

Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro***Trichoderma asperellum* and *Bacillus subtilis* as antagonists in the growth of phytopathogenic fungi *in vitro***

DOI:10.34117/bjdv6n8-123

Recebimento dos originais:08/07/2020

Aceitação para publicação:12/08/2020

Gislaine Gabardo

Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa
Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa
Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas - CEP 84030-900, Ponta Grossa - PR, Brasil
E-mail: gislainegabardo2007@yahoo.com.br

Maristella Dalla Pria

Doutora em Fitopatologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa
Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas - CEP 84030-900, Ponta Grossa - PR, Brasil
E-mail: mdallapria@uol.com.br

André Manosso Correa Prestes

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Instituição: Grupo Pitangueiras
Endereço: Av. R. Sen. Flávio C. Guimarães, nº 1111 - Boa Vista, CEP 84070460, Ponta Grossa - PR, Brasil
E-mail: a.prestes@outlook.com

Henrique Luis da Silva

Mestre em Fitotecnia pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Instituição: IAPAR- Instituto Agrônomo do Paraná
Endereço: Rodovia do Café, km 496 (Av. Presidente Kennedy, s/nº)
Caixa Postal nº 129 – CEP 84001-970, Ponta Grossa - PR, Brasil
E-mail: hluissilva@gmail.com

RESUMO

No atual cenário da agricultura, o controle biológico de doenças vem ganhando importância. O controle biológico não é só a interação entre patógeno, hospedeiro e ambiente, mas o resultado desta interação. Os mecanismos das interações antagonistas podem ser: antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de defesa do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de agentes antagonistas no crescimento de fitopatógenos *in vitro*. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições. Os antagonistas testados foram *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* e os fitopatógenos: *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, e *Colletotrichum dematium* var. *truncata*. Para determinar o antagonismo foi utilizado o método do pareamento de colônias e para avaliar os efeitos dos produtos

metabólicos tóxicos voláteis dos antagonistas sobre os fungos fitopatogênicos, foi utilizado o método de Gibbs. Pelo teste de culturas pareadas, *T. asperellum* colonizou e produziu esporos sobre *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* e *C. dematium* var *truncata* e houve formação do halo de inibição apenas para *R. solani*. *T. asperellum* mostrou potencial para antagonizar *S. rolfsii*, *R. solani* e *C. dematium* var *truncata* pelo método de produção de metabólitos tóxicos. Não houve formação de escleródios. *B. subtilis* mostrou-se eficiente no controle de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, mas não impediu que formassem escleródios. *T. asperellum* mostrou-se mais eficiente que *B. subtilis* no controle biológico dos fitopatógenos *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* e *R. solani*.

Palavras-chave: Controle biológico, crescimento micelial, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum dematium* var, *truncata*.

ABSTRACT

In the current scenario of agriculture, biological control of diseases is gaining importance. Biological control is not only the interaction between pathogen, host and environment, but the result of this interaction. The mechanisms of antagonistic interactions can be: antibiosis, competition, parasitism, predation and induction of host defense. The objective of this work was to evaluate the effect of antagonistic agents on the growth of phytopathogens *in vitro*. The experiment was carried out in a completely randomized design, with six replications. The tested antagonists were *Trichoderma asperellum* and *Bacillus subtilis* and the phytopathogens: *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, and *Colletotrichum dematium* var. *truncata*. To determine the antagonism, the colony matching method was used and to evaluate the effects of the volatile toxic metabolic products of the antagonists on phytopathogenic fungi, the Gibbs method was used. By testing paired cultures, *T. asperellum* colonized and produced spores on *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* and *C. dematium* var *truncata*. There was formation of the inhibition halo only for *R. solani*. *T. asperellum* showed the potential to antagonize *S. rolfsii*, *R. solani* and *C. dematium* var *truncata* by the method of producing toxic metabolites. There was no sclerotia formation. *B. subtilis* was shown to be efficient in controlling *S. sclerotiorum* and *S. rolfsii*, but did not prevent sclerotia from forming. *T. asperellum* was more efficient than *B. subtilis* in the biological control of phytopathogens *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* and *R. solani*.

Keywords: Biological control, mycelial growth, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum dematium* var, *truncata*.

1 INTRODUÇÃO

Várias culturas são prejudicadas pela ação de patógenos que afetam a sua produtividade, qualidade e muitas vezes causam prejuízos econômicos aos agricultores, além disso o método de controle mais utilizado é o químico, o que eleva o custo de produção da cultura podendo também causar efeitos nocivos ao homem e ao ambiente (Pignoni & Carneiro, 2005; Es-Soufi et al., 2020).

A população mundial atualmente tem exigido produtos livres de agroquímicos, fazendo com que aumentem as pesquisas em programas de controle biológico. O manejo integrado de doenças em plantas contemplam várias medidas para reduzir a intensidade das doenças e manter o potencial produtivo das culturas, e entre essas medidas destaca-se o controle biológico (Das Chagas et al., 2006; Rufino, Araújo & Nogueira, 2018; Gabardo et al., 2020).

No controle biológico, a doença não é só a interação entre patógeno e hospedeiro, mas o resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e uma série de microrganismos não patogênicos que também repousam no sítio de infecção (Solino et al., 2017). O modo de ação dos antagonistas sobre os patógenos pode ser por antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de defesas do hospedeiro (Isaias et al., 2014). Esses microrganismos podem limitar ou aumentar a atividade do patógeno ou o ocasionar a resistência do hospedeiro (Vimala & Suriachandraselvan, 2009; Thakur & Sohal, 2013).

Um microrganismo pode interagir com outros, criando condições desfavoráveis ao desenvolvimento destes, sendo esta forma de interação denominada de antagonismo (Allwood, Ellis & Goodacre, 2008). Dessa forma, os metabólitos voláteis produzidos por micro-organismos benéficos com potencial de controle biológico e seus modos de ação têm sido estudados de forma crescente devido à sua aplicabilidade na agricultura e importância no controle de pragas e doenças em plantas (Morath, Hung & Bennett, 2012; Muhamadali et al., 2015).

É considerado como uma característica adequada do antagonista apresentar mais de um mecanismo, pois serão aumentadas as suas chances de sucesso (Isaias et al., 2014). A maioria dos relatos sobre o uso de antagonistas apresentam *Trichoderma* spp. (Samuels, Lieckf & Niren- Berg) e a bactéria *B. subtilis* (Cohn) como um dos mais promissores entre os agentes de biocontrole (Viterbo et al., 2002; De la Cruz-Queiroz et al., 2018; Dorighello et al., 2020).

O *Trichoderma* spp. é um fungo de solo encontrado especialmente em solos orgânicos, pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (Kubicek et al., 2001; Ethur, Cembranel & Silva, 2001). Espécies de *Trichoderma* são apontados como agentes supressores de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) em experimentos realizados em laboratório (Howell et al., 2000) e também estão sendo estudadas no controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Mag.)), que é uma das doenças de maior importância da cultura do feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.), podendo causar perdas de até 100%, e o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* ((Lib.) de Bary))

causa perdas no rendimento de grãos que atingem em média 50% (Freeman et al., 2004; De la Cruz-Queiroz et al., 2018).

Bactérias do gênero *Bacillus* possuem propriedades antagonistas contra fitopatógenos. Elas possuem três principais mecanismos: competição por substrato, produção de produtos químicos inibitórios e indução de resistência sistêmica (Dorighello et al., 2020). *B. subtilis* produz várias classes de antibióticos lipopeptídicos de largo espectro que são supressores de *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septória* e *Verticillium* (Nagórska, Bikowski & Obuchowski, 2007; Ongena & Jacques 2008).

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos agentes antagonistas *T. asperellum* e *B. subtilis* no crescimento micelial e na produção de metabólitos voláteis sobre os fungos fitopatogênicos: *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum dematium* var *truncata*, *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em 2011. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições para todos os experimentos. Os antagonistas testados foram *T. asperellum* e *B. subtilis* e os fitopatógenos: *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum dematium* var. *truncata*.

As colônias dos fungos utilizados nos experimentos, tanto dos fitopatógenos quanto dos antagonistas foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e da bactéria cultivada em AN (ágar-nutriente).

Para a avaliação da potencialidade antagonística de *T. asperellum* e *B. subtilis*, foi utilizada a técnica do pareamento de colônias dos patógenos e dos agentes biológicos descritos por Johnson & Curl (1972). Transferiu-se assepticamente um disco do fitopatógeno a 1,5 cm da borda da placa de Petri contendo meio de cultura BDA, e do antagonista *T. asperellum* a 1,5 cm na borda oposta da placa.

Para avaliar o efeito antagonista de *B. subtilis* foram feitas 3 estrias com auxílio de alça de platina a 1,5 cm da borda da placa e na borda oposta da placa o disco do fitopatógeno, como descrito acima. As placas foram incubadas em ambiente controlado, $\pm 25^{\circ}\text{C}$, com 12 horas de luz e 12 horas de escuro por 10 dias. Foi avaliada a formação do halo de

inibição ao redor dos patógenos, que é a limitação do crescimento micelial e a formação de escleródios (estruturas de resistência).

Para determinar a produção de metabólitos tóxicos voláteis de *T. asperellum* e *B. subtilis* sobre os fungos fitopatogênicos, *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *C. dematium* var *truncata* utilizou-se o método de Gibbs (1967). O método consistiu em cobrir assepticamente toda a superfície de placas de Petri contendo meio BDA, com discos de papel celofane transparente esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. A seguir, foram colocados discos de colônia do fungo *T. asperellum* ou da bactéria *B. subtilis* no centro da placa sobre a superfície do papel celofane. As placas foram lacradas com fita adesiva e incubadas por 72 horas à temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

Logo após o crescimento das colônias retirou-se o papel celofane juntamente com as estruturas do fungo ou da bactéria antagonista e, sobre o mesmo meio de cultura fez-se a transferência de discos de colônias dos fungos fitopatogênicos. Para o tratamento das testemunhas, transferiu-se para o centro das placas de Petri um disco do fitopatógeno ou do antagonista (BDA) ou estrias da bactéria (AN), para acompanhar o desenvolvimento dos mesmos.

As avaliações das medições de crescimento das colônias começaram a ser realizadas 48 horas após a transferência dos fitopatógenos, e continuaram sendo realizadas no intervalo de 24 horas, até a paralisação do crescimento da colônia. Após o crescimento das colônias, foi determinada a porcentagem de redução do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos, tendo-se por base as médias efetuadas de duas medidas diametralmente opostas.

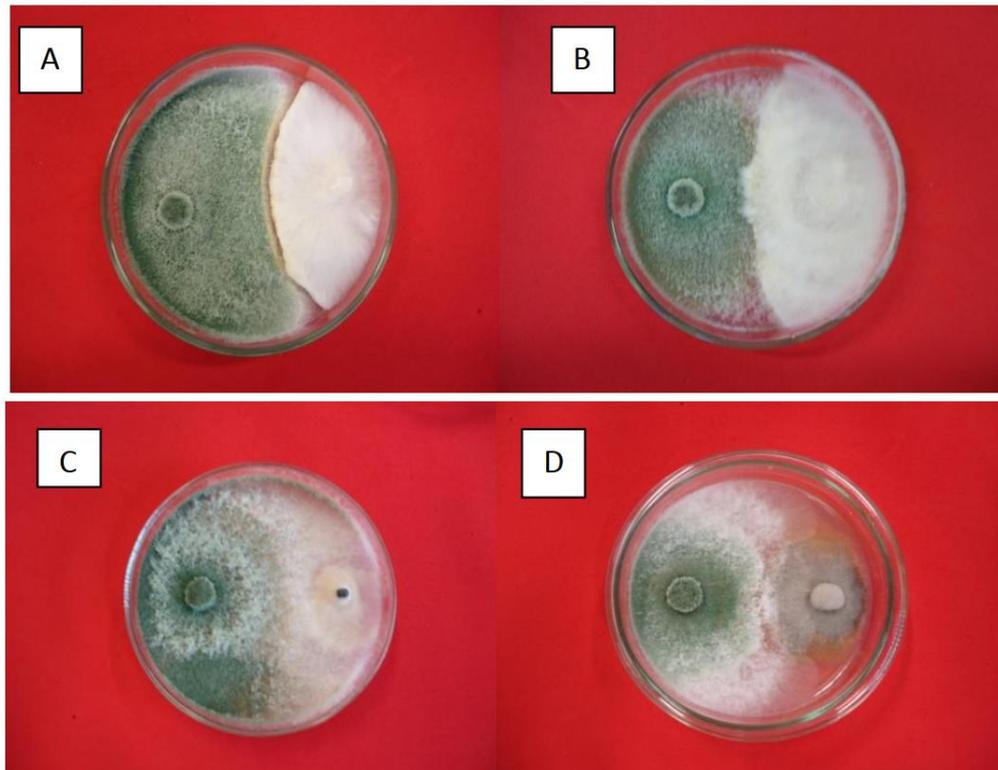
Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando significativas as diferenças entre as médias, esses foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com auxílio do software estatístico SASM-Agri (Sistema para a análise e separação de médias em experimentos agrícolas) (Canteri et al., 2001)

3 RESULTADOS

No método de pareamento de colônias, a inibição dos fitopatógenos pelo antagonista é observada pela formação do halo de inibição, que se manifesta como uma limitação do crescimento micelial. Neste experimento foi observado a formação de halo de inibição de *T. asperellum* para *R. solani* (Figura 1A).

Não houve formação de halo de inibição para os patógenos *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* e *C. dematium* var. *truncata* (Figuras 1B, 1C e 1D). No entanto, o antagonista *T. asperellum* impediu que os fitopatógenos *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* produzissem escleródios.

Figura 1- Formação de halo de inibição de *Trichoderma asperellum* com *Rhizoctonia solani* (A), com *Sclerotium rolfsii* (B), com *Sclerotinia sclerotiorum* (C) e com *Colletotrichum dematium* var. *truncata* (D). Fonte: Gislaine Gabardo.



Em relação à bactéria houve formação de halo de inibição para *S. rolfsii* (Figura 2A), *S. sclerotiorum* (Figura 3A) e *C. dematium* var *truncata* (Figura 4A). Houve formação de escleródios para *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* como pode ser observado nas Figuras 2B e 3B.

Figura 2- Formação de halo de inibição de *Bacillus subtilis* com *Sclerotium rolfsii* (A) e formação de escleródios (B). Fonte: Gislaine Gabardo.

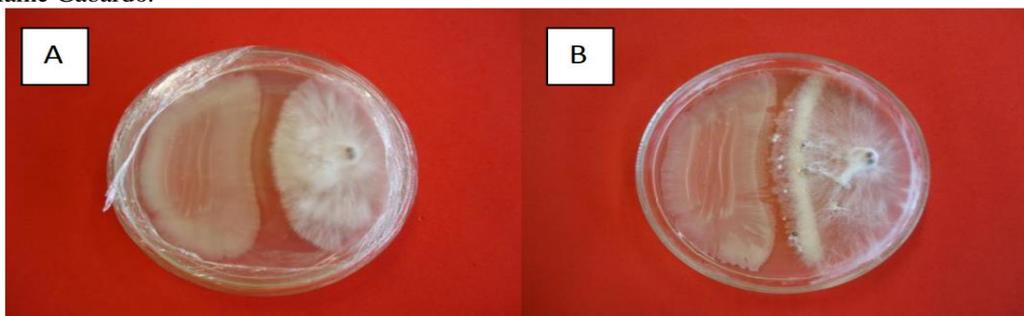
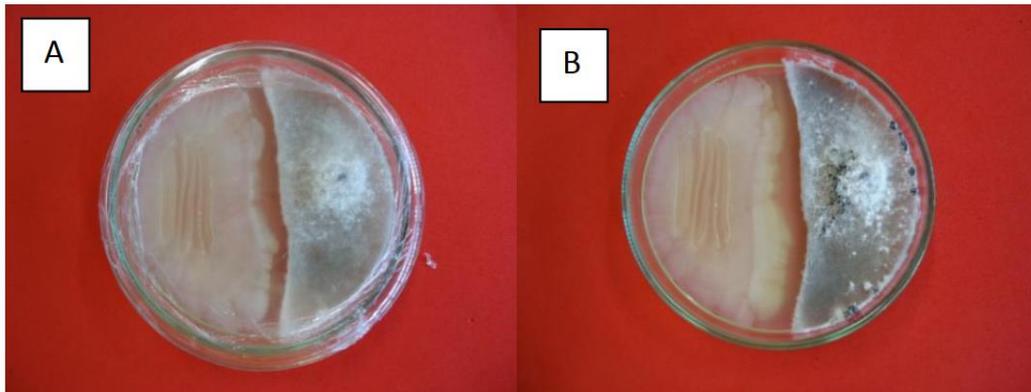
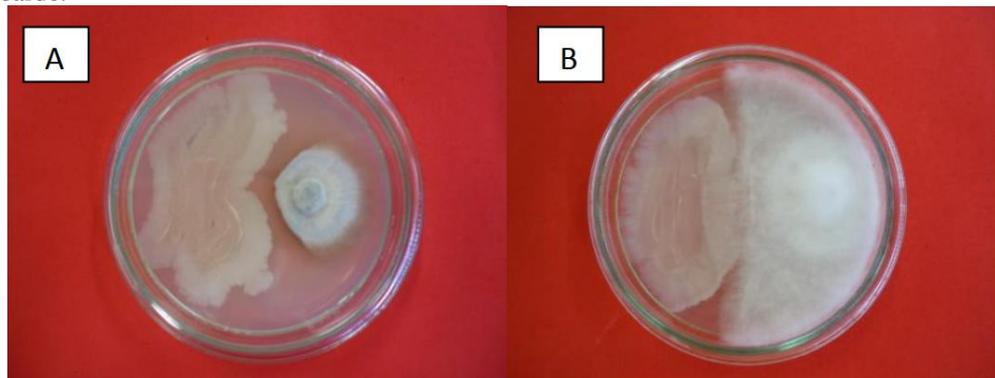


Figura 3- Formação de halo de inibição de *Bacillus subtilis* com *Sclerotinia sclerotiorum* (A) e formação de escleródios (B). Fonte: Gislaïne Gabardo.



Para *R. solani* não houve a formação de halo de inibição, (Figura 4B). Estes resultados indicam que a bactéria tem pouco efeito antagonista para esse fungo, fato confirmado na produção de metabólitos tóxicos (Tabela 1) onde *B. subtilis* apresentou baixa redução de crescimento (4,19%).

Figura 4- Formação de halo de inibição de *Bacillus subtilis* com *Colletotrichum dematium* var. *truncata* (A) e pareamento de colônias de *Bacillus subtilis* com *Rhizoctonia solani* sem formação do halo de inibição (B). Fonte: Gislaïne Gabardo.



Com relação a produção de metabólitos tóxicos voláteis, o fungo *T. asperellum* mostrou-se eficiente como agente antagonista, inibindo o crescimento micelial de todos os fitopatógenos testados. A maior redução do crescimento micelial ocorreu para *S. rolfsii*, seguido de *R. solani* e *C. dematium* var *truncata*. Já *B. subtilis* a maior redução do crescimento inicial foi observada para *S. rolfsii*, seguido de *S. sclerotiorum* e *C. dematium* var *truncata* (Tabela 1).

Tabela 1. Inibição de crescimento micelial (%) dos fungos fitopatogênicos pelo método de produção de metabolitos tóxicos voláteis com *T. asperellum* e *B.subtilis*. Ponta Grossa, PR.

Tratamentos	(%) Inibição do Crescimento	
	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Colletotrichum dematium</i> var <i>truncata</i>	64,21 c*	57,47 b
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	10,49 d	68,22 a
<i>Sclerotium rofsii</i>	84,39 a	72,25a

<i>Rizoctonia solani</i>	78,81 b	4,19 c
Testemunha	0,00 e	0,00 d
C.V. (%)	2,97	8,57

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; C.V.= coeficiente de variação.

De acordo com as Figuras 5 e 6 e Tabela 1, o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos foi menor que o da testemunha, confirmando a produção de metabólitos tóxicos voláteis por *T. asperellum* e *B. subtilis*. O *T. asperellum* e *B. subtilis* controlaram os fitopatógenos, entretanto, o nível de controle variou, dependendo do isolado e de sua adaptação às condições bióticas e abióticas específicas, dentro e entre espécies.

T. asperellum foi mais eficiente na redução do crescimento micelial de *S. rolfsii*, *R. solani*, *C. dematium* var *truncata* (Tabela 1 e Figuras 5 e 6). A bactéria *B. subtilis* também se mostrou eficaz como antagonista para os fitopatógenos testados (Figura 6). A maior redução do crescimento micelial foi verificada para *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

Figura 5 - Crescimento micelial de fitopatógenos na presença e ausência de *Trichoderma asperellum*. *Crescimento micelial de fitopatógenos na presença de *Trichoderma asperellum*.

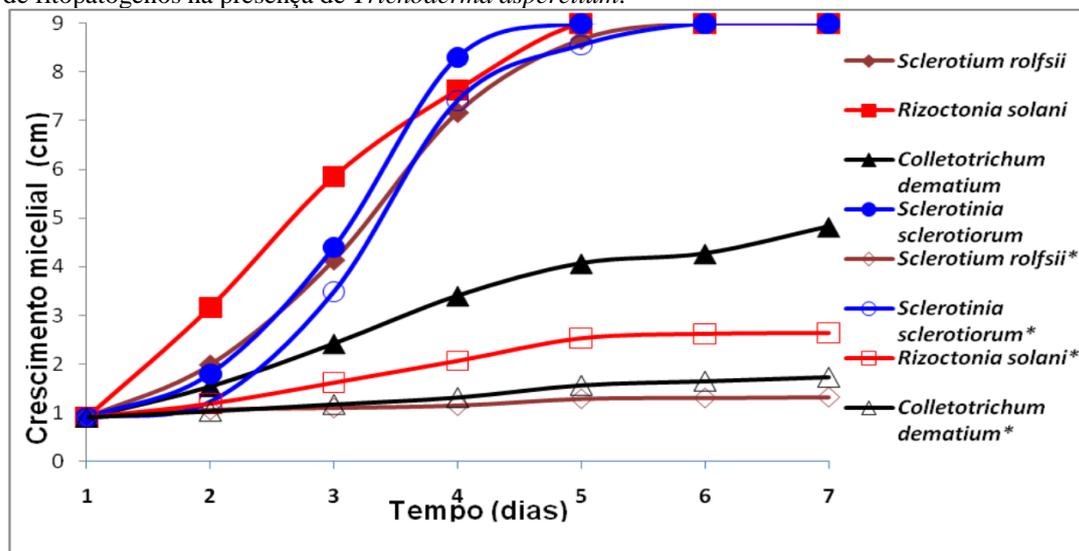
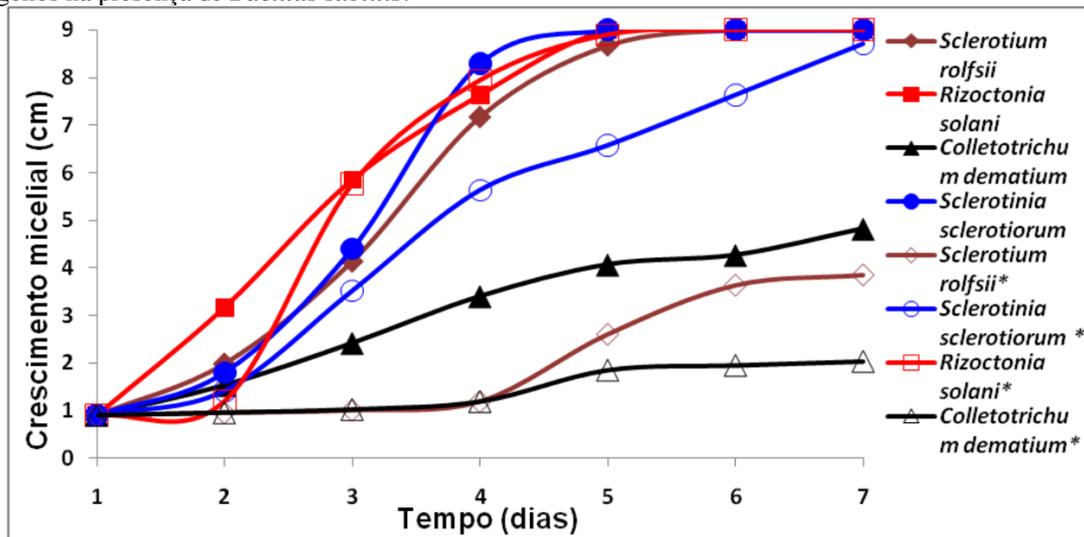


Figura 6 - Crescimento micelial de fitopatógenos na presença e ausência de *Bacillus subtilis*. *Crescimento micelial de fitopatógenos na presença de *Bacillus subtilis*.



4 DISCUSSÃO

Segundo Silva et al. (2017), *Trichoderma* spp. é considerado competidor agressivo, pois crescem rapidamente e colonizam vários substratos além de competir com o patógeno por nutriente, também pode atuar parasitando estruturas de patógenos. O parasitismo é uma relação antagônica onde um organismo (parasita) vive sobre ou dentro de outro organismo vivo (hospedeiro), obtendo seu alimento deste último. Esta é uma relação muito comum entre os fungos (Ribas et al., 2014).

Algumas espécies de *Trichoderma* são micoparasitas eficazes no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos, como é o caso de *Sclerotinia sclerotiorum* e espécies de *Sclerotium*. Podem atuar, via de regra, através de um ou da associação de mecanismos como parasitismo, antibiose e competição (Isaias et al., 2014).

No presente experimento o *T. asperellum* formou halo de inibição apenas para *R. solani* (Figura 1A), indicando haver antagonismo, porém para os fungos *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* e *C. dematium* var. *truncata* o modo de ação provavelmente é por parasitismo e competição, pois o antagonista se desenvolveu sobre os fitopatógenos (Figuras 1B, 1C e 1D). *T. asperellum* impediu que os fitopatógenos *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* produzissem escleródios (Figuras 1B e 1C).

Os escleródios são estruturas de resistência que podem se manter viáveis por até 12 anos no solo (Brustolin, Reis & Pedron, 2016). A redução da população de escleródios é essencial para o controle efetivo do mofo-branco, que além disso também deve bloquear a formação de apotécios e a ejeção de ascósporos e minimizar a produção de novos escleródios pelo controle preventivo da doença na parte aérea das plantas (Görgen et al., 2010).

Entretanto houve a formação de escleródios por *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* no teste de pareamento de colônias com *B. subtilis* (Figuras 2B e 3B), o contrário do observado para o antagonista *T. asperellum*. *B. subtilis* formou halo de inibição para *S. rolfsii* (Figura 2A), *S. sclerotiorum* (Figura 3A) e *C. dematium* var *truncata* (Figura 4A). Para *R. solani* não houve a formação de halo de inibição, (Figura 4B). O halo de inibição é formado por substâncias inibidoras do antagonista, pois *B. subtilis* é uma bactéria produtora de antibióticos, e tem o solo como habitat natural (Hammami et al., 2009).

Um microrganismo pode interagir com outros, criando condições desfavoráveis ao desenvolvimento destes através da produção de metabólitos tóxicos, sendo esta forma de interação denominada de antagonismo (Pereira, Neves & Drozdowicz, 1999). A produção de metabólitos pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independe do contato físico entre os microrganismos. Grande parte dos microrganismos envolvidos em controle biológico atua através de antibiose. Diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de antibióticos podendo secretar metabólitos comercialmente importantes como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (Bettioli & Ghini, 1995).

Segundo Stavely et al. (1981) e Baker et al. (2003), a ação de *B. subtilis* ocorre na germinação dos esporos e no crescimento micelial. Neste experimento observou-se que *B. subtilis* atuou no crescimento micelial de alguns fitopatógenos formando halo de inibição para *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* e *C. dematium* var. *truncata* (Figuras 2A, 3A e 4A). Alguns autores como Wilson e Pusey (1984), constataram que isolados de *Bacillus* são capazes de inibir o crescimento fúngico de *Monilinia fructicola*. Foi observado por Bettioli e Kimati (1990) o potencial inibitório de *B. subtilis* sobre diversos fitopatógenos, entre eles *R. solani*.

Jain et al. (2018), conseguiram inibir o crescimento micelial de *R. solani* in vitro com *B. subtilis*, além de diminuir a incidência do patógeno em 81%, e as observações microscópicas revelaram que *B. subtilis* causou deformidades morfológicas das hifas fungicas, como vacuolação, vazamento do protoplasto e destruição do micélio. Já Ma et al. (2015), alcançaram eficácia no controle de *R. solani* de 79,9% em plantas de tomate (nome científico), utilizando microcápsulas a base de *B. subtilis*.

Ashwini & Srividya (2014) concluíram que *B. subtilis* produz enzimas micolíticas, glucanase e quitinase, que apresentam amplo antagonismo contra fungos e bactérias fitopatogênicas. Narasimhan & Shivakumar (2015) obtiveram inibição de crescimento micelial de 42% de *R. solani* e 57% de *Colletotrichum gloeosporioides* utilizando a bactéria.

Neste experimento, observou-se a eficiência no controle micelial por *B. subtilis* nos patógenos *S. rolfisii* (72,25%), *S. sclerotiorum* (68,22%) e *C. dematium* var. *truncata* (57,47%), sendo baixa a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *R. solani* (4,19%) (Tabela 1).

Trichoderma spp. também pode atuar na produção de metabólitos tóxicos voláteis. Segundo Lewis & Lumsden (2001), *Trichoderma* spp. apresentou antagonismo contra *S. rolfisii*, *Rhizoctonia tuliparum* e *S. sclerotiorum*, confirmando os resultados encontrados nestes experimentos. Lewis & Lumsden (2001), também relatam a eficiência de algumas espécies de *Trichoderma* no controle de *R. solani*, principalmente aliado à solarização. Concordando com o verificado neste experimento, onde o controle sobre *R. solani* por *T. asperellum* foi de 78,8%. Já a bactéria *B. subtilis* reduziu o seu crescimento em 4,19%, indicando uma melhor eficiência de *T. asperellum* (Tabela 1).

De acordo com Dennis e Webster (1971), *T. viride* e *T. koningii* são eficientes produtores de metabólitos voláteis em meio de cultura. Esses autores explicam que os antibióticos voláteis atuam sobre os fungos suscetíveis através da inibição do crescimento micelial.

Yang et al. (2012) sugerem que *Trichoderma* possui a enzima L-amino-oxidase presente, que quando em contato com *R. solani* apresentam a lise (quebra) das hifas e a fragmentação do DNA e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e potencial de despolarização da membrana mitocondrial. Os autores também comentam que a aplicação de *T. harzianum* em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) e no solo aumentou a proteção contra o patógeno *R. solani* através do aumento das respostas de defesa do hospedeiro, devido ao aumento da atividade de fenilalanina amônia liase e a polifenol oxidase.

Azevedo et al. (2020) testaram diferentes isolados de *Trichoderma* sp. como antagonista para *Fusarium 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 dos mecanismos de ação dos isolados, principalmente relacionados à produção de compostos orgânicos voláteis.

O *T. asperellum* mostrou-se mais eficiente no controle do que *B. subtilis*, controlando com maior intensidade os fitopatógenos (Tabela 1 e Figuras 5 e 6). Os dois antagonistas testados reduziram o crescimento de *S. rolfisii* em mais de 72%. *B. subtilis* controlou o crescimento micelial de *S. rolfisii* e *S. sclerotiorum* (Tabela 1), no entanto, não impediu a formação de escleródios (Figuras

2B e 3B). O presente trabalho aponta *T. asperellum* como um dos mais promissores agentes no controle biológico.

Trichoderma apresenta algumas características que são essenciais para um agente de biocontrole, tais como: ser inócuo ao ser humano e não apresentar impacto negativo no meio ambiente, apresentar estruturas de reprodução de fácil propagação (Spiegel & Chet, 1998), principalmente em substratos naturais e apresentar meia vida de prateleira, quando formulado, razoavelmente longa e com boa viabilidade (Harman, 2000).

5 CONCLUSÃO

Pelo testes de culturas pareadas, o *Trichoderma asperellum* colonizou e produziu esporos sobre *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum dematium* var *truncata*. Houve formação do halo de inibição apenas para *Rhizoctonia solani*.

O *Trichoderma asperellum* mostrou potencial para antagonizar *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum dematium* var *truncata* pelo método de produção de metabólitos tóxicos. Não houve formação de escleródios.

A bactéria *Bacillus subtilis* mostrou-se eficiente no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, mas não impediu que formassem escleródios. *Trichoderma asperellum* mostrou-se mais eficiente que *Bacillus subtilis* no controle biológico dos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*.

REFERENCIAS

- Allwood, J. W., Ellis, D. I. & Goodacre, R. (2008). Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia plantarum*, 132(2), 117-135. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01001.x>
- Ashwini, N. & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4(2), 127-136. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0134-4>
- Azevedo, D. M. Q., da Silva Rocha, F., Fernandes, M. D. F. G., da Costa, C. A., Muniz, M. D. F. S., Barroso, P. D. & do Rosário Barbosa, D. M. C. (2020). 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*, 6(6), 36344-36361. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-251>

Baker, B. J., Moser, D. P., MacGregor, B. J., Fishbain, S., Wagner, M., Fry, N. K. & Lollar, B. S. (2003). Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of South Africa and deep basalt aquifers of Washington State. *Environmental Microbiology*, 5(4), 267-277. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00408.x>

Bettiol, W. & Ghini, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. *Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos*. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.717-728, 1995.

Bettiol, W. & Kimati, H. (1990). Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. *Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/10753>

Brustolin, R., Reis, E. M. & Pedron, L. (2016). Longevity of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia on the soil surface under field conditions. *Summa Phytopathologica*, 42(2), 172-174. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2131>

Canteri, M. G., Althaus, R., Virgens Filho, J., Giglioti, E. A. & Godoy, C. V. (2001). SASM Agri: Sistema para Análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scot – Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, 1(2), 18-24. 2001. http://www.agrocomputacao.deinfo.uepg.br/dezembro_2001/Arquivos/RBAC_Artigo_03.pdf.

das Chagas, F., Polonio, J. C., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Pamphile, J. A., & Conte, H. (2016). Controle biológico em sistema orgânico de produção por agricultores da cidade de Maringá (Paraná, Brasil). *Ciência e Natura*, 38(2), 637-647. www.redalyc.org/pdf/4675/467546204008.pdf

Dennis, C. & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25-33. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3)

De la Cruz-Quiroz, R., Roussos, S., Rodríguez-Herrera, R., Hernandez-Castillo, D. & Aguilar, C. N. (2018). Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican Trichoderma strains. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4(2), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.03.002>

Dorighello, D. V., Forner, C., de Campos, R. M. V. B. & Bettiol, W. (2020). Management of Asian soybean rust with *Bacillus subtilis* in sequential and alternating fungicide applications. *Australasian Plant Pathology*, 49(1), 79-86. <https://doi.org/10.1007/s13313-019-00677-5>

Ethur, L. Z., Cembranel, C. Z. & Silva, A. C. F. D. (2001). Seleção de *Trichoderma* spp. Visando ao Controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. *Ciência Rural*, 31(5), 885-887. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000500025>

Es-Soufi, R., Tahiri, H., Azaroual, L., El Oualkadi, A., Martin, P., Badoc, A. & Lamarti, A. (2020). In Vitro Antagonistic Activity of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens* against *Colletotrichum acutatum*. *Advances in Microbiology*, 10(03), 82. DOI 10.4236/aim.2020.103008

Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M. & Dag, A. (2004). Trichoderma biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 110(4), 361-370. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000021057.93305.d9>

Gabardo, G., Dalla Pria, M., Carneiro, D. E., & Barbosa, E. A. A. (2020). Respostas fisiológicas das cultivares de soja NA5909 e TMG7062 submetidas a diferentes produtos para controle de doenças fúngicas em campo/Physiological responses of soybean cultivars NA5909 and TMG7062

subjected to different products for fungal disease control in the field. *Brazilian Journal of Development*, 6(3), 15673-15689. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-444>

Gibbs, J.N. A study of the epiphytic grow habit of *Fomes annosus*. *Annals of Botany*, v.32, 1967.

Görge, C. A., Civardi, E. A., Ragagnin, V. A., Silveira Neto, A. N. D., Carneiro, L. C. & Lobo Junior, M. (2010). Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(10), 1102-1108. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010001000008>

Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A. & Nesme, X. (2009). Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Letters in applied microbiology*, 48(2), 253-260. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02524.x>

Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84(4), 377-393. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>

Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D., & Puckhaber, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90(3), 248-252. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.3.248>

Isaias, C. O., Martins, I., Silva, J. B. T. D., Silva, J. P. D. & Mello, S. C. M. D. (2014). Ação antagonista e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, 40(1), 34-41. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052014000100005>

Jain, S., Vaishnav, A., Varma, A. & Choudhary, D. K. (2018). Comparative expression analysis of defence-related genes in *Bacillus*-treated *Glycine max* upon challenge inoculation with selective fungal phytopathogens. *Current science*, 115(10), 1950. <https://Comparative-expression-analysis-of-defence-related-genes-in-Bacillus-treated-Glycine-max-upon-challenge-inoculation-with-selective-fungal-phytopathogens.pdf>

Johnson, L.F. & CurL, A. Methods for research on the ecology of soil born plant and pathogens. Alabama, BurgessPublisching. p.274 ,1972.

Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K. & Lorito, M. (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 11-23. <https://www.jstor.org/stable/41998018>

Lewis, J. A. & Lumsden, R. D. (2001). Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop protection*, 20(1), 49-56. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00052-1)

Ma, X., Wang, X., Cheng, J., Nie, X., Yu, X., Zhao, Y., & Wang, W. (2015). Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biological control*, 90, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.013>

Morath, S. U., Hung, R. & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol Rev* 26: 73–83. <https://doi.org/10.2174/2211550105666160530104622>

- Muhamadali, H., Xu, Y., Ellis, D. I., Trivedi, D. K., Rattray, N. J., Bernaerts, K. & Goodacre, R. (2015). Metabolomics investigation of recombinant mTNF α production in *Streptomyces lividans*. *Microbial cell factories*, 14(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0350-1>
- Nagórska, K., Bikowski, M. & Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 495-508. https://doi.org/10.18388/abp.2007_3224
- Narasimhan, A. & Shivakumar, S. (2015). Evaluation of *Bacillus subtilis* (JN032305) biofungicide to control chilli anthracnose in pot controlled conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 25(5), 543-559. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.996737>
- Ongena, M. & Jacques, P. (2008). *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Pereira, J. C., Neves, M. C. P., & Drozdowicz, A. (1999). Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(1), 99-108. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X1999000100014>
- Pignoni, E. & Carneiro, S. (2005). Severidade da antracnose em feijoeiro e pinta preta em tomateiro sob diferentes concentrações de óleo de nim em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8(1).
- Pusey, P. L., & Wilson, C. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant disease*, 68(9), 753-756. DOI : 10.1094/PD-69-753
- Ribas, P. P. R., dos Santos Matsumura, A. T. & Van Der Sand, S. T. (2014). Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro in vitro. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 20(1/2), 94-103. <http://revistapag.agricultura.rs.gov.br/ojs/index.php/revistapag/article/view/84>
- Rufino, C. P. B., de Araújo, C. S., & Nogueira, S. R. (2018). Desafios na utilização do controle biológico de doenças de plantas na amazônia. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, 5(1). <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/1474>
- Silva, F. F. D., Castro, E. D. M., Moreira, S. I., Ferreira, T. C., Lima, A. E. D. & Alves, E. (2017). Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. *Summa Phytopathologica*, 43(1), 41-45. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2212>
- Solino, A. J. D. S., Oliveira, J. B. S., Schwan-Estrada, K. R. F., Alencar, M. S. R. & Ribeiro, L. M. (2017). Potencial antagonista e controle in vitro de *Alternaria solani* por fungos sapróbios. *Summa Phytopathologica*, 43(3), 199-204. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2202>
- Spiegel, Y., & Chet, I. (1998). Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews*, 3(3), 169-175. <https://doi.org/10.1023/A:1009625831128>
- Stavelly, J. R., Thomas, C. A., Baker, C. J. & MacFall, J. S. (1981). Greenhouse control of bean rust with *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301329512>

Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>

Vimala, R. & Suriachandraselvan, M. (2009). Induced resistance in bhendi against powdery mildew by foliar application of salicylic acid. *Journal of Biopesticides*, 2(1), 111-114. <http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/111-114.pdf>

Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. & Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 549-556. <https://doi.org/10.1023/A:1020553421740>

Yang, Z., Yu, Z., Lei, L., Xia, Z., Shao, L., Zhang, K. & Li, G. (2012). Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15(4), 647-650. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2012.08.002>