19, esses tratados com *Trichoderma* spp. 30 dias depois da aplicação de *Fusarium* spp. Já no terceiro grupo, destacam-se os tratamentos T5, T6 e T7 submetidos ao tratamento com *Trichoderma* spp. 30 dias antes de *Fusarium solani* e T8 e T9 submetidos ao tratamento com *Trichoderma* spp. no mesmo dia de *Fusarium oxysporum*.

Quanto à necrose e à murcha, percebeu-se que os tratamentos que ficaram no grupo com os maiores valores da AACPS foram os submetidos ao tratamento com *Trichoderma* spp. 30 dias depois de *Fusarium* spp. Já para o amarelecimento, os únicos tratamentos que não apresentaram esse sintoma foram os submetidos apenas à inoculação com *Trichoderma* spp. Quanto ao encarquilhamento das plantas, formaram-se três grupos significativamente distintos, sendo que o grupo que englobou o maior número de tratamentos foi o com os menores valores de AACPS, compreendendo os tratamentos com apenas *Trichoderma* spp., testemunha e os submetidos ao tratamento com *Trichoderma* spp. 30 dias antes de com *Fusarium* spp.

Com esses resultados, percebe-se que a aplicação do antagonista como tratamento preventivo possui efeitos positivos mais significativos na redução dos sintomas da podridão-de-raízes causada por *Fusarium* spp. Isso corresponde ao encontrado por Remedier (2017), que comenta sobre a eficiência do uso de *Trichoderma* estar diretamente relacionada à época de aplicação do biocontrolador, recomendando a aplicação preventiva, como a que foi realizada na presente pesquisa.

Figura 1 - Área Abaixo da Curva de Progresso do Sintoma (AACPS) de plantas de erva-mate submetidas à ação de *Fusarium* spp e tratadas com *Trichoderma* spp em diferentes períodos de aplicação





Fonte: Autores.

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

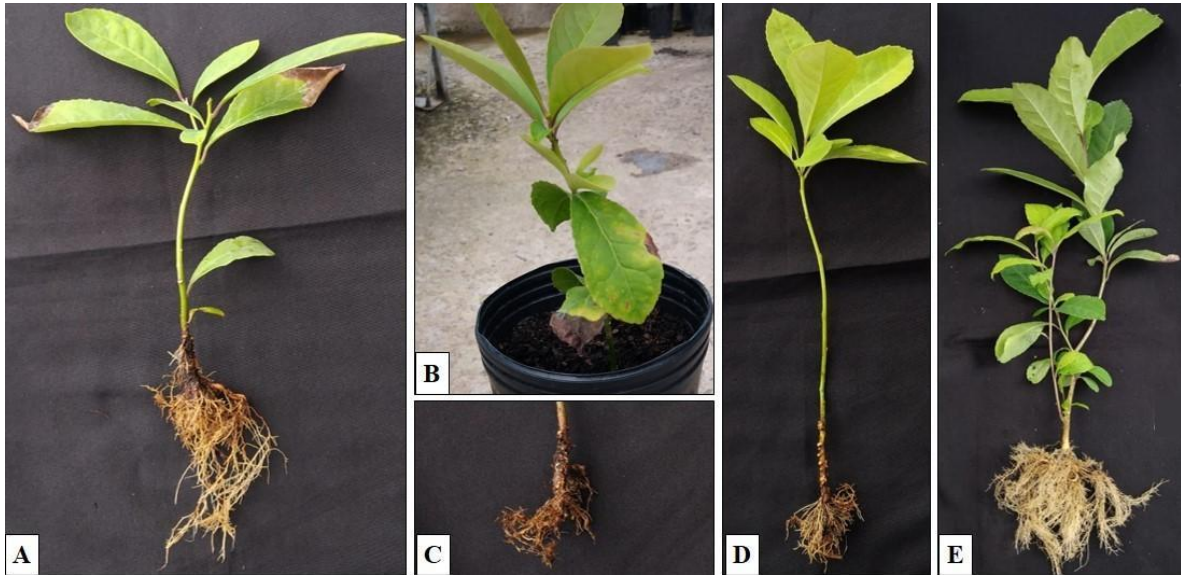
T1: Testemunha; T2: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T3: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T4: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T5: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T6: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T7: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T8: *T. koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T9: *T. asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T10: *T. asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T11: *T. koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T12: *T. asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T13: *T. asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T14: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T15: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T16: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T17: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T18: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T19: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T20: *T. koningiopsis* (IMDI); T21: *T. asperelloides* (ACI); T22: *T. asperelloides* (AVRIII); T23: *F. oxysporum* (I6AR2); T24: *F. solani* (I8AR1).

Santos *et al.* (2016), ao trabalharem com diferentes espécies de *Trichoderma* no controle de *Dactylonectria macrodidyma*, causador do pé-preto em videira (*Vitis vinifera* L.), 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), utilizando metodologia semelhante a este trabalho, estudaram a ação de diferentes espécies de *Trichoderma* isoladas de solo rizosférico de mangueira (*Mangifera indica* L.), no controle de *Ceratocystis fimbriata*. Entre os isolados de *Trichoderma* obtidos estava *T. asperelloides*, que incorporado ao solo por meio de suspensão de 10^6 conídios/mL, reduziu os sintomas da podridão-de-raízes causada pelo patógeno, corroborando aos resultados encontrados no presente estudo. Sarzi *et al.* (2019), ao avaliarem o biocontrole de *Fusarium solani*, agente causal da podridão vermelha da raiz na soja (*Glycine max*), por isolados de *Trichoderma* spp. *in vivo* também concluíram que os isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes na redução dos sintomas causados por *F. solani*.

Na figura 2, é possível observar alguns sintomas causados por *Fusarium* spp. em comparação a uma planta sadia.

Figura 2 - Sintomas causados por *Fusarium* spp. em plantas de erva-mate (*Illex paraguariensis*)



Fonte: Autores.

A e B= clorose seguida de necrose; C= ausência de raízes finas; D= queda de folhas; E= planta sadia.

Na tabela 1, encontram-se os valores obtidos nas variáveis de crescimento dos 24 tratamentos deste estudo. Para a variável número de folhas é possível observar que as médias foram agrupadas em quatro grupos distintos, com as maiores médias nos tratamentos T10, T18, T20, T21 e T22, sendo os três últimos submetidos apenas à inoculação da suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. no substrato. A maioria dos tratamentos, com médias variando de 17 a 20 para o número total de folhas, foi agrupada a seguir. O terceiro grupo englobou seis tratamentos, entre eles T1 (testemunha) e T24 (*Fusarium solani* (I8AR1)). Já no grupo com as menores médias, restaram apenas três tratamentos (T7, T14 e T23), sendo T23 (*Fusarium oxysporum* (I6AR2)), ou seja, *Trichoderma* spp., mesmo com a presença do patógeno no substrato, obteve resultados positivos para a variável número de folhas, quando comparado ao tratamento testemunha.

A altura de plantas está entre as variáveis mais utilizadas para o estudo de implantação de mudas e é uma variável utilizada para determinação do crescimento inicial em campo após o plantio (MELO *et al.*, 2018). No presente estudo, para a variável altura, as médias foram agrupadas em sete grupos distintos, sendo que a maior média (45,39 cm) ficou com o tratamento T20, seguido pelos tratamentos T21 e T22, com médias iguais a 39,50 e 40,43 cm respectivamente, ambos submetidos apenas a inoculação da suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. As menores médias foram dos tratamentos T10, T13 e T14 com valores iguais a 18,05, 18,38 e 18,10 cm,

respectivamente, sendo que para T10 e T13 a aplicação do *Trichoderma* spp. foi simultânea a de *Fusarium* spp., e para T14, *T. koningiopsis* foi aplicado 30 dias após a inoculação de *F. oxysporum*.

Para o comprimento das raízes, as médias foram separadas em cinco grupos, sendo que o tratamento T6, submetido à aplicação do antagonista 30 dias antes do patógeno, constituiu um grupo isolado. O segundo grupo ficou apenas com três tratamentos T3, T20 e T21, sendo os dois últimos submetidos apenas à inoculação da suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. O terceiro grupo englobou a maioria dos tratamentos, entre eles T1 (testemunha) com médias variando de 15,00 a 17,35 cm, e no quarto os tratamentos T7, T11 e T14. Os tratamentos submetidos à inoculação da suspensão de esporos de *Fusarium* spp. (T23 e T24) apresentaram as menores médias. Já para a variável diâmetro do coleto, as médias foram separadas em dois grupos, variando de 5,25 mm para a menor média e 7,63 mm para a maior média, para os tratamentos T12 e T20, respectivamente. Esses resultados corroboram com Amaral *et al.* (2017) que, ao analisar a eficiência da utilização de isolados fúngicos do gênero *Trichoderma* como promotores de crescimento de mudas, obtiveram efeitos significativos de promoção de crescimento de caroba (*Jacaranda micranta*) com a aplicação isolada ou combinada de *T. asperelloides* e *T. virens*.

Tabela 1 – Número de folhas, altura da parte aérea, comprimento de raízes e diâmetro do coleto de plantas de erva-mate, submetidas aos tratamentos com *Trichoderma* spp. testados em diferentes momentos em relação a aplicação dos patógenos de *Fusarium* spp

Tratamento	Nº de folhas	Altura Parte Aérea (cm)	Comprimento Raízes (cm)	Diâmetro do coleto (mm)
T1	13 c*	26,70 d	16,20 c	5,47 b
T2	18 b	25,10 e	15,67 c	5,62 b
T3	20 b	31,80 c	18,50 b	6,80 a
T4	17 b	27,95 d	15,60 c	6,79 a
T5	19 b	25,63 e	16,33 c	5,25 b
T6	15 c	25,80 e	21,98 a	5,75 b
T7	10 d	23,40 e	12,94 d	4,65 b
T8	17 b	33,05 c	15,03 c	7,01 a

T9	17 b	19,96 f	17,05 c	5,50 b
T10	22 a	18,05 g	15,88 c	5,51 b
T11	18 b	21,75 f	13,08 d	5,65 b
T12	19 b	25,03 e	11,10 e	5,25 b
T13	13 c	18,38 g	15,90 c	5,68 b
T14	12 d	18,10 g	14,00 d	5,99 b
T15	16 c	21,78 f	15,28 c	4,93 b
T16	17 b	29,65 d	17,35 c	6,07 b
T17	18 b	27,82 d	11,20 e	6,73 a
T18	21 a	28,20 d	16,00 c	7,08 a
T19	15 c	21,60 f	15,00 c	5,37 b
T20	25 a	45,39 a	19,15 b	7,63 a
T21	25 a	39,50 b	18,50 b	5,45 b
T22	25 a	40,43 b	16,48 c	6,31 a
T23	9 d	17,25 g	11,19 e	4,68 b
T24	16 c	20,75 f	11,65 e	5,35 b
Média Geral	17,1	26,38	15,46	5,86
CV (%)	19,98	5,95	10,85	15,75

Fonte: Autores.

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

T1: Testemunha; T2: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T3: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T4: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T5: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T6: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T7: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T8: *T. koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T9: *T. asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T10: *T. asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T11: *T. koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T12: *T. asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T13: *T. asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T14: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T15: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T16: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T17: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T18: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T19: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T20: *T. koningiopsis* (IMDI); T21: *T. asperelloides* (ACI); T22: *T. asperelloides* (AVRIII); T23: *F. oxysporum* (I6AR2); T24: *F. solani* (I8AR1).

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. Santos (2008) explica que a ação de isolados de *Trichoderma* no incremento de parte aérea e radicular deriva de uma provável eficiência do isolado em se associar simbioticamente com as raízes, e, aliada à sua ação decompositora, libera os nutrientes prontamente absorvíveis para o vegetal, e que, devido à capacidade de determinados isolados de *Trichoderma* em inibir a ação de fitopatógenos, previne que este cause qualquer tipo de interferência no desenvolvimento da planta.

Em algumas variáveis, a combinação de *Fusarium* spp. com as espécies de *Trichoderma* afetou negativamente o desenvolvimento das plantas, tanto em relação à testemunha como ao tratamento somente com inoculação de *F. solani*. Milanesi *et al.* (2013) justificam o efeito negativo na relação entre o patógeno e os isolados de *Trichoderma* spp., em função das possíveis relações antagônicas entre os metabólitos produzidos por ambos os fungos, refletindo diretamente no desenvolvimento das plantas tratadas com esses microorganismos.

Na Tabela 2, estão os resultados referentes ao comprimento e à largura das folhas apenas para os tratamentos submetidos à inoculação de *Fusarium* spp., e *Trichoderma* spp. em comparação com a testemunha. Para ambas variáveis, o melhor tratamento foi T20 (*T. koningiopsis*), com médias iguais a 173,09 e 74,13 mm para comprimento e largura respectivamente, seguido dos dois isolados de *Trichoderma asperelloides*, T21 com 165,65 e 63,78 mm para comprimento e largura respectivamente, e T22 com média igual a 167,45 mm para comprimento e 66,08 mm para largura, sendo que os três tratamentos foram submetidos apenas a inoculação da suspensão de esporos de *Trichoderma* spp., e todos diferiram estatisticamente da testemunha (T1) e dos tratamentos T23 e T24 que foram submetidos apenas à aplicação da suspensão de esporos de *Fusarium* spp.

O resultado desse estudo se faz importante, pois mostrou um aumento do comprimento e da largura das folhas de erva mate, essas que, por sua vez, são o principal produto da espécie sendo utilizadas como matéria prima para vários produtos em diferentes segmentos industriais como no setor alimentício, de cosméticos e farmacêuticos. Vey (2017), ao avaliar o crescimento inicial de plantas de trigo (*Triticum aestivum*) tratadas com *Trichoderma* spp., obteve resultados semelhantes a este estudo, onde todos os tratamentos utilizando *Trichoderma* spp. foram superiores ao tratamento testemunha para variável comprimento de folhas. A promoção de crescimento por

isolados de *Trichoderma* pode ocorrer principalmente através da produção de hormônios ou pelo aumento da eficiência de absorção de nutrientes (MACHADO *et al.*, 2012).

Tabela 2 - Comprimento e largura da maior folha de plantas de Erva-mate, submetidas aos tratamentos com *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp

Tratamento	Comprimento (mm)	Largura (mm)
T1	129,01 c*	33,78 c
T20	173,09 a	74,13 a
T21	165,65 b	63,78 b
T22	167,45 b	66,08 b
T23	119,57 d	23,69 d
T24	122,75 d	25,03 d
Média Geral	146,25	47,75
CV (%)	1,74	5,98

Fonte: Autores.

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). T1: Testemunha; T20: *T. koningiopsis* (IMDI); T21: *T. asperelloides* (ACI); T22: *T. asperelloides* (AVRIII); T23: *F. oxysporum* (I6AR2); T24: *F. solani* (I8AR1).

Na figura 3, observa-se a diferença na promoção de crescimento nos tratamentos em que foi aplicada somente a suspensão de esporos de *Trichoderma* spp., de *Fusarium* spp. e a comparação com o tratamento testemunha.

Figura 3 - Crescimento de plantas de erva-mate, submetidas aos tratamentos com *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp., separadamente



Fonte: Autores.

T1: Testemunha; T20: *T. koningiopsis* (IMDI); T21: *T. asperelloides* (ACI); T22: *T. asperelloides* (AVRIII); T23: *F. oxysporum* (I6AR2); T24: *F. solani* (I8AR1).

Para a massa fresca e a massa seca da parte aérea, bem como da raiz houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3). Para massa fresca da parte aérea (MFPA), a maioria dos tratamentos não diferenciam estatisticamente da testemunha (T1), com exceção dos tratamentos inoculados apenas com a suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. que obtiveram as maiores médias. Os tratamentos em que apenas *Fusarium* spp. foi inoculado e também para aqueles tratamentos em que a suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. foi inoculada 30 dias após a de *Fusarium* spp., ficaram com as menores médias de MFPA. Para massa fresca da raiz (MFR), a maioria dos tratamentos, tanto na presença quanto na ausência do patógeno, apresentaram valores superiores quando comparado com a testemunha ou aos tratamentos submetidos apenas à inoculação do patógeno.

Verificou-se que, de forma geral, quando houve inoculação de *Fusarium* spp., 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 T8 com 27,95 g para a MFPA e para a maioria dos tratamentos com

a suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. com médias que variaram de 14,20 g (T6) e 17,64 g (T21), para a MFR.

Resultados positivos no aumento da biomassa com a inoculação de *Trichoderma* também são encontrados em outros trabalhos com diferentes culturas, como no estudo de Steffen *et al.* (2021) que, ao avaliarem o potencial de duas cepas de *T. asperelloides* e *T. virens* para promover aumentos na qualidade e produtividade da couve folha (*Brassica oleracea* L.var. acephala) em condições de campo, relataram que as duas cepas mostraram aumentos significativos no peso fresco total por planta em relação ao tratamento controle. Taribuka *et al.* (2017), ao utilizarem de *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis* e *T. gamsii* no desenvolvimento de bananeiras (*Musa* sp.), observaram ganhos nas mudas como altura das plantas, diâmetro do pseudocaule, número de folhas, massa fresca da parte aérea, massa fresca e comprimento das raízes. Jesus *et al.* (2011) ressaltaram o potencial de *T. asperellum* como condicionador de substrato para a produção de mudas de café (*Coffea arabica*), evidenciando o efeito positivo no aumento da biomassa da raiz, da parte aérea e total, bem como o aumento da eficiência da absorção de fósforo. Santos *et al.* (2010) concluíram que o uso de *Trichoderma* spp. proporcionou resultados positivos no incremento de massa fresca e seca de plantas de maracujá (*Passiflora edulis*).

Tabela 3 - Massa fresca da parte aérea (MFPA), Massa fresca da raiz (MFR), Massa seca de parte aérea (MSPA), e Massa seca da raiz (MSR) de plantas de erva-mate, submetidas aos tratamentos com *Trichoderma* spp. testado em diferentes momentos em relação a aplicação dos patógenos de *Fusarium* spp.

Tratamento	MFPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
T1	21,20 c*	12,57 c	12,09 b	6,31 b
T2	15,50 d	8,46 d	10,68 b	5,84 b
T3	23,00 c	16,69 b	13,24 a	6,91 a
T4	24,64 c	16,44 b	14,02 a	7,24 a
T5	19,71 c	8,52 d	12,09 b	5,78 b
T6	19,69 c	14,20 b	11,96 b	6,02 b
T7	11,82 d	6,20 d	9,27 b	4,13 b
T8	27,95 b	12,71 c	14,76 a	6,61 a
T9	22,55 c	16,42 b	14,24 a	7,11 a
T10	17,98 d	17,27 b	11,64 b	6,25 b

T11	20,38 c	11,10 c	12,00 b	6,42 b
T12	21,90 c	15,60 b	13,08 a	7,47 a
T13	21,96 c	9,97 d	12,16 b	7,30 a
T14	17,09 d	16,51 b	10,76 b	7,36 a
T15	17,42 d	12,30 c	11,31 b	5,94 b
T16	21,46 c	8,96 d	12,11 b	4,87 b
T17	14,13 d	15,32 b	9,79 b	5,18 b
T18	17,80 d	12,64 c	12,13 b	6,69 a
T19	14,67 d	13,16 c	9,90 b	5,10 b
T20	39,57 a	20,96 a	16,82 a	8,16 a
T21	34,05 b	17,64 b	14,23 a	7,54 a
T22	33,38 b	17,38 b	14,08 a	7,32 a
T23	15,91 d	8,58 d	9,97 b	5,80 b
T24	16,54 d	11,18 c	10,69 b	6,05 b
Média Geral	21,26	13,36	12,21	6,39
CV (%)	16,84	13,7	17,74	18,62

Fonte: Autores.

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). T1: Testemunha; T2: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T3: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T4: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T5: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T6: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T7: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T8: *T. koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T9: *T. asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T10: *T. asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T11: *T. koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T12: *T. asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T13: *T. asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T14: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T15: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T16: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T17: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T18: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T19: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T20: *T. koningiopsis* (IMDI); T21: *T. asperelloides* (ACI); T22: *T. asperelloides* (AVRIII); T23: *F. oxysporum* (I6AR2); T24: *F. solani* (I8AR1).

Para massa seca da parte aérea (MSPA), oito tratamentos obtiveram as maiores médias, sendo T3 e T4 com a suspensão de *Trichoderma* spp. aplicados 30 dias antes de *Fusarium* spp., T8, T9 e T12 com *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. inoculados no mesmo dia e T20, T21 e T22 com aplicação apenas de *Fusarium* spp., com valores variando de 13,08 a 16,82 g. Esses se

diferenciam estatisticamente de todos os tratamentos onde *Trichoderma* spp. foram inoculados 30 dias após a aplicação de *Fusarium* spp. (T14 ao T19), do T23 e do T24 que foram inoculados apenas a suspensão de esporos de *Fusarium* spp., e do tratamento testemunha (T1), com valores variando de 9,27 a 12,16 g. Já para massa seca da raiz (MSR), 11 tratamentos obtiveram as maiores médias, sendo que esses tratamentos ocorreram em todos os estágios de aplicação do *Trichoderma* spp. em relação a aplicação do *Fusarium* spp., com exceção do tratamento testemunha e dos dois tratamentos que foi inoculado apenas *Fusarium* spp.

O aumento da MSPA e MSR devido à utilização de *Trichoderma* spp. foi relatado por outros autores em outras espécies. Em *Jacaranda micranta* (caroba), Amaral *et al.* (2017), ao incorporarem *T. asperellum* no substrato, relataram um aumento de 73,9 mg para MSR e 129,84 mg para MSPA em comparação ao tratamento controle. Bokhari e Perveen (2012) também comprovaram o potencial de *T. harzianum* em reduzir os danos provocados por *F. solani* na cultura do tomate (*Solanum lycopersicum*), quando comparado às plantas inoculadas apenas com o patógeno, além de ser eficaz na promoção do crescimento e maior massa seca das plantas. Bubanz *et al.* (2019), ao avaliar o crescimento, desenvolvimento e aspectos produtivos do morangueiro (*Fragaria x ananassa*) submetidos a inoculação de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *T. asperellum* com e sem associação ao silício, constatou que o tratamento com *T. asperellum* aumentou a massa seca da parte aérea (MSA) e a massa seca das raízes (MSR). Com esses resultados é possível perceber que em diferentes culturas, de modo geral, quando foi utilizado *Trichoderma* spp. houve maior desenvolvimento das plantas, constatado através do aumento da massa fresca e massa seca das plantas.

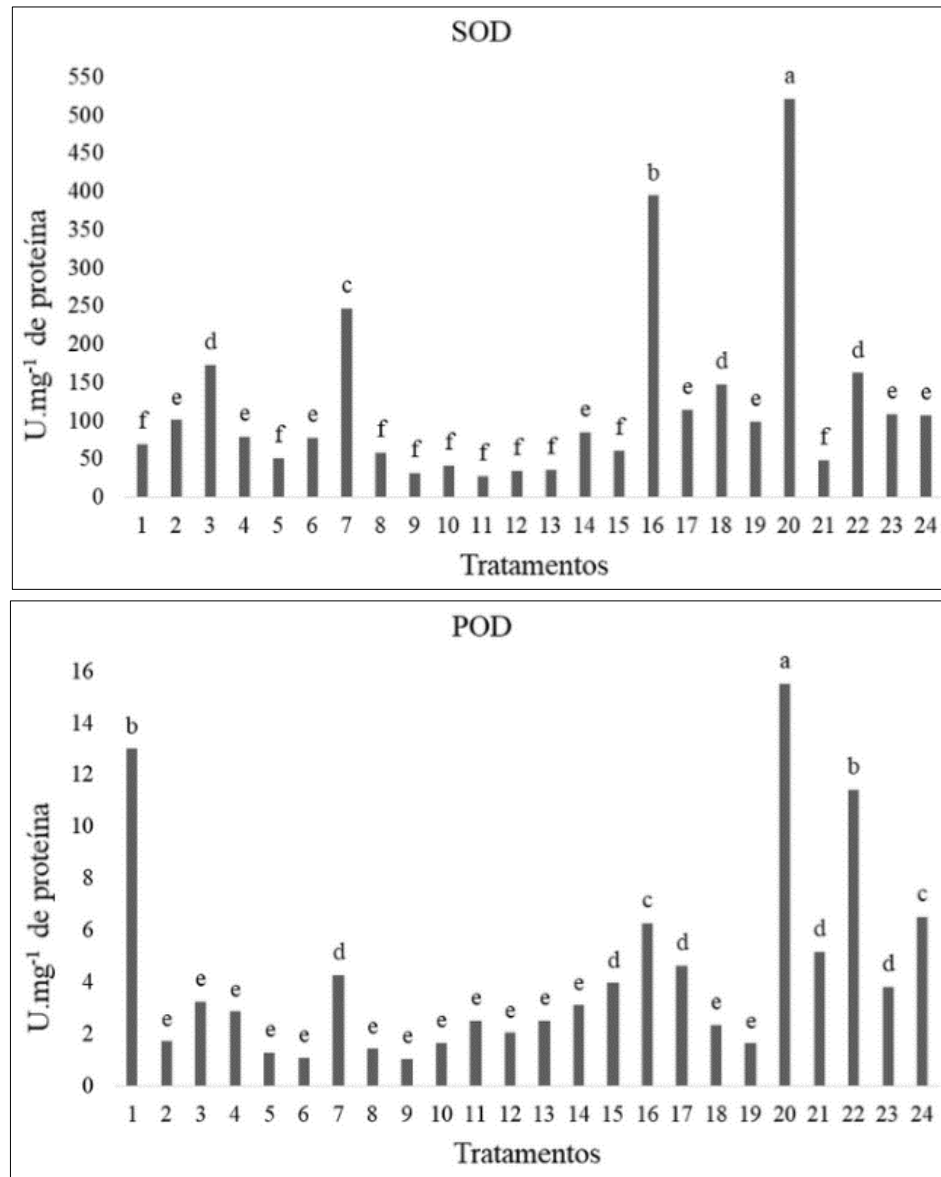
Quando as plantas são expostas a estresses bióticos, como a presença de patógenos, mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos podem ser ativados. Entre os mecanismos de defesa enzimáticos, está a enzima superóxido dismutase (SOD), que é responsável por catalisar a dismutação do $O_2\cdot^-$ e HO_2+ a H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), sendo assim, a maioria do H_2O_2 celular é proveniente da dismutação do $O_2\cdot^-$ catalisada pela SOD (RESENDE *et al.*, 2003). Em condições normais da planta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) encontra-se em equilíbrio, no entanto, quando ocorre um estresse a planta responde com uma reação oxidativa ocasionando um desequilíbrio no acúmulo dessas moléculas, fazendo com que outros mecanismos de defesa da planta sejam ativados (TAIZ; ZEIGER, 2013)

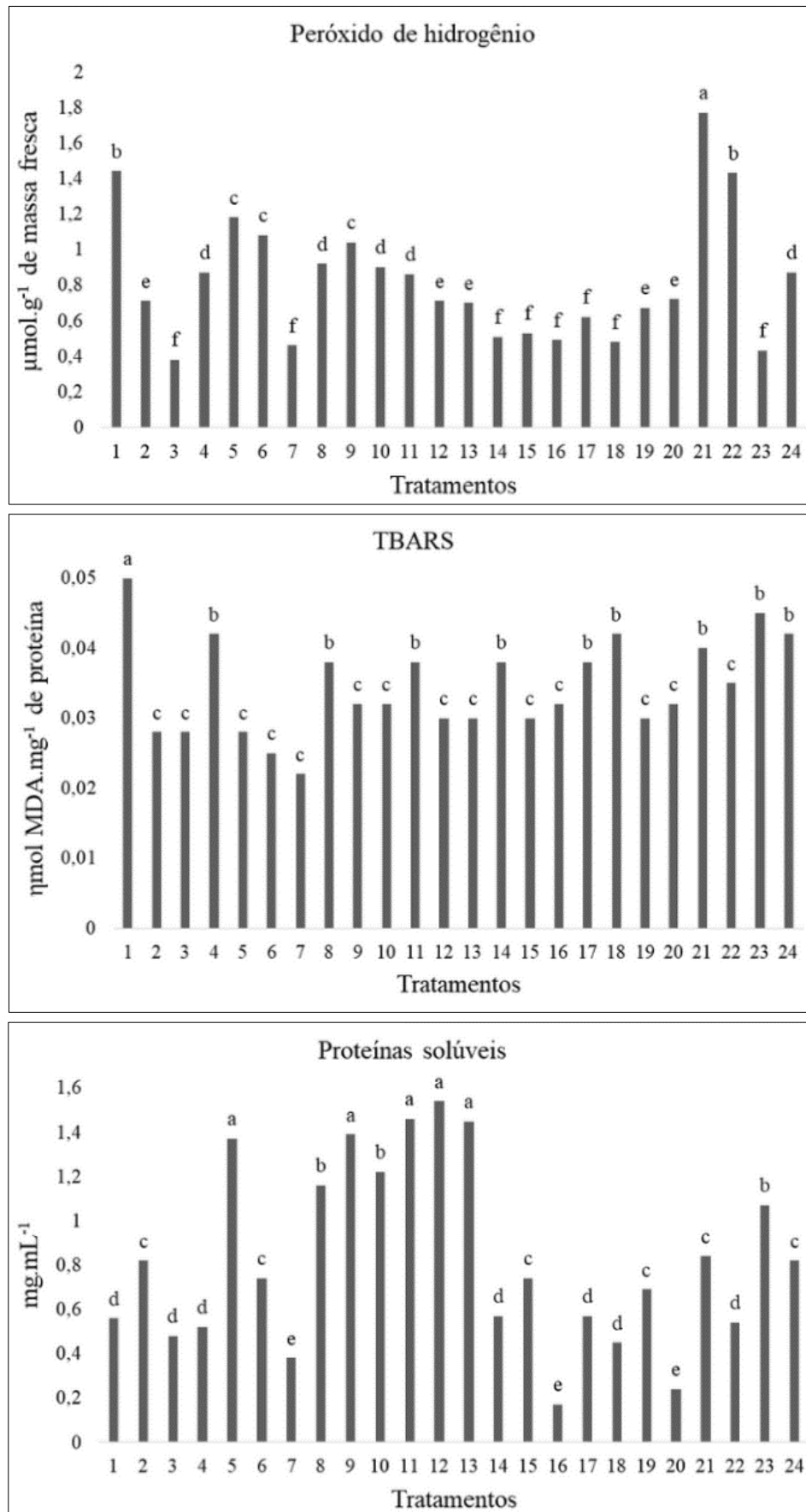
Na análise da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e da enzima guaiacol peroxidase (POD), é possível observar que de forma geral as diferenças estatísticas entre os tratamentos variaram bastante, com exceção dos tratamentos submetidos a inoculação de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. no mesmo dia, em que todos obtiveram as menores médias. Para SOD e para POD as menores atividades ficaram com os tratamentos submetidos à inoculação de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. no mesmo dia, juntamente com os tratamentos em que *Trichoderma* spp. foram inoculados 30 dias antes que *Fusarium* spp. Isso indica que nesses tratamentos o *Trichoderma* spp. pode ter ajudado na redução do estresse oxidativo promovido pelo patógeno, não necessitando ativar as enzimas antioxidantes. Esses dados estão de acordo com os resultados das variáveis de crescimento, onde a presença de *Trichoderma* spp. promoveu maior crescimento das plantas, mesmo na presença do patógeno. Por outro lado, a maior atividade tanto para SOD como para POD foi observada no tratamento T20 submetido apenas à inoculação com *Trichoderma koningiopsis*, mostrando que a inoculação desse isolado estimulou a atividade dessas enzimas (Figura 4), o que desencadeou menor acúmulo de peróxido de hidrogênio e menor dano em lipídios de membrana.

Gajera *et al.* (2016), também observaram que os tratamentos com *Trichoderma* sp. tiveram maior atividade de SOD e POD ao compararem o efeito do tratamento controle, da inoculação de *Aspergillus niger* isoladamente e da associação entre o patógeno e *Trichoderma viride* na cultura do amendoim (*Arachis hypogaea*). Segundo os autores, pode ter ocorrido devido à resistência induzida pelo agente de biocontrole.

A atividade da POD pode estar envolvida também na defesa contra estresses consumindo o peróxido de hidrogênio e na biossíntese de lignina, além de catalisar a oxidação de compostos orgânicos como aminas aromáticas, fenóis, utilizando o peróxido de hidrogênio como oxidante (BOGUSZEWSKA; ZAGDAŃSKA, 2012). A enzima também pode estar ligada ao crescimento e desenvolvimento das plantas (TAYEFI-NASRABADI *et al.*, 2011). As citações desses autores corroboram com o presente estudo, onde a maior atividade da POD foi no tratamento T20 que, consequentemente, teve a menor concentração de peróxido de hidrogênio. Com isso, pode-se dizer que a ativação dessa enzima foi efetiva em controlar os níveis de H₂O₂ nas raízes submetidas ao tratamento com *Trichoderma koningiopsis*. T20 também foi o tratamento com as maiores médias nas variáveis de crescimento do presente estudo.

Figura 4 - Efeito dos tratamentos com *Trichoderma* spp. testado em diferentes momentos em relação a aplicação dos patógenos de *Fusarium* spp. sobre o sistema de enzimas antioxidantes, proteínas solúveis e peroxidação de lipídeos de membrana em raízes de plantas de erva-mate





Fonte: Autores.

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

T1: Testemunha; T2: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T3: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T4: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes do *F. oxysporum* (I6AR2); T5: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T6: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T7: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias antes do *F. solani* (I8AR1); T8: *T. koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T9: *T. asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T10: *T. asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *F. oxysporum* (I6AR2); T11: *T. koningiopsis* (IMDI) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T12: *T. asperelloides* (ACI) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T13: *T. asperelloides* (AVRIII) no mesmo dia que *F. solani* (I8AR1); T14: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T15: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T16: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois do *F. oxysporum* (I6AR2); T17: *T. koningiopsis* (IMDI) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T18: *T. asperelloides* (ACI) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T19: *T. asperelloides* (AVRIII) 30 dias depois do *F. solani* (I8AR1); T20: *T. koningiopsis* (IMDI); T21: *T. asperelloides* (ACI); T22: *T. asperelloides* (AVRIII); T23: *F. oxysporum* (I6AR2); T24: *F. solani* (I8AR1); SOD: Atividade da enzima superóxido dismutase; POD: Atividade da enzima guaiacol peroxidase; TBARS: Peroxidação de lipídeos de membrana.

Em relação à peroxidação de lipídeos de membrana, o maior valor foi observado no tratamento testemunha e as menores médias ficaram com a maioria dos tratamentos, o que mostra que *Trichoderma* spp., mesmo com a presença do patógeno no substrato, obteve resultados positivos para a variável TBARS, quando comparado ao tratamento testemunha. Segundo Bernardy *et al.* (2020), a peroxidação lipídica é o sintoma mais proeminente de estresse oxidativo nas plantas.

Em relação às proteínas solúveis, o tratamento com inoculação de *T. koningiopsis* 30 dias antes do *F. solani* (T5) e os tratamentos com *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. inoculados no mesmo dia (T9, T11, T12, T13) obtiveram os maiores valores. A produção de proteínas solúveis é um dos mecanismos induzidos pela resposta de hipersensibilidade (HR) da relação entre patógeno e hospedeiro, por isso, são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese (FERNANDES *et al.*, 2009).

4.4 CONCLUSÕES

A aplicação de *Trichoderma* spp. no substrato é capaz de controlar a doença podridão-de-raízes causada por *F. oxysporum* e *F. solani* em mudas de erva-mate.

Os isolados de *Trichoderma* spp. possuem efeito positivo no crescimento e induzem à resistência das plantas de erva-mate.

4.5 REFERÊNCIAS

- AMARAL, P. P. *et al.* Promotores de crescimento na propagação de caroba. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 90, p. 149 - 157, 2017. Disponível em: <<https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/1402>>. Acesso em: 29 nov. 2021.
- AZEVEDO, D. M. Q. *et al.* Antagonistic effect of *Trichoderma* isolates and its metabolites against *Fusarium solani* and *F. oxysporum* in chickpea. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 36344 - 36361, 2020. Disponível em: <<https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/11481>>. Acesso em: 10 dez. 2021.
- BERNARDY, K. *et al.* Plants' genetic variation approach applied to zinc contamination: secondary metabolites and enzymes of the antioxidant system in *Pfaffia glomerata* accessions. **Chemosphere**, v. 253, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32283427/>>. Acesso em: 04 dez. 2021.
- BOGUSZEWSKA, D.; ZAGDAŃSKA, B. ROS as signaling molecules and enzymes of plant response to unfavorable environmental conditions. In: (Ed) LUSHCHAK, V.; SEMCHYSCHYN, H. **Oxidative stress—molecular mechanisms and biological effects**. Rijeka, Croatia: InTech, p. 341 - 362, 2012.
- BOKHARI, N. A.; PERVEEN, K. Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 44, p. 7193 - 7197, 2012. Disponível em: <https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/antagonistic_action_of_trichoderma_harzianum.compressed.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2021.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 nov. 2021.
- 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, 2020. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/7145709>>. Acesso em: 05 dez. 2021.
- BUBANZ, H. C. S. *et al.* Crescimento, desenvolvimento e aspectos produtivos do morangueiro submetido à inoculações com *Bacillus amyloliquefaciens*, *Azospirillum brasilense* e *Trichoderma asperellum* com e sem associação ao silício. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 22, n. 1, p. 131 - 146, 2019. Disponível em: <<https://revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/572>>. Acesso em: 07 nov. 2021.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley e Sons, 1990. 532p.

CARVALHO, D. D. C. *et al.* Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.822 - 828, 2011. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/pab/a/RxqNb8mYbDsqm97LQVyQKMG/?lang=em>>. Acesso em: 17 dez. 2021.

DRUZHININA, I. S. *et al.* *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**. v. 16. p. 749 - 759. 2011. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/nrmicro2637>>. Acesso em: 29 dez. 2021.

EL-MOSHATY, F.I.B. *et al.* Lipid peroxidation and superoxide productions in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco rings virus or southern bean mosaic virus.

Physiological and Molecular Plant Pathology, v.43, p.109 - 119, 1993. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576583710441>>. Acesso em: 30 dez. 2021.

FERNANDES, C. de F. *et al.* Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109 - 112, 2014. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/cagro/a/yyWQQVwqNcH6kzf9qT9Jdhv/?lang=em>>. Acesso em: 13 nov. 2021.

GAJERA, H. P. *et al.* Antioxidant defense response induced by *Trichoderma viride* against *Aspergillus niger* Van Tieghem causing collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.).

Microbial pathogenesis, v. 91, p. 26 - 34, 2016. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26620080/>>. Acesso em: 12 out. 2021.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Plant Physiology**, v. 48, n. 59, p. 315 - 318, 1977. Disponível em:

<<http://www.plantphysiol.org/content/59/2/315>>. Acesso em: 13 nov. 2021.

GOMES, N. S. B. *et al.* Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 43, p.123 - 138, 2001. Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/30240/1/gomes.pdf>>. Acesso em: 16 dez. 2021.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Efeito de fungicidas no controle da pinta-preta da erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 46, p. 91 - 96, 2003. Disponível em:

<<https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/1621>>. Acesso em: 06 nov. 2021.

GRIGOLETTI JUNIOR, A. *et al.* Doenças em Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill) na região sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 32/33, p. 43 - 51 Embrapa Florestas.

Colombo. 1996. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/282156/doencas-em-erva-mate-ilex-paraguariensis-st-hil-na-regiao-sul-do-brasil>>.

Acesso em: 01 dez. 2021.

- HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43 - 56, 2004. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro797>>. Acesso em: 17 dez. 2021.
- HERMOSA, R. *et al.* Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, New York, v. 158, p. 17 - 25, 2012. Disponível em: <<https://www.meta.org/papers/plant-beneficial-effects-of-trichoderma-and-of/21998166>>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- JESUS, E. P. *et al.* Avaliação do potencial de *Trichoderma asperellum* como condicionador de substrato para a produção de mudas de café. **Cerrado Agrociência**, Patos de Minas-MG, v. 2, n. 2, p. 7 - 19. 2011.
- LIMA, N. S. *et al.* Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptina resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. **Life Sciences**, Elmsford, v. 115, p. 29 - 35, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25241125/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.
- LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1781 - 1787, 2001. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/127/4/1781>>. Acesso em: 04 dez. 2021.
- LUCON, C. M. M. *et al.* **Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura**. 1. Ed. São Paulo: Instituto Biológico, 2014. 28 p.
- MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, p. 274 - 288, 2012. Disponível em: <<https://revistas.rcaap.pt/index.php/rca/article/view/16182>>. Acesso em: 14 nov. 2021.
- 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 Management Science**, v. 68, n. 4, p. 602 - 609. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ps.2303>>. Acesso em: 23 dez. 2021.
- 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.
- MELO, L. A. *et al.* Qualidade e crescimento inicial de mudas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. produzidas em diferentes volumes de recipientes. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 47 -55, 2018. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/31574/0>>. Acesso em: 22 dez. 2021.
- MEZZOMO, R. *et al.* Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to *Ilex paraguariensis*. **Cerne**, v. 24, n. 3, p. 209 - 218, 2018. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/cerne/a/QgknMh4mthmdVqsZqrLq3HM/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 08 dez. 2021.

MILANESI, P. M. *et al.* Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 36, n. 3, p. 347 - 356, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2013000300010>. Acesso em 02 nov. 2021.

OLIVEIRA, S.M.A.; DANTAS, S.A.F.; GURGEL, L.M.S. Indução de resistência em doenças pós-colheita em frutas e hortaliças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 12, p. 343 - 371, 2015.

POLETTI, I *et al.* Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, v. 25, p. 281 - 291, 2015. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/18445>>. Acesso em: 05 dez. 2021.

POLETTI, I. *et al.* Influência da inoculação de *Fusarium* spp. e níveis de sombreamento no crescimento e desenvolvimento da erva mate. **Revista Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 513 - 521, 2010. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/2065>>. Acesso em: 11 dez. 2021.

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

POLETTI, I. *et al.* Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. st.-hil.) na região do Vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1 - 10, 2006. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1882>>. Acesso em: 05 dez. 2021

REMEDIER, **Eco-friendly against soil-borne diseases**. Milan: Isagro, 2017. Disponível em: <<https://www.isagro.com/static/upload/31-/31-remedier.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2021

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**, v. 28, p. 123 - 130, 2003. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/fb/a/SJhZbnN94KKSksvg9TKy4Zb/?lang=pt>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

SANTOS, H. A.; MELLO, S. C. M.; PEIXOTO, J. R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido indol-3-butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia-MG, v. 26, n. 6, p. 966 -972, 2010. Disponível em: <<https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7212>>. Acesso em: 29 out. 2021.

SANTOS, H. A. ***Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum***. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

SANTOS R. F. *et al.* *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 55, n. 2, p. 293 - 300, 2016. Disponível em: <[10.14601/Phytopathol_Mediterr-18048](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18048)>. Acesso em: 11 dez. 2021.

SARZI, J. S. *et al.* Biocontrole da podridão vermelha da raiz e promoção de crescimento da soja. **Nativa**, v. 7, n. 6, p. 629 - 635, 2019. Disponível em: <<https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/nativa/article/view/6818>>. Acesso em: 17 dez. 2021.

SIMONATO, F.; GRIGOLLI, J.F.J.; OLIVEIRA, H.N. **Controle Biológico de Insetos -Praga na Soja**. Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014. 2014.

SOUZA, A. V. V. *et al.* Enraizamento *in vitro* de catuaba (*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. Ex de Souza), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 51 - 58, 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/T7Vrgjr35g8MML9GcDgyyJq/?lang=pt>>. Acesso em: 30 out. 2021.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2012.

STEFFEN, G. P. K. *et al.* Increasing productivity of cabbage by two species of *Trichoderma* fungi. **International Journal of Environmental Studies**, v. 78, n. 5, p. 797 -803, 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00207233.2020.1845551>>. Acesso em: 02 nov. 2021.

TAIZ, L.; ZEIGER E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TARIBUKA, J.; WIBOWO, A.; WIDYASTUTI, S. M.; SUMARDIYON, C. Potency of six isolates of biocontrol agents endophytic *Trichoderma* against fusarium wilt on banana. **Journal of Degraded of Mining Lands Management**, v. 4, n. 2, p. 723 - 731, 2017. Disponível em: <<https://jdmlm.ub.ac.id/index.php/jdmlm/article/view/240>>. Acesso em 18 nov. 2021.

TAYEFI-NASRABADI, H. *et al.* Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv.) cultivars. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 751 - 763, 2011. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92460>>. Acesso em: 03 nov. 2021.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. Doenças fúngicas de solo na cultura da batata: sintomas, etiologia e manejo. **O Biológico**, v. 81, n. 1, p. 1 - 24, 2019. Disponível em: <http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/V81_1/5a7558d4-21e8-487d-81a6-1a4948d83679.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2021.

VEY, R. T. **Trichoderma e silicato de potássio no desenvolvimento e na redução da ferrugem da folha no trigo**. 2017. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

ZERAIK, A.E. *et al.* Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, p. 731 - 734, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000400003>. Acesso em: 12 dez. 2021.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O controle biológico vem ganhando cada vez mais representatividade em diversas cadeias produtivas mundiais, devido à plasticidade das espécies benéficas capazes de atuar simbioticamente nas associações planta-organismos. Como pode ser observado no Capítulo I deste estudo, *Trichoderma* spp. está presente em ervais do Rio Grande do Sul, apresentando potencial biocontrolador variável para *Fusarium* spp., causador da podridão-de-raízes na cultura da erva-mate, onde reduziu significativamente o crescimento do patógeno quando comparado à testemunha.

Ainda com relação à sanidade dos ervais no RS, são poucas as pesquisas com a utilização de agentes de biocontrole, mas sabe-se que em nível mundial a utilização de produtos químicos e manejo incorreto do solo acarreta em perda de biodiversidade dos ecossistemas e redução da produtividade das áreas cultiváveis. Nesse sentido, o controle biológico e seu agente de maior destaque, *Trichoderma* spp., vem permitindo um maior aproveitamento dessas áreas e reduzindo o nível de dano ambiental, uma vez que tendem a permanecer no solo ao passar do tempo.

No Capítulo II, foi estudado o potencial *Trichoderma* spp. como agente biocontrolador *in vivo* como promotor de crescimento e indutor de resistência de plantas de erva-mate. Como pôde ser observado, *Trichoderma* spp. atuou com eficiência no controle da doença, tanto de forma preventiva (30 dias antes) como de forma curativa (30 dias depois). Além disso, também promoveu o desenvolvimento da planta e atuou como indutor de resistência, uma vez que os tratamentos submetidos à inoculação de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. no mesmo dia, juntamente com os tratamentos em que *Trichoderma* spp. foram inoculados 30 dias antes que *Fusarium* spp. apresentaram as menores atividade enzimas SOD e POD ligadas a indução de resistência, indicando que nesses tratamentos o *Trichoderma* spp. pode ter ajudado na redução do estresse oxidativo promovido pelo patógeno, não necessitando ativar as enzimas antioxidantes. Além disso, os tratamentos em que *Trichoderma* spp. foram inoculados 30 dias antes que *Fusarium* spp. apresentaram maior conteúdo de proteínas solúveis totais. Dessa forma, constatou-se que a ação “*in vivo*” de *Trichoderma* spp. controlou a podridão-de-raízes, causada por *F. oxysporum* e *F. solani* em mudas de erva-mate e que os isolados de *Trichoderma* spp. promoveram o crescimento e induziram à resistência das plantas de erva-mate.