

Avaliação do potencial de isolados de *Trichoderma* spp. nativos do estado de Mato Grosso do Sul contra o fungo *Colletotrichum musae*

Evaluation of the potential of *Trichoderma* spp. native to the state of Mato Grosso do Sul against the fungus *Colletotrichum musae*

DOI:10.34117/bjdv7n3-592

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 23/03/2021

Gabriel Garcia Barbosa

Bacharel em Agronomia pela Universidade Católica Dom Bosco

Instituição: Universidade Católica Dom Bosco

Endereço: Laboratório de Microbiologia, Biossaúde, Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário, Campo Grande - MS, 79117-900

E-mail: gabrielgbarbosa@yahoo.com

Francilina Araújo Costa

Doutora em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa

Instituição: Universidade Católica Dom Bosco

Endereço: Laboratório de Microbiologia, Biossaúde, Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário, Campo Grande - MS, 79117-900

E-mail: fcosta@ucdb.br

Ana Carolina da Costa

Mestre em Biologia Geral pela Universidade Federal da Grande Dourados

Instituição: Universidade Católica Dom Bosco

Endereço: Laboratório de Microbiologia, Biossaúde, Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário, Campo Grande - MS, 79117-900

E-mail: ana.biotec.ufgd@gmail.com

Cirano José Ulhoa

Ph.D em Genética e Bioquímica de Microorganismos pela Nottingham University

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Endereço: Laboratório de Enzimologia, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Esperança, s/n - Chácaras de Recreio Samambaia, Goiânia - Goiás, 74090-900

E-mail: ana.biotec.ufgd@gmail.com

RESUMO

A banana (*Musa* spp.) está entre as frutas mais consumidas mundialmente. Uma de suas principais doenças de pós-colheita é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum musae*, podendo causar perdas de até 40% da produção. O fungo *Trichoderma* apresenta grande potencial para utilização como agente de controle biológico de doenças de plantas. O objetivo deste trabalho foi o isolamento de espécies nativas de *Trichoderma* do estado de Mato Grosso do Sul e a avaliação do potencial antagonista de alguns isolados contra o *Colletotrichum musae*. O isolado de *C. musae* foi obtido a partir de bananas as quais exibiam sintomas característicos da doença. Foram obtidos a partir de amostras de solo de

5 regiões do estado, 60 isolados de *Trichoderma* com grande diversidade morfológica, e após o isolamento foram selecionados 13 para as avaliações. Para a avaliação da inibição do crescimento micelial do *C. musae* foi realizado o teste de pareamento de colônias do patógeno com os isolados de *Trichoderma* e a produção de metabólitos voláteis, com cinco repetições por tratamento. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Todos os isolados avaliados apresentaram potencial antagonístico sobre o patógeno *C. musae*. Entretanto, o isolado Amambai AB 101 apresentou maior ocupação da placa de Petri, com 95,6% da área total no teste de pareamento. No teste de metabólitos voláteis, todos os isolados de *Trichoderma* inibiram o crescimento do *C. musae* sendo que os isolados de *Trichoderma* B 201 e PP203 foram os que exibiram maior ação antifúngica contra o patógeno.

Palavra-chave: *Musa* spp., Antracnose, Isolamento

ABSTRACT

The banana (*Musa* spp.) is among the most consumed fruits worldwide. One of its main post-harvest diseases is anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum musae*, which can cause losses of up to 40% of production. The fungus *Trichoderma* has great potential for use as a biological control agent for plant diseases. The aim of this work was the isolation of native species of *Trichoderma* from the state of Mato Grosso do Sul and the evaluation of the antagonistic potential of some isolates against *Colletotrichum musae*. *C. musae* was obtained from bananas which exhibited symptoms characteristic of the disease. 60 samples of soil from 5 regions of the state were obtained, 60 isolates of *Trichoderma* with great morphological diversity, and after isolation 13 were selected for the evaluations. For the evaluation of the inhibition of the mycelial growth of *C. musae*, the pairing test was carried out of colonies of the pathogen with *Trichoderma* isolates and the production of volatile metabolites, with five replicates per treatment. The means were compared by the Scott-Knott test, at 5% probability. All the isolates evaluated showed antagonistic potential over the pathogen *C. musae*. However, the isolate Amambai AB 101 showed greater occupation of the Petri dish, with 95.6% of the total area in the pairing test. In the test of volatile metabolites, all isolates of *Trichoderma* inhibited the growth of *C. musae* whereas the isolates of *Trichoderma* B 201 and PP203 were those that exhibited the greatest antifungal action against the pathogen.

Keyword: *Musa* spp., Anthracnose, Isolation

1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) está entre as frutas mais consumidas, ocupando mundialmente a segunda posição, com consumo girando em torno de 10 kg/hab./ano, sendo superada apenas pela laranja. Atualmente, o Brasil se destaca como quarto produtor mundial da fruta, com a produção de 6.989.671t/ano (IBGE, 2018).

Uma das principais doenças de pós-colheita da banana é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum musae*, podendo levar a perdas significativas de até 40% da produção. A infecção causada pelo *C. musae* inicia-se, no campo, em frutos verdes, e o desenvolvimento da doença ocorre durante o amadurecimento, na forma de pequenas

lesões, podendo coalescer, formando grandes áreas necróticas e deprimidas (Negreiros et al., 2013; Cordeiro et al., 2016). Em condições favoráveis, sob alta umidade, os frutos cobrem-se de frutificações de coloração rosa a salmão, onde os acérvulos adquirem uma coloração acinzentada (Cordeiro et al., 2016).

Economicamente, o patógeno é de grande relevância, pois além de causar grandes prejuízos em pós-colheita, também causa perdas no campo e é fator limitante da qualidade prejudicando a comercialização dos frutos (Couto & Menezes, 2004).

Na pós-colheita, as medidas de controle são constituídas principalmente de fungicidas, o que tem sido um grande problema para produtores e consumidores, devido ao resíduo deixado pelos agrotóxicos (Heling, 2016). Os dois fungicidas registrados para a cultura no controle da antracnose atualmente são Imazalil e Tiabendazol.

Em 2016 a agricultura brasileira gastou o equivalente a 9,56 bilhões de dólares com defensivos agrícolas, como herbicidas, fungicidas e inseticidas, totalizando 887,9 mil toneladas de produto comercial, onde os estados do Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Goiás e Rio Grande do Sul compreendem 71% do montante de vendas no território nacional (SINDIVEG, 2017). Esse uso intensivo de agrotóxicos na agricultura para o controle de doenças, pragas e plantas invasoras, tem promovido diversos problemas ambientais, tais como: contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais, intoxicações de agricultores, a resistência de patógenos a certos princípios ativos dos agrotóxicos, desequilíbrio biológico, a eliminação de organismos benéficos entre outros (Bettiol & Ghini, 2003).

Entre as alternativas para redução do uso de agrotóxicos o controle biológico é um dos mais discutidos. O controle biológico apresenta diversas vantagens como custo reduzido, menores riscos ao ambiente e à saúde humana, os micro-organismos são fáceis tanto de ser 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).

A utilização de agentes de controle biológico para a proteção de plantas tem se mostrado bem relevante no Brasil nos últimos anos, principalmente pelo fato da pressão da sociedade em busca de alimentos mais saudáveis e com menor volume de resíduos nocivos ao ser humano, e também pela crescente preocupação com a preservação ambiental e a

consequente necessidade de diminuição do uso de agroquímicos convencionais (Pedrazzoli & Herrmann, 2016).

O controle biológico tem mostrado bons resultados nas doenças de pós-colheita. Neste contexto o fungo *Trichoderma* apresenta grande potencial para utilização como agentes de controle biológico de doenças de plantas, especialmente se for considerado a crescente demanda por produtos orgânicos e a contínua elevação dos custos e restrições à utilização de produtos químicos (Oliveira et. al., 2015).

O potencial de *Trichoderma* spp., como agentes de controle biológico, é conhecido há mais de seis décadas, e muitos isolados são simbioses de plantas e podem atuar no controle de fitopatógenos (Brotman et al., 2010). O gênero *Trichoderma*, está entre os fungos mais utilizado como agentes de biocontrole de doenças vegetais em todo o mundo, sendo amplamente estudado e utilizado por apresentar intensa atividade antagônica perante diferentes fungos fitopatogênicos (Isaias et al., 2014).

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 (Harman et al., 2004; Shores et al., 2005; Viterbo et al., 2005; Perazzoli et al., 2008; Vinale et al., 2008; Azevedo et al., 2020).

A ação de *Trichoderma* spp. no solo é sensível a pequenas modificações na temperatura, taxa de CO₂, O₂ e disponibilidade de nutrientes interferindo no seu potencial supressor (Danielson & Davey, 1973). A concentração e disponibilidade de nutrientes na matéria orgânica do solo (carboidratos, substâncias lignocelulósicas, quitina e lipídios) podem também influenciar nos mecanismos de ação de *Trichoderma* (hiperparasitismo, competição, antibiose e indução de resistência) (Hoitink et al., 2006). Desta forma é fundamental pesquisas envolvendo *Trichoderma* nativos do estado do Mato Grosso do Sul, pois os produtos comerciais existentes no mercado são *Trichoderma* isolados de outros estados e quando utilizados podem não apresentar a eficiência esperada em função das condições climáticas diferentes.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo o isolamento de espécies nativas de *Trichoderma* do estado de Mato Grosso do Sul e a avaliação do potencial antagonista de alguns isolados contra o *Colletotrichum musae*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO DE ESPÉCIES NATIVAS DE *TRICHODERMA*

Foram realizadas treze coletas de solo em áreas comerciais de plantio de soja no estado do Mato Grosso do Sul (MS) nos meses de janeiro e fevereiro em cinco municípios diferentes, sendo que em Amambai realizou-se três amostragens em propriedades distintas, Ponta Porã, Aral Moreira e Bandeirantes duas amostragens e Sidrolândia coletou-se quatro amostras de solo em diferentes propriedades (Tabela 1). O solo foi acondicionado em sacos plásticos e levado ao laboratório, permanecendo sob refrigeração a 4 °C até ser usado nos ensaios de isolamento de *Trichoderma* spp.

As amostras foram retiradas dos primeiros 3-10 cm do solo, com auxílio de um trado de 5 cm de diâmetro. Todas as amostras foram constituídas de 10 sub-amostras, as quais foram misturadas e passadas através de uma peneira de 2 mm de malha. Em virtude da formação de clamidósporos, colonização da matéria orgânica, rápido crescimento e abundante esporulação por parte de isolados de *Trichoderma*. Foi utilizada a técnica de lavagem de solo, onde 10g de solo foram serialmente diluídas em água estéril e, uma alíquota de 0,1 mL das suspensões foram distribuídas em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) suplementados com 200mg.L⁻¹ de cloranfenicol e 1 ml.L⁻¹ de triton X-100. Após 3-8 dias de incubação a temperatura de 25°C e foto período de 12 horas, as colônias características do gênero foram transferidas para meio de cultura BDA. Para a confirmação do gênero foi realizada a técnica de microcultura conforme Martins et al. (2008), afim de observar estruturas características como conídios, fiáldes e clamidósporos. Dos isolados obtidos foram selecionados treze para a realização dos testes devido sua diversidade morfológica.

Tabela 1. Origem dos isolados de *Trichoderma* obtidos a partir de amostras de solo de municípios do estado de Mato Grosso do Sul.

CIDADE	SIGLA	COORDENADAS	
		S	W
Amambai	AB 1	23°1.197'	55°6.470'
	AB 2	22°59.291'	55°5.367'
	AB 3	23°5.972'	55°11.223'
Aral Moreira	AM 1	22°55.371'	55°14.841'
	AM 2	22°45.463'	55°26.320'
Ponta Porã	PP 1	22°42.690'	55°32.765'
	PP 2	22°41.672'	55°35.322'
Sidrolândia	S 1	21°0.214'	54°57.622'
	S 2	21°2.933'	54°59.410'

	S 3	21°10.169'	54°54.312'
	S 4	21°0.727'	54°57.182'
Bandeirantes	B 1	19°59.180'	54°17.121'
	B 2	19°59.836'	54°18.391'

2.2 OBTENÇÃO DO ISOLADO DE *C. MUSAE*

O isolado de *C. musae* foi obtido a partir de bananas as quais exibiam manchas escuras e massa de conídios alaranjadas, sintomas típicos da antracnose. O método consistiu na transferência da mucilagem e esporos do fungo para placas contendo meio BDA e incubadas a 25°C com foto período de 12 horas, conforme metodologia de isolamento direto segundo Alfenas (2016). O patógeno obtido foi mantido em armazenamento, nas condições citadas, até a realização dos testes.

2.3 TESTE DE PAREAMENTO

Dentre os isolados de *Trichoderma* obtidos, foram selecionados treze para os testes de pareamento e metabolitos voláteis, esses isolados foram escolhidos conforme diferenças morfológicas apresentadas entre os isolados obtidos.

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* nativos de regiões do estado de Mato Grosso do Sul contra *C. musae* foi avaliado pelo método de culturas pareadas, conforme descrito por Mello *et al.* (2007). Discos de ágar (10 mm de diâmetro) contendo micélio do *C. musae* e dos treze isolados de *Trichoderma* foram retirados de colônias com três dias de cultivo e depositados, em extremidades opostas a 1 cm da borda das placas de Petri contendo meio BDA solidificado. A inoculação foi realizada em intervalos de tempo diferentes, baseando na velocidade de crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* quanto do *C. musae*, sendo este último colocado dois dias antes. As placas foram armazenadas a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias de cultivo, foi avaliado o crescimento micelial dos fungos, conforme escala proposta por BELL *et al.* (1982), modificada (Tabela 2)

Tabela 2. Escala de notas para o Teste de pareamento.

Nota	Característica
1	<i>Trichoderma</i> ocupando 100% de toda superfície do meio.
2	<i>Trichoderma</i> ocupando 75% da superfície do meio.
3	<i>Trichoderma</i> ocupando 50% da superfície do meio.
4	<i>Trichoderma</i> ocupando 25% da superfície do meio.
5	Ausência de crescimento de <i>Trichoderma</i> , patógeno ocupando toda a superfície do meio.

Os experimentos foram realizados com cinco repetições. Considerou-se o isolado de *Trichoderma* como antagônico ou eficiente quando sua nota era menor ou igual a 3, conforme Louzada et al. (2009). Para este teste foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento.

2.4 TESTE DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

O método baseado em Bharat et al. (1980), consistiu em posicionar fundos de placas de Petri umas sobre as outras, após ter vertido meio BDA solidificado em cada uma delas. Na extremidade inferior da placa, colocou-se os 13 isolados de *Trichoderma*, individualmente, e na superior, *C. musae*, ambos na forma de disco de ágar (10mm de diâmetro) contendo micélio. Lateralmente, os fundos foram vedados com filme PVC em seguida, as placas foram incubadas em temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas, utilizando o crescimento do controle como referência.

Placas com crescimento apenas de *C. musae* foram utilizadas como controle e após o preenchimento total da placa de Petri pelo micélio do *C. musae*, o que aconteceu em aproximadamente 7 a 8 dias, foi realizada a avaliação do efeito de metabólitos voláteis inibindo o crescimento do patógeno nas placas contendo o patógeno e *Trichoderma*. Para isso, foi realizada a medição da colônia do patógeno utilizando um paquímetro. O diâmetro total da placa onde os testes foram realizados foi de 8,5 cm. Quanto menor o diâmetro da colônia do patógeno maior a inibição realizada pelo *Trichoderma*. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento mais um controle.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade, empregando-se o programa estatístico Sisvar®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO DE ESPÉCIES NATIVAS DE *TRICHODERMA*

No isolamento de espécies nativas de *Trichoderma* em 5 regiões do estado de Mato Grosso do Sul foram obtidos 60 isolados nas 13 amostras de solos coletadas em diferentes propriedades, sendo que em Amambai obteve-se 13 isolados na primeira amostra, 12 isolados na segunda e quatro na terceira amostra. No município de Aral Moreira foram obtidos 5 isolados em cada uma das duas amostras. Em Ponta Porã obteve-se 2 isolados

em cada uma das amostras. Já no município de Sidrolândia foram obtidos 3 isolados na primeira amostra, 2 isolados na segunda amostra e 6 isolados na quarta amostra. Na terceira amostra de Sidrolândia não apresentou nenhum fungo característico do gênero *Trichoderma*. Nas amostras do município de Bandeirantes foram obtidos 2 isolados na primeira amostra e 1 isolado na segunda amostra (Tabela 3).

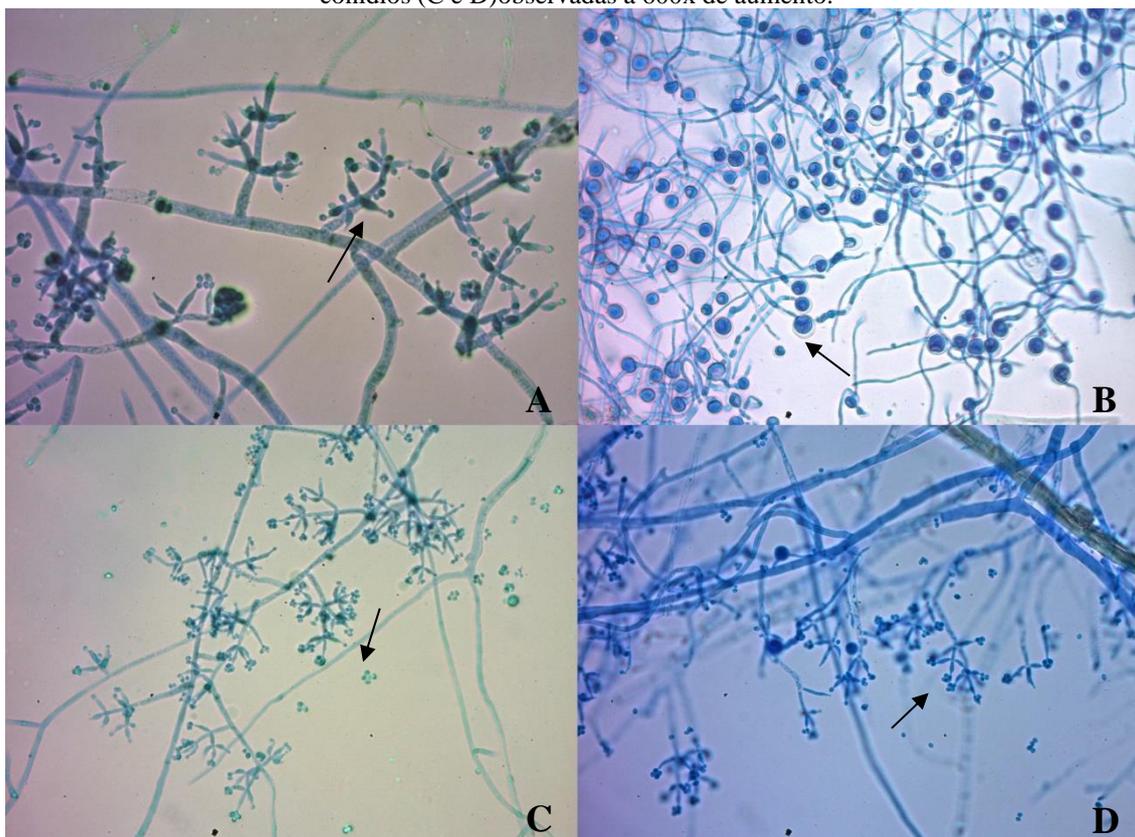
Tabela 3. Quantidade de isolados de *Trichoderma* nativos, obtidos a partir do isolamento de amostras de solos de diferentes regiões do estado de Mato Grosso do Sul.

Cidade	Sigla	Quantidade de isolados
Amambai	AB 1	13
	AB 2	12
	AB 3	4
Aral Moreira	AM 1	5
	AM 2	5
Ponta Porã	PP 1	2
	PP 2	2
Sidrolândia	S 1	3
	S 2	5
	S 3	0
	S 4	6
Bandeirantes	B 1	2
	B 2	1

Todas as amostras de solo foram coletadas em áreas de agricultura e com um bom teor de matéria orgânica, exceto a amostra 3, do município de Sidrolândia, que possuía um solo de textura arenosa e com pouca matéria orgânica, portanto, a ausência de isolados de *Trichoderma* nesta amostra pode ser devido as espécies de *Trichoderma* serem mais facilmente isoladas de solos com restos vegetais e ricos em matéria orgânica (Howell, 2003).

Para alguns isolados obtidos, a confirmação do gênero *Trichoderma*, foi realizada através da técnica de microcultura, sendo possível visualizar estruturas fúngicas características do gênero *Trichoderma*, como conídios, fiálides e clamidósporos (Figura 1). Nas lâminas observou-se os conidióforos eram ramificados, irregularmente verticilados, muitas vezes irregularmente dobrados, as fiálides apresentavam-se em formato de balão e de garrafa, que eram dispostos em cachos divergentes, já os conídios eram na sua maioria verdes e estavam agrupados nas pontas dos fiálides.

Figura 1. Estruturas fúngicas características do gênero *Trichoderma*, fiálides (A), clamidósporos (B) e conídios (C e D) observadas a 600x de aumento.



Foi possível observar uma grande diversidade morfológica entre os 60 isolados de *Trichoderma* (Figura 2). As colônias são formadas por massa de micélio de aparência flocosa e crescimento rápido, cerca de 3 centímetros por dia em meio BDA, ocupando a placa de Petri em aproximadamente 3 a 4 dias. Nos primeiros dias de cultivo, as colônias apresentavam cor branca, sendo posteriormente substituída por diversos tons de verde e alguns entretons de amarelo. Na maioria das placas o micélio se desenvolve apresentando anéis formados por zonas concêntricas. Além destas características determinantes, alguns isolados exibiram a capacidade de difusão de pigmentos no meio de cultura, foi observado ainda alta taxa de esporulação quando estes fungos eram expostos a luminosidade.

Figura 2. Diversidade morfológica dos isolados de *Trichoderma* oriundos de amostras de solo coletada em propriedades do estado de Mato Grosso do Sul.



3.2 TESTE DE PAREAMENTO

De acordo com os resultados obtidos dos testes de pareamento apresentados na Tabela 1, todos os isolados avaliados tiveram potencial antagonístico sobre o fungo *C. musae*, inibindo o seu crescimento, tendo uma nota inferior a 3 segundo escala de Bell et al. (1982).

No entanto, houve diferença de resposta entre os isolados de *Trichoderma* no antagonismo com o *C. musae* (Tabela 4). Os isolados B 102, AB 303 e S404 apresentaram menor capacidade de antagonismo em comparação aos demais isolados testados com notas entre 2,01 a 2,64 (Tabela 4). Os demais isolados ocuparam mais que 75% do total da placa de Petri. O isolado Amambai AB 101 foi o que possuiu menor nota, ocupando 95,6% da área total da placa de Petri (Figura 3A e Tabela 4). Por outro lado, o isolado de Sidrolândia S 404 ocupou somente 63,54% da área (Figura 3B e Tabela 4). O rápido crescimento dos isolados de *Trichoderma* em relação ao *C. musae* pode indicar que estes isolados podem ser altamente competitivos por espaço e nutrientes em meio BDA (Chagas et al., 2016).

Tabela 4. Potencial antagonístico de *Trichoderma* contra *C. musae* segundo escala de Bell et al. (1982), ao 7º dia de cultivo.

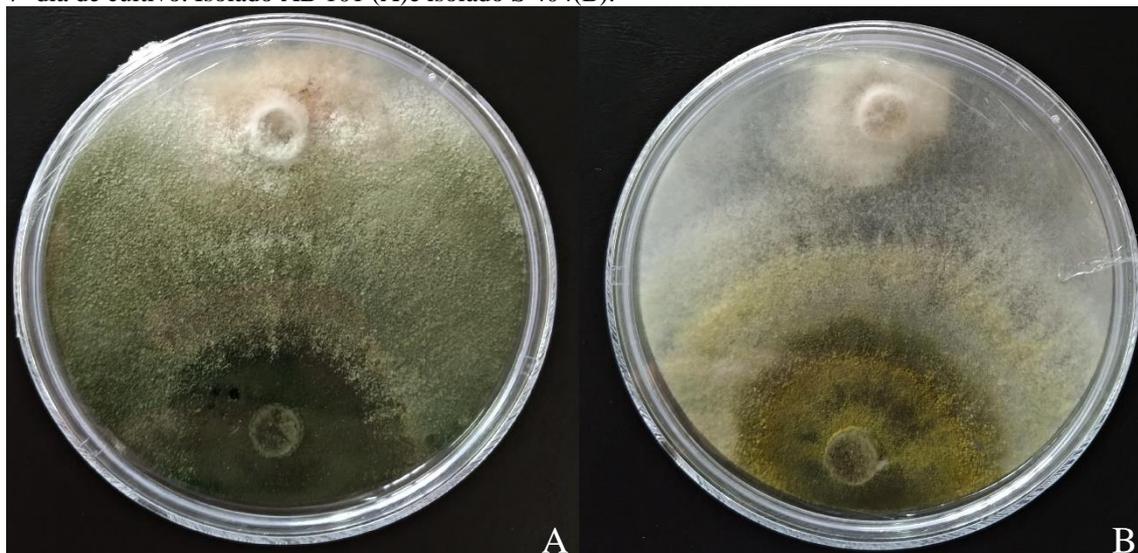
Isolado	<i>C. musae</i>
AB 101	1,176a
PP 102	1,188a
PP 203	1,376a
AB 105	1,378a
S 103	1,640a
AB 203	1,744a
B 201	1,782a

AM 204	1,802a
AM 103	1,838a
B 102	2,016b
AB 303	2,394b
S 203	2,460b
S 404	2,648b
CV (%)	32,09

Médias na coluna seguida de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Nos testes de pareamento, foi possível observar que alguns isolados de *Trichoderma* foram mais agressivos que outros, crescendo por cima do patógeno (Figura 3A) e ocupando 100% da placa, como foi o caso de algumas repetições dos isolados AB 102, AB 105 e PP 102. Isto pode ser explicado pelo fato de que isolados de *Trichoderma* nativos são mais agressivos do que os armazenados em coleções (Garcia-Núñez et al. 2012).

Figura 3. Antagonismo de isolados de *Trichoderma* contra *C. musae* através do teste de culturas pareadas ao 7º dia de cultivo. Isolado AB 101 (A) e isolado S 404 (B).



Os resultados encontrados neste trabalho foram superiores aos obtidos por Oliveira (2009) onde isolados de *Trichoderma*, através de cultivo pareado, obtiveram índices de controle de *C. musae* superior a 80%. Neste trabalho o isolado AB 101 apresentou 94,4% de ocupação da placa. Em estudo semelhante com o gênero *Trichoderma* no biocontrole de *C. musae* e *Lasiodiplodia theobromae*, foi constatada a máxima inibição com isolados de *T. viride*, sendo TV3 com 87,10% e TV4 com 86,30% (Sangeetha et al., 2009). Bonett et al. (2013) também encontrou diferença significativa de antagonismo *in vitro*, quando foi

utilizado *Trichoderma viride* x *C. musa* e obtendo antagonismo de 57,50%, seguido do *T. harzianum* com 56,71%, *T. koningii* 50% e *T. virens* com 43,61%. O autor relata que diferentes espécies *Trichoderma* tem efeitos distintos sobre fitopatógenos, podendo não inibir seu crescimento por completo.

O alto potencial antagonista de alguns isolados de *Trichoderma* apresentado neste trabalho, pode ser atribuído a dois mecanismos de ação pertencente ao gênero *Trichoderma*, o micoparasitismo e a competição. O micoparasitismo acontece pelo fato do *Trichoderma* conseguir localizar e detectar as hifas de fungos hospedeiros, crescendo em sua direção. Possivelmente, isto se dá devido a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, desta forma o *Trichoderma* produz estruturas análogas à apressórios e enrolar-se envolvem fortemente em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa (Melo, 1998). Já o mecanismo de competição é um processo referente à interação entre dois ou mais organismos, empenhados na mesma ação. Os organismos competem entre si para obter nutrientes do meio, água, luz, espaço, fatores de crescimento, oxigênio, entre outros (Melo, 1996). A competição por nutrientes é um mecanismo importante, pois muitos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes (Benítez et al., 2004). Esse é considerado um dos mais clássicos mecanismos de biocontrole (Harman, 2000).

O menor potencial antagonista apresentado pelos isolados B 102, AB 303, S 203 e S404, pode ser resultado de uma maior competição pelos nutrientes do meio, ou uma menor produção de protease e cisteína, enzimas produzidas pelas espécies de *Trichoderma* que inativam a capacidade enzimática do fitopatógenos (Bomfim et al., 2010). A habilidade de fungos do gênero *Trichoderma* obter nutrientes do solo é superior à da maioria dos micro-organismos, seus mecanismos baseiam-se na capacidade de metabolizar diferentes tipos de açúcares tais como: celulosas, glucanas e quitinas, sendo estes processos mediados pela assimilação de enzimas e permeases (Chet; Inbar, 1994; Delgado-Jarana et al., 2003).

3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

Frequentemente é possível observar em estudos *in vitro* com culturas pareadas a inibição do crescimento de *Colletotrichum* sp. por isolados de *Trichoderma*. Isto se dá provavelmente pelo fato de fungo do gênero *Trichoderma* produzirem metabólitos extracelulares difusíveis que inibem o crescimento de patógenos (Michereff et al. 1993). O pioneiro em estudos provando a produção de antibióticos por *Trichoderma* foi Weidling (1932), que conseguiu identificar os antibióticos gliotoxin e viridin. Alguns autores ainda demonstraram que isolados deste gênero foram capazes de produzir metabólitos voláteis e

não voláteis, com efeito inibitório sobre o crescimento de vários fungos e que possam existir mais de 100 compostos voláteis com ação antibiótica (Schuster & Schmoll, 2010). Entre estes metabolitos voláteis estão compostos como ácido harzianico, alamectinas, trichonila, peptaibol, 6-penthy- α -pyrone, massoilactone, viridina, gliovirina, ácido heptelidico, entre outros (Vey et al., 2001).

De acordo com os resultados observados na Tabela 5 e Figura 4, os isolados apresentaram respostas diferentes em relação a inibição do crescimento do patógeno. Os isolados de *Trichoderma* B 201 e PP 203 foram os que exibiram maior ação antifúngica contra o patógeno, apresentando valores de inibição de aproximadamente 74% e 65% do crescimento micelial respectivamente, sendo assim, superiores aos demais isolados avaliados (Tabela 5). Porém, todos os isolados foram capazes de inibir o crescimento micelial do *C. musae*, tendo os isolados AB 105 e PP 102 com piores desempenhos, inibindo respectivamente em torno de 50% e 47% do crescimento do patógeno.

Tabela 5. Crescimento micelial de colônias (cm) de *C. musae* submetidas a efeito de metabólitos voláteis produzidos *in vitro* por isolados de *Trichoderma* nativos de Mato Grosso do Sul.

Isolado	<i>C. musae</i>
B 201	2,24a
PP 203	2,98a
AB 203	3,22b
S 103	3,24b
AM 103	3,26b
S 404	3,42b
AB 101	3,46b
B 102	3,54b
AM 204	3,66c
S 203	3,86c
AB 303	3,86c
AB 105	4,24d
PP 102	4,44d
CV (%)	9,35

Médias na coluna seguida de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Uma possível explicação para as diferenças estatísticas encontradas entre os isolados de *Trichoderma* no teste de metabólitos voláteis reside no fato de que os mecanismos de ação, tais como produção de metabólitos voláteis tóxicos, podem variar entre isolados de mesma espécie entre gêneros (Carvalho et al., 2014).

Metabólitos antimicrobianos produzidos por *Trichoderma* são eficazes contra uma ampla gama de fungos fitopatogênicos, como por exemplo, *Fusarium oxysporum*,

Rhizoctonia solani, *Curvularia lunata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Colletotrichum lagenarium*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (Prasad e Kumar, 2011). Os isolados CEN1245 e CEN1274 pertencente a espécie de *Trichoderma brevicompactum*, mostraram um amplo espectro de ação, atuando contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* e *Cylindro cladium* sp. (Marques et al., 2018).

O mecanismo que pode explicar a redução das colônias de *C. musae* no teste dos metabolitos voláteis é a antibiose, que é definida como a interação na qual um ou mais metabolitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (Stadnik&Bettiol, 2000). Segundo Harman (2000) muitas espécies de *Trichoderma*, já estudadas, podem sintetizar metabolitos voláteis como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos. É possível que exista mais de 40 substâncias produzidas por *Trichoderma* que possuem atividade antibiótica.

Figura 4. Efeito de metabolitos voláteis de *Trichoderma* nativos de Mato Grosso do Sul contra *C. musae*. Isolado AB 101 (A), isolado AB 105 (B), placa controle (C), isolado AB 203 (D) e isolado AB 303 (E).



Fatores como temperatura, umidade, aeração, pH do solo, teor de matéria orgânica, entre outros influenciam a sobrevivência e eficiência do *Trichoderma* em solos (Cook & Beker, 1983; Ether, 2002). Sendo assim, é importante trabalhos que visem a obtenção de isolados de *Trichoderma* nativos do estado de Mato Grosso do Sul.

Os isolados apresentados neste trabalho irão fazer parte da coleção do gênero *Trichoderma* da Universidade Católica Dom Bosco. Estes isolados serão utilizados ainda em várias pesquisas para avaliar seu potencial frente a várias doenças de plantas de importância econômica para o estado do Mato Grosso do Sul, possibilitando assim maiores sucessos em programas de controle biológico utilizando *Trichoderma*.

Diante do exposto conclui-se que, foram obtidos 60 isolados de *Trichoderma* com grande diversidade morfológica e todos os isolados avaliados apresentaram potencial antagônico sobre o patógeno *C. musae*, sendo que os isolados AB 101, B 201 e PP 203 apresentaram melhores resultados nos dois testes realizados, o que pode conferir maior probabilidade de sucesso em um programa futuro de controle biológico do *C. musae*.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFIA, R.G.; Gonçalves, R.C. Métodos em Fitopatologia. Edição: Alfenas, A.C.; Mafia, R.G. Cap. Isolamento de Fungos Fitopatogênicos. p. 53-90. 2016.
- AZEVEDO, D.M.Q.; ROCHA, F.S.; FERNANDES. M.F.G.; COSTA, C.A.; MUNIZ, M.F.S.; BARROSO, P.D.; AMARAL, F.L.; BAROSA, D.M.C.R. 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.
- BASTOS, C.N. & ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. Fitopatologia Brasileira, v.26, n.5, p.555-7, 2004.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, v. 72, n.1, p.379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C. & CONDÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7, 4: 249-260. 2004.
- BETTIOL, W. & GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 79-95.
- BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp.. Plant and Soil, v.57, p.131-135, 1980.
- BOMFIM, M.P.; JOSÉ, A.R.S.; REBOLÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I.V.B.; DIAS, N.O. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. Summa Phytopathologica, v.36, n.1, p.61-67, 2010.
- BONETT, L.P., HURMANN, E.M.S. de, POZZA JÚNIOR, M.C., ROSA, T.B. & SOARES, J.L. 2013. Biocontrole in vitro de *Colletotrichum musae* por isolados de *Trichoderma* spp. Uniciências, v.7, n.1, p. 5-10.
- BROTMAN, Y.; GUPTA, K.J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. Current Biology, v. 20, p.390-391, 2010.
- CARVALHO, D. D. C.; JUNIOR, M.L.; MARTINS, I. INGLIS, P.W.; MELLO, S.C.M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. Tropical Plant Pathology, New York, v. 39, p. 384-391, 2014
- CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A. M. 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
- CHAGAS, L. F. B.; GODOY, V.H.S.; MILLER, L.O.; FILHO, M.R.C. Bioprospecção de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum cliviae* e *C. truncatum*. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 14, n. 4, p. 238-242, out. 2016.

CHET, I.; INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 48, n. 1, p. 37-43, 1994.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1983. 539 p.

CORDEIRO, Z. J. M., MATOS, A. P., KIMATI, H. *Doenças da bananeira*. In: Amorim, L. et al., 2016. Manual de Fitopatologia. Ouro Fino: CERES. p. 109-124.

COUTO, E.F.E.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.29, n.4 p.406-412, 2004.

DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. [Soil Biology and Biochemistry](#). 1973. v. 5, p. 495- 504.

DELGADO-JARANA, J.; MORENO-MATEOS, M. A.; BENÍTEZ, T. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of gtt1. *EukCell*, v. 2, p. 708-717. , 2003.

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*, v. 38, n. 01, p. 19-26, 2008.

GARCÍA-NÚÑEZ, H. G. Isolation of native strains of *Trichoderma* spp. from horticultural soils of the Valley of Toluca, for potential biocontrol of Sclerotinia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, v. 15, n. 2, p.357-365, 2012.

HARMAN, G.E.- Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84, 4: 376–393. 2000.

HARMAN, G.E., PETZOLDT, R., COMIS, A., CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium multivium* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* . v.94: p. 147-153, 2004.

HELING, L. A., KUHN, O. J., STANGARLIN, J. R., HENKEMEIER, N. P., RONCATO, S. C., GONÇALVES, E. D. V. Controle biológico de antracnose em pós-colheita de banana “Maçã” com *Saccharomyces* spp. *Summa Phytopathology*., Botucatu, v. 43, n. 1, p. 49-51, 2017

HOITINK, H. A. J. et al., Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology*, 2006. v. 96, p. 186-189.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, v.87, p.4-10, 2003.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA - ABRIL 2018.
Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa>> Acesso em maio de 2018.

LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I., BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. *Biota Neotropica*.v9, 2009.

MARQUES, Eder; MARTINS, Irene, MELLO, Sueli Correa Marques de. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotropica*. v.18, n.1, 2018.

MARTINS, A. et al. Técnica modificada de microcultura de fungos para visualização microscópica. Embrapa recursos genéticos, Embrapa, p. 1-4, ago. 2008.

MELO, I.S.- Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S. e Azevedo, J.L. (Ed.) - *Controle Biológico*, v.1. Jaguariúna, Embrapa, 1998. p.17-60

MELO, I.S.- *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4: 261-295. 1996.

MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Potencial de *Trichoderma* para o controle da antracnose do sorgo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 18, p. 392-398, 1993.

NEGREIROS, R.J.Z.de; SALOMÃO, L.C.C.; PEREIRA, O.L.; CECON, P.R.; SIQUEIRA, L.D. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas-’prata’ com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. *Revista Brasileira Fruticultura*. Jaboticabal. vol.35, n.1, p.51-58.2013

OLIVEIRA, E.S. Extratos e óleos essenciais vegetais, microrganismos antagonistas, indutores de resistência e produtos antissépticos no controle da antracnose em banana. Fortaleza: UFC, 2009.

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.

PEDRAZZOLI, D. S.; HERRMANN, G. R. Análise do Mercado de Defensivos Agrícolas Naturais. In: HALFELD-VIEIRA, Bernardo de Almeida et al. *Defensivos Agrícolas Naturais*. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2016. cap. 3, p. 52-64.

PERAZZOLI, M.; DAGOSTIN, S.; FERRARI, A.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grape vine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadizole. *Biological Control*, v.47, p.228-234, 2008.

PRASAD, B.N.; KUMAR, M.R. Effect of non-volatile compounds produced by *Trichoderma* spp. on growth and sclerotial viability of *Rhizoctonia solani*, incitant of sheathb light of rice. [Indian Journal of Fundamental and Applied Life Science](#). v.1, n.2, p.37-42, 2011.

SANGEETHA, G.; USHARANI, S.; MUTHUKUMAR, A. Biocontrol with *Trichoderma* species for the management of post harvest crown rot of banana. *Phytopathology*., v.48, n.1, p.214- 225, 2009.

SCHUSTER, A., SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology Biotechnology.v.87:p.787–799. 2010.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for group in means in analysis of variance. Biometrics, v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid ethylene signal in pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. Phytopathology, v.95, p.76-84, 2005.

SIMONATO, F.; GRIGOLLI, J.F.J.; OLIVEIRA, H.N. Controle Biológico de Insetos-Praga na Soja. Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014. 178-193. 2014.

SINDIVEG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. Estatísticas do Setor, 2017.

STADNIK, M.J. E BETTIOL, W. (2000) - Controle biológico de oídeos. In: Melo, I.S. Azevedo, J.L. (Ed.) - *Controle biológico*. v.3. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 95–112.

VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. . In: Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. BUTT, T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. L. Bristol: CAB International, 2001. p. 311- 346.

VIEIRA, B. A.H., et al., 2016. Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas. In: PEDRAZZOLI, D. S. & HERRMANN, G. R. *Análise do Mercado de Defensivos Agrícolas Naturais*. Brasília, DF: EMBRAPA. P. 52-64.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERT, E.L.; MARA, R.; BARBETTI, M.J.; LI, H.; WOO, S.L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. Physiological and Molecular Plant Pathology, v.72, p.80-86, 2008.

VITERBO, A.; HAREL, M.; HORWITZ, B.A.; CHET, I.; MUKHERJEE, P.K. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinases signaling involved in induction of plant systemic resistance. Applied and Environmental Microbiology, v.71, p.6241-6246, 2005.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of others soil fungi. Phytopathology.v.22(8):p.837-845. 1932.