



## Evaluation of the sensitivity of *Colletotrichum* spp. to *Trichoderma harzianum*

### Avaliação da sensibilidade de *Colletotrichum* spp. a *Trichoderma harzianum*

SILVA, Jackeline Laurentino da<sup>(1)</sup>; Costa, Jaqueline de Oliveira<sup>(2)</sup>; RAMIREZ, Cecilia Hernandez<sup>(3)</sup>; SILVA, Maria Jussara dos Santos da<sup>(4)</sup>; SANTOS, Maria Hilma dos<sup>(5)</sup>; LIMA, Gaus Silvestre de Andrade<sup>(6)</sup>; ASSUNÇÃO, Iraídes Pereira<sup>(7)</sup>.

<sup>(1)</sup> 0000-0003-4222-0805; Universidade Federal de Alagoas (UFAL)/Doutora do curso de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, Alagoas (AL), BRASIL. jackeline.laurentino@outlook.com;

<sup>(2)</sup> 0000-0003-0121-699X; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Pesquisadora do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, Alagoas (AL), BRASIL. jaquelinefigueredo@hotmail.com;

<sup>(3)</sup> 0000-0002-8639-0470; Universidade Federal de Alagoas (UFAL)/Doutoranda do curso de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, Alagoas (AL), BRASIL. cecih967@gmail.com;

<sup>(4)</sup> 0000-0001-9418-854X; Universidade Federal de Alagoas (UFAL)/Doutora do curso de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, Alagoas (AL), BRASIL. maria\_jussara@hotmail.com.br;

<sup>(5)</sup> 0000-0001-8592-6977; Universidade Federal de Alagoas (UFAL)/Mestranda do curso de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, Alagoas (AL), BRASIL. hilma2050@gmail.com;

<sup>(6)</sup> 0000-0003-2910-5896; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Prof. Dr. do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, Alagoas (AL), BRASIL. gaus@ceca.ufal.br.

<sup>(7)</sup> 0000-0001-5087-0168; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, Alagoas (AL), BRASIL. iraildes.assuncao@ceca.ufal.br;

<sup>1</sup>Sector de Fitossanidade/Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL, Brazil, 57100-000

O conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos/as seus/as autores/as.

O conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos/as seus/as autores/as.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vitro* the effects of *T. harzianum* on five species of *Colletotrichum*. For the pairing test, *Colletotrichum* spp. was inoculated in synthetic PDA medium and after 72 hours the antagonist *T. harzianum* was added, in the opposite direction to the phytopathogens. To evaluate the action of metabolites, *Colletotrichum* species were inoculated in the center of Petri dishes, separately and after 48 hours *T. harzianum* was inoculated in plates containing synthetic PDA medium. The bases of the plates containing antagonist and phytopathogens were joined and sealed. The mycelial growth index (MGI) and the percentage of mycelial growth inhibition (PMGI) were estimated. When evaluating the antagonism of *T. harzianum* to *Colletotrichum* spp. in the pairing test and volatile metabolites, it was observed that all *Colletotrichum* species presented PMGI below 31% in both tests. In the MGI for the matching test, it was observed that *C. tropicale* was the most sensitive species (1.87 cm) at the concentrations of 1 and 1.5 L/ha, while in the volatile metabolites test it was *C. plurivorum* (3.21 cm). *T. harzianum* is a promising species for the reduction of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose in passion fruit crops.

## RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos de *T. harzianum* sobre cinco espécies de *Colletotrichum*. Para o teste de pareamento foram inoculadas as *Colletotrichum* spp. em meio BDA sintético e após 72 horas foi adicionado o antagonista *T. harzianum*, na direção oposta aos fitopatógenos. Para avaliação da ação de metabólitos foram inoculadas as espécies de *Colletotrichum* no centro de placas de Petri, separadamente e após 48 horas foi inoculado *T. harzianum* em placas contendo meio BDA sintético. As bases das placas contendo antagonista e os fitopatógenos foram unidas e vedadas. Foram estimados o índice de crescimento micelial (IVCM) e a porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC). Ao avaliar o antagonismo de *T. harzianum* sobre *Colletotrichum* spp. no teste de pareamento e metabólitos voláteis observou-se que todas as espécies de *Colletotrichum* apresentaram PIC abaixo de 31%, em ambos os testes. No IVCM para o teste de pareamento observa-se que *C. tropicale* foi a espécie mais sensível (1,87 cm) nas concentrações de 1 e 1,5 L/ha, enquanto no teste de metabólitos voláteis foi *C. plurivorum* (3,21 cm). *T. harzianum* é uma espécie promissora para a redução de *Colletotrichum* spp. associadas a antracnose na cultura do maracujazeiro.

## INFORMAÇÕES DO ARTIGO

### Histórico do Artigo:

Submetido: 18/06/2024

Aprovado: 22/01/2025

Publicação: 03/02/2025



### Keywords:

anthracnose, biofungicidas, biological fungicides, mycoparasitism, *passiflora*

### Palavras-Chave:

antracnose, biofungicidas, fungicidas biológicos, micoparasitismo, *passiflora*

## Introdução

O Brasil é um dos principais países produtores de alimentos no mundo. Devido à adoção de tecnologias, a produtividade vem aumentando e o manejo da terra agricultável está sendo otimizado (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2022). Dentre as culturas de importância econômica destaca-se a do maracujazeiro, principalmente por ser uma alternativa promissora, com grande retorno econômico, que também desempenha um papel socioeconômico de grande relevância para pequeno e médio produtor (Meletti, 2011; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2023).

A produção nacional da cultura do maracujazeiro apresenta alguns entraves, como os problemas fitossanitários causados por fitopatógenos (São José, 2015), sendo o gênero *Colletotrichum* o principal agente causador da doença antracnose (Dean et al., 2012). Nos últimos anos, observa-se uma busca pela diversificação de ferramentas no manejo integrado de doenças e produtos de qualidade (Medeiros et al., 2018; Meyer et al., 2019).

A constante preocupação da sociedade com a contaminação alimentar e problemas ambientais, além de diversas barreiras no mercado de exportação pelo uso de variadas moléculas químicas, abriu segmentos no mercado para o uso de novas formas de controle, como, por exemplo, o manejo biológico (Morandi et al., 2014). Segundo a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio, 2021), a indústria de biocontrole está crescendo 5,3 vezes mais rápido do que a indústria de defensivos químicos. O Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2021) registrou um recorde de 95 defensivos de baixo impacto. Desses, quinze defensivos são compostos por espécies do gênero *Trichoderma*. Um levantamento de produtos recomendados para o uso no controle biológico, realizado por Bettiol et al. (2012), mostrou que mais de 40 espécies antagonistas eram utilizadas para o controle de doenças, sendo o gênero *Trichoderma* responsável por quase 50%.

Vários produtos à base de *Trichoderma* são liberados, no entanto, a espécie *T. harzianum* é a mais comercializada, com cerca de 38,8% dos produtos sem mistura, chegando a 50% dos produtos disponíveis no mercado. Quando há mistura de espécies de *Trichoderma*, juntamente com outros gêneros de fungos, bactérias e micorrizas, essa porcentagem aumenta, chegando a 60% dos produtos para controle biológico liberados mundialmente (Bettiol et al., 2019).

As espécies do gênero *Trichoderma* são fungos anamórficos. Eles possuem esporulação amarela ou esverdeada e controlam patógenos de parte aérea, sementes e raízes através da produção de enzimas que degradam a parede celular (Morandi et al., 2009) e, metabólitos secundários responsáveis por uma atividade antifúngica em um amplo número de gêneros fúngicos (Hermosa et al., 2014), além de ser utilizados como fungo promotor do crescimento de plantas (Medeiros et al., 2018).

Tendo em vista os resultados satisfatórios no controle de diversos fitopatógenos que causam doenças em culturas de importância econômica, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito antagônico de *Trichoderma harzianum* como biocontrole de *Colletotrichum* spp. associadas à antracnose do maracujazeiro.

## Material e métodos

### **Local do experimento, obtenção das espécies de *Colletotrichum* e mudas de maracujazeiro**

O trabalho foi realizado no *Campus* de Engenharias e Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas, em Rio Largo (AL). Os experimentos foram conduzidos na clínica fitossanitária.

Isolados representativos de cinco espécies de *Colletotrichum*, provenientes da doença antracnose na cultura do maracujazeiro, foram obtidos da Coleção de Fitopatógenos da Universidade Federal de Alagoas (COUFAL). Os isolados foram caracterizados por Inferência Bayseana, baseados em análises multi-locus, utilizando os genes gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*), quitina sintetase (*CHS-1*),  $\beta$  – tubulina (*TUB2*) e região do espaço interno transcrito (ITS), por Silva et al. (2022), e suas sequências parciais foram depositadas no GenBank, com os códigos descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.**

Isolados de *Colletotrichum*

ESPÉCIES	CÓDIGOS	Números de acesso do GenBank			
		<i>GAPDH</i>	<i>ITS</i>	<i>TUB2</i>	<i>CHS-1</i>
<i>C. brevisporum</i>	*COUFALo271	MT299329	MT334686	MT310545	MT314425
<i>C. plurivorum</i>	COUFALo275	MT299333	MT334689	MT310548	-
<i>C. fructicola</i>	COUFALo279	MT299337	MT334692	MT310551	-
<i>C. theobromicola</i>	COUFALo280	MT299338	MT334693	MT310552	-
<i>C. tropicale</i>	COUFALo282	MT299340	MT334695	MT310554	-

\* COUFAL: Coleção de fitopatógenos da Universidade Federal de Alagoas.

Fonte: Autores (2020).

### **Crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* e *Trichoderma harzianum***

Foi avaliado o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* e do *T. harzianum*, obtido do produto comercial Trichodermil SC 1306/KOPPERT, nas concentrações 0,5; 1,0; e 1,5 L/ha, recomendadas pelo fabricante para a podridão da haste da soja (*Sclerotinia sclerotiorum*) e podridão-abacaxi (*Thielaviopsis paradoxa*). Para isto, discos de papel filtro ( $\emptyset$  5 mm) esterilizados foram mergulhados, por 30 segundos, nas suspensões de esporos de

*Colletotrichum* na concentração  $2 \times 10^6$  conídios/mL, enquanto para o *T. harzianum* foi utilizada a concentração de  $2 \times 10^9$  conídios/mL (recomendada pelo fabricante). Posteriormente, esses discos foram depositados separadamente no centro das placas de Petri (9 cm Ø) contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA – Kasvi) sintético. As placas foram transferidas para uma câmara do tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*), à temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 h. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco espécies de *Colletotrichum* e o *T. harzianum*, cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri.

As avaliações foram obtidas a partir da medição diária, do diâmetro das colônias (cm/dia) tomadas no verso das placas em duas direções perpendiculares, com o auxílio de uma régua milimetrada.

### ***Antagonismo in vitro de T. harzianum sobre espécies de Colletotrichum por pareamento***

As avaliações da atividade antagônica de *T. harzianum* sobre o crescimento *in vitro* de espécies de *Colletotrichum* foram realizadas de acordo com a metodologia de pareamento de culturas proposta por Dennis e Webster (1971), utilizando as concentrações 0,5; 1,0; 1,5 L/ha e a testemunha. Inicialmente, foram cultivadas espécies de *Colletotrichum* e o *T. harzianum*, separadamente, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA sintético e incubados em B.O.D., à temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias, para obtenção das suspensões de conídios. Das espécies de *Colletotrichum* foram coletadas suspensões através da raspagem da superfície das colônias com bisturi estéril em 10 ml de ADE e filtradas em camadas de gaze, para remover quaisquer detritos miceliais.

Os esporos foram contados em hemocitômetro e a contagem de esporos foi ajustada para  $2 \times 10^6$  conídios/mL. Posteriormente, discos de papel filtro (Ø 5 mm) esterilizados foram umedecidos em suspensão de conídios das espécies de *Colletotrichum*, por 30 segundos, secos em papel filtro e transferidos para a extremidade de placas de Petri, contendo meio BDA sintético e incubadas em B.O.D., à temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 72 horas. Após esse período, discos de papel filtro foram umedecidos nas diferentes concentrações de *T. harzianum* e, posteriormente, depositados na extremidade oposta das placas, que foram inoculadas anteriormente com as espécies de *Colletotrichum*, exceto a testemunha, em que se manteve apenas o patógeno ou o antagonista em uma das extremidades da placa. As placas foram vedadas novamente e transferidas para câmara de incubação (B.O.D.), a 25 °C com fotoperíodo de 12 h, onde permaneceram por 7 dias, contados a partir da primeira inoculação do patógeno.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com cinco repetições, constituídas por uma placa de Petri, sendo cinco espécies de *Colletotrichum* e as concentrações de *T. harzianum*.

As avaliações foram obtidas a partir da medição diária do diâmetro das colônias (*Colletotrichum* spp. e *T. harzianum*), tomadas no verso das placas em duas direções perpendiculares, com o auxílio de uma régua milimetrada, até o sétimo dia. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; Oliveira, 1991) e o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC; Bastos, 1997) foram determinadas de acordo com as fórmulas (1) e (2), respectivamente.

$$\boxed{1} \quad IVCM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \frac{C_n}{N_n}$$

Onde:  $C_1$ ,  $C_2$  e  $C_n$  correspondem ao crescimento micelial na primeira, segunda e última avaliação; e  $N_1$ ,  $N_2$  e  $N_n$  correspondem ao número de dias após a inoculação.

$$\boxed{2} \quad PIC = \frac{(\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento do tratamento}) \times 100}{\text{Crescimento da testemunha}}$$

A escala proposta por Bell et al. (1982) foi usada para a avaliação, esta, por sua vez, atribui classes que variam de 1 a 5. Nota 1: quando o antagonista cresce e ocupa toda a placa; nota 2: quando o antagonista cresce sobre parte do patógeno (2/3 da placa); nota 3: quando o antagonista e patógeno crescem até a metade da placa (nenhum domina o outro); nota 4: o patógeno cresce e ocupa uma parte do antagonista (2/3 da placa); e nota 5: o patógeno cresce e ocupa toda a placa.

### **Ação de metabólitos voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento micelial *Colletotrichum* spp.**

Para avaliação do potencial inibidor de metabólitos voláteis produzido por *T. harzianum* sobre *Colletotrichum* spp. foi realizado um teste adaptado da metodologia descrita por Bomfim et al. (2010). Foram depositados disco de micélio ( $\varnothing$  5 mm) dos fitopatógenos *C. brevisporum*, *C. plurivorum*, *C. tropicale*, *C. theobromicola* e *C. fructicola*, separadamente, no centro das placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo meio de cultura BDA sintético. As placas foram vedadas e mantidas por 48 h em B.O.D., a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período inicial de incubação foi transferido um disco de micélio de *T. harzianum* no centro de novas placas de Petri, com as mesmas dimensões e com meio de cultura BDA sintético. Posteriormente, as bases das placas que continham o antagonista e o patógeno foram sobrepostas, unidas e vedadas. Para testemunha, foram utilizados fundos de placas de Petri que traziam meio de cultura BDA, onde foi adicionado, ao centro da placa, um disco de micélio, contendo as estruturas dos patógenos, separadamente, e no outro fundo, apenas disco de meio BDA sintético sobre o meio de cultura, e posteriormente, as placas foram sobrepostas e vedadas, mantidas em câmara de incubação sob a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com cinco repetições, constituídas por uma placa de Petri, sendo cinco espécies de *Colletotrichum*

e o *T. harzianum*. As avaliações foram obtidas a partir da medição diária do diâmetro das colônias (*Colletotrichum* spp. e *T. harzianum*), tomadas no verso das placas em duas direções perpendiculares, com o auxílio de uma régua milimetrada, até o sétimo dia.

O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC; Bastos, 1997) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; Oliveira, 1991) foi determinado de acordo com as fórmulas descritas no experimento anterior.

### **Análise dos dados**

Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, utilizando o programa estatístico Assistat (Silva & Azevedo, 2016).

## **Resultados**

### **Crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* e *Trichoderma harzianum***

Observou-se que houve uniformidade no crescimento micelial do antagonista (*T. harzianum* – Cepa ESALQ 1306), em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5 L/ha), enquanto as espécies de *Colletotrichum* (*C. plurivorum*, *C. brevisporum*, *C. tropicale*, *C. theobromicola* e *C. fructicola*) apresentaram crescimento micelial inferior, quando analisados ao quarto dia, tempo necessário para o antagonista crescer totalmente sobre a superfície do meio de cultura BDA (Figura 1).

**Figura 1.**

Crescimento micelial de *Trichoderma harzianum* e *Colletotrichum* spp, ao quarto dia.

*C. brevisporum*

*C. fructicola*

*C. plurivorum*

*C. tropicale*

*C. theobromicola*



*Trichoderma harzianum*



Fonte: Autores (2023).

0,5 L/ha

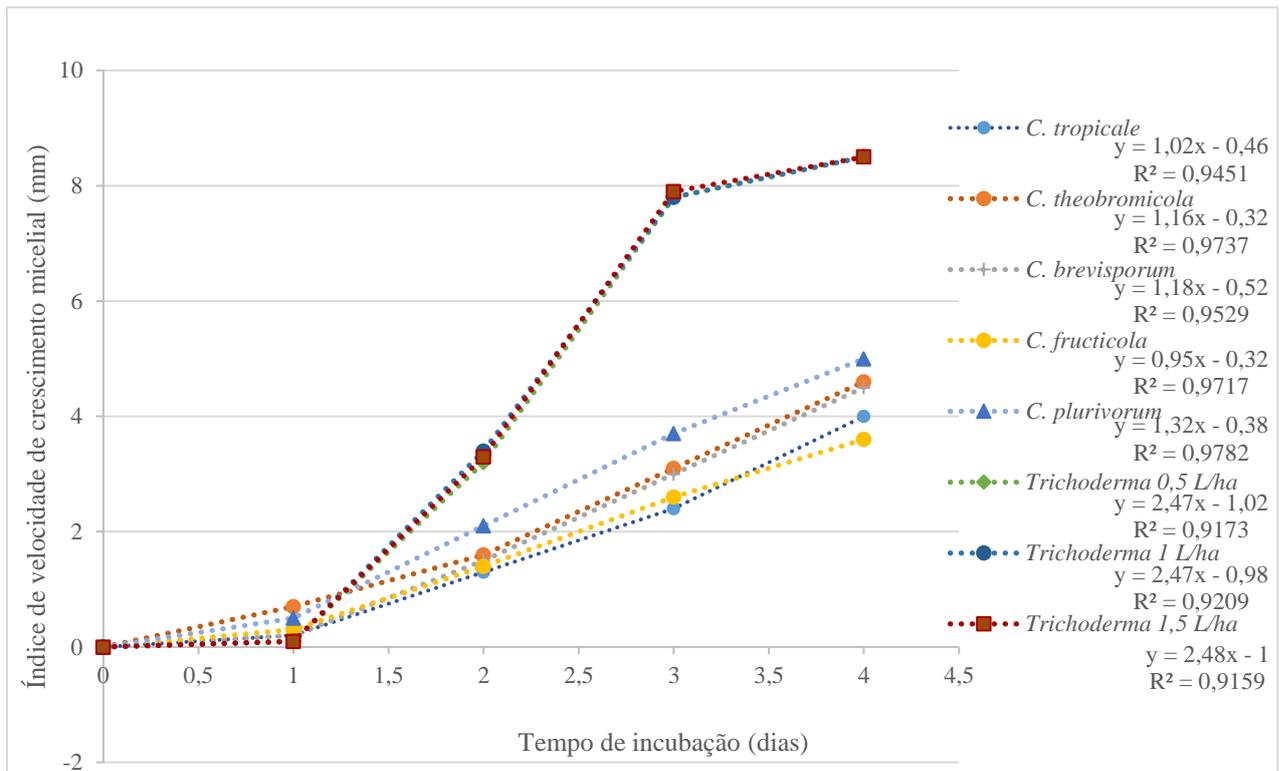
1,0 L/ha

1,5 L/ha

Na avaliação do índice de crescimento micelial, ao quarto dia de incubação, constatou-se que o antagonista, *T. harzianum*, apresentou diâmetro da colônia de 8,5 cm, nas três concentrações. No mesmo período de avaliação, as espécies de *Colletotrichum* apresentaram comportamento diferenciado, quando o IVCM para *C. plurivorum* foi de 5,0 cm, *C. theobromicola* (4,6 cm), *C. brevisporum* (4,5 cm), *C. tropicale* (4,0 cm) e *C. fructicola* de 3,6 cm (Figura 2).

**Figura 2.**

Análise de regressão do índice de velocidade de crescimento micelial do *Trichoderma harzianum* e das *Colletotrichum* spp.



Fonte: Autores (2023).

## **Antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* sobre espécies de *Colletotrichum* por pareamento**

Analisando o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) das cinco espécies de *Colletotrichum*, aos sete dias, sem a presença do antagonista, observou-se que não houve diferença significativa entre as espécies *C. plurivorum* (2,0 cm), *C. fructicola* (1,93 cm), *C. tropicale* (2,02 cm) e *C. brevisporum* (2,16 cm), exceto *C. theobromicola*, que apresentou 2,49 cm, quando os discos de papel contendo as suspensões dos patógenos foram adicionados nas extremidade de placas de Petri, contendo meio BDA sintético (Tabela 2).

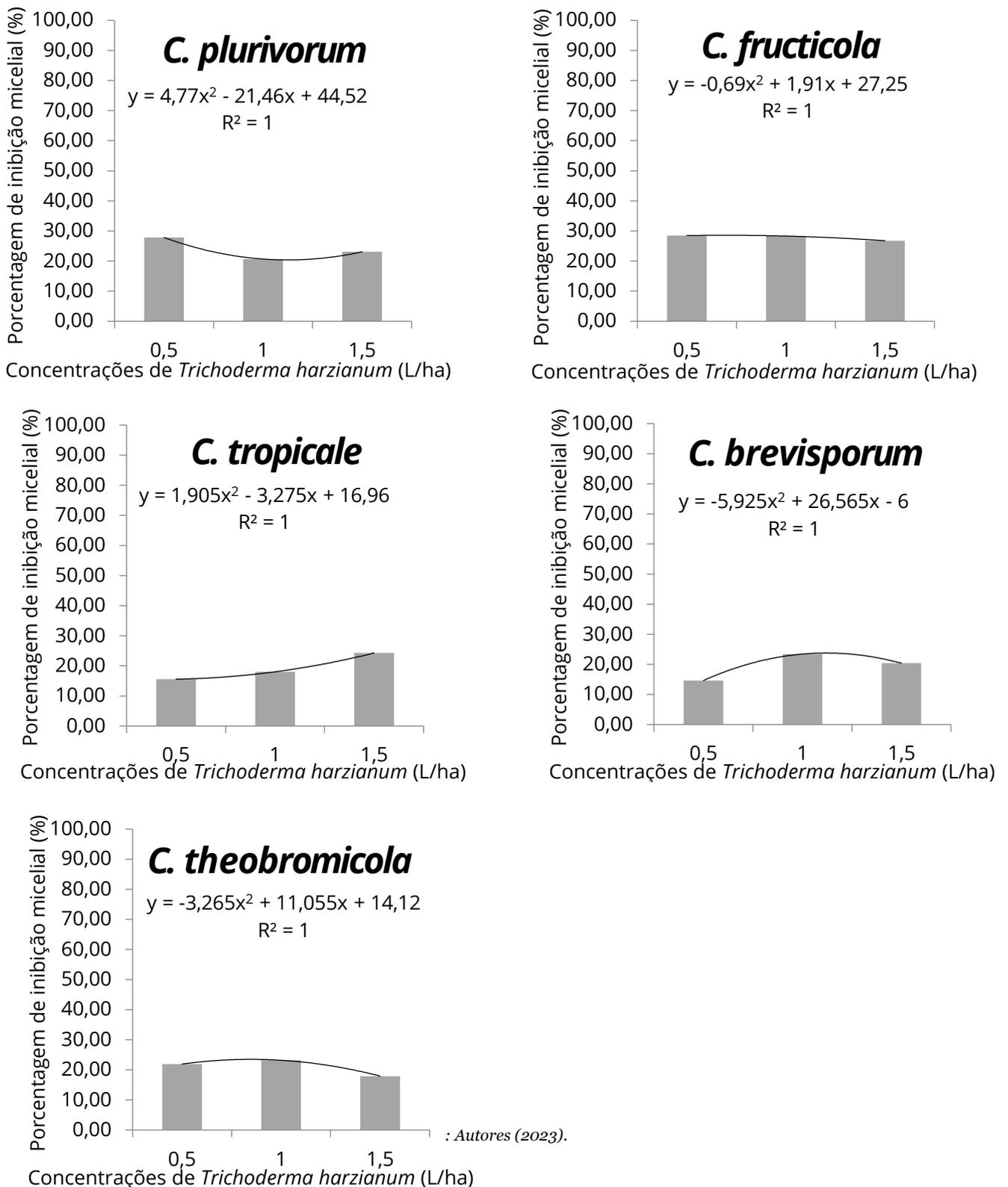
As espécies *C. plurivorum*, *C. brevisporum*, *C. fructicola* e *C. tropicale* se comportaram de forma similar em relação ao IVCM, não deferindo significativamente nas três concentrações do antagonista (0,5; 1,0; 1,5 L/ha) e testemunhas. No entanto, apenas *C. theobromicola* apresentou comportamento diferenciado em relação às demais, em todas as concentrações, tendo seu maior índice de velocidade de crescimento micelial (2,67 cm), na concentração 1,5 L/ha (Tabela 2).

Na porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC), as espécies de *Colletotrichum* apresentaram valores distintos frente ao *T. harzianum* nas concentrações 0,5; 1,0; e 1,5 L/ha, exceto a espécie *C. fructicola*, que apresentou a maior PIC nas concentrações de 0,5 L/ha (28,47%) e 1,0 L/ha (28,31%), quando comparada às demais espécies, não diferindo estatisticamente entre elas. No entanto, as espécies *C. plurivorum* e *C. brevisporum* apresentaram comportamento semelhantes, estatisticamente, quando submetidas às concentrações 1,0 e 1,5 L/ha, e as espécies *C. tropicale* e *C. theobromicola* quando se utilizou as doses 0,5 e 1,0 L/ha. Observa-se ainda que a espécie *C. brevisporum* apresentou a menor PIC (14,64 %) e *C. fructicola* a maior PIC (28,47 %) entre as espécies e concentrações testadas (Tabela 2).

A tabela 2 mostra que à medida que aumentavam as concentrações de *T. harzianum*, também aumentava a porcentagem de inibição do crescimento micelial para a espécie *C. tropicale*. As espécies *C. theobromicola* e *C. brevisporum* apresentaram comportamento semelhante em todas as concentrações testada, no entanto, a maior porcentagem de inibição foi obtida na concentração de 1,0 L/ha com valores de 23,17 e 23,43 %, respectivamente. De forma geral, *C. fructicola* foi a espécie mais sensível quando submetida ao confronto com o antagonista, apresentando uma melhor resposta na concentração 0,5 L/ha, com 28,47 % de inibição. A espécie menos sensível ao antagonista foi *C. brevisporum* (14,64 L/ha) na concentração 0,5 L/ha. No entanto, todas as espécies de *Colletotrichum* apresentaram PIC inferior a 30 % (Figura 3 e Tabela 2).

**Figura 3.**

Porcentagem de inibição micelial (PIC) das espécies de *Colletotrichum* utilizando *Trichoderma harzianum*, aos 7 dias.



Verificou-se que não houve diferença entre as espécies *C. plurivorum*, *C. fructicola*, *C. tropicale* e *C. brevisporum* quando avaliadas com a escala de notas proposta por Bell et al. (1982), sendo atribuída nota 2 (2/3 da placa ocupado pelo antagonista). Já a espécie *C. theobromicola* recebeu nota 3, aos 7 e 10 dias, indicando que tanto o antagonista como o patógeno cresceram 50% da placa cada, e um não parece dominar o outro nas concentrações 0,5; 1,0 e 1,5 L/ha (Figura 4 e Tabela 2).

**Tabela 2.**

Médias da inibição de velocidade de crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento micelial nas distintas concentrações de *Trichoderma harzianum* no controle de *Colletotrichum* spp.

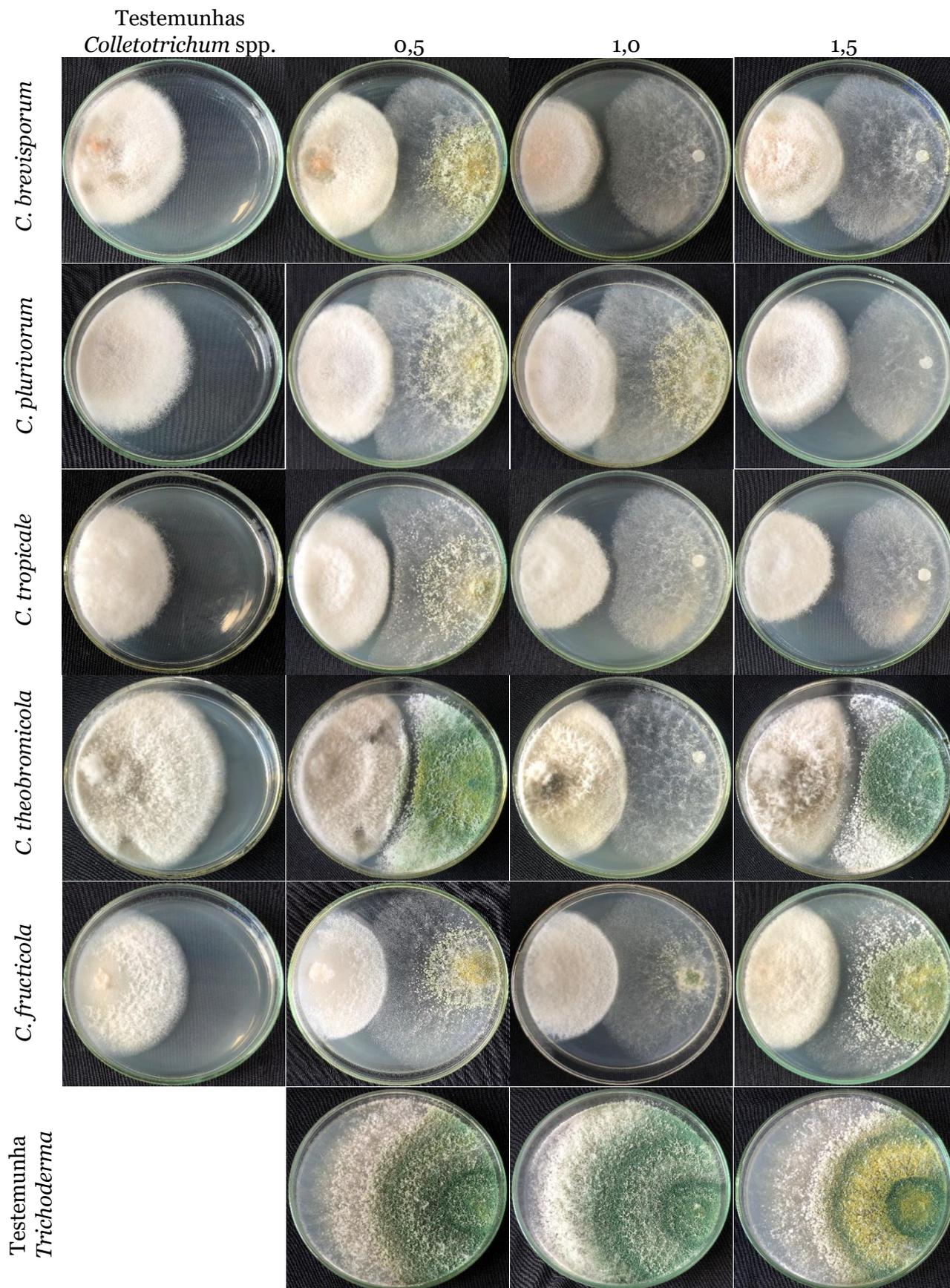
Espécies de <i>Colletotrichum</i>	CONCENTRAÇÕES (L/ha)							Escala de Bell 7 (dias)
	IVCM (cm) (Interação E x C)				PIC (%) (Interação E x C)			
	Testemunha	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	
<i>C. plurivorum</i>	2,00 bA	2,01 bA	2,12 bA	2,19 bA	27,83 aA	20,68 bcB	23,07 abB	2
<i>C. fructicola</i>	1,93 bA	1,99 bA	1,98 bA	2,16 bA	28,47 aA	28,31 aA	26,77 aA	2
<i>C. tropicale</i>	2,02 bA	2,03 bA	1,87 bA	1,87 cA	15,59 dB	18,03 cB	24,28 abA	2
<i>C. brevisporum</i>	2,16 bA	1,95 bA	2,02 bA	2,01 bcA	14,64 cB	23,43 bA	20,37 bcA	2
<i>C. theobromicola</i>	2,49 aA	2,45 aA	2,62 aA	2,67 aA	21,91 bA	23,17 bA	17,90 cB	3
Espécies (E)	61.8924 **				31.9559 **			
Concentrações (C)	1.8821 ns				1.1993 ns			
Interação E x C	2.3971 *				12.3670 **			
CV (%)	6,60				11,07			

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. (\*\*) Significativo a 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); (\*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 = < p < .05$ ); (ns) Não significativo ( $p \geq .05$ ); CV= Coeficiente de variação.

Fonte: Autores (2023).

**Figura 4.**

Teste de pareamento utilizando *Trichoderma harzianum* e *Colletotrichum* spp.



**Ação de metabólitos voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre *Colletotrichum***

Avaliando o IVCm observou-se que a produção de metabólitos voláteis do antagonista, *T. harzianum*, mostrou-se significativamente eficiente no controle de *Colletotrichum* spp. quando comparado com as suas respectivas testemunhas. A espécie *C. theobromicola* obteve o maior crescimento micelial (4,03 cm) em relação às demais espécies, enquanto, *C. plurivorum* foi mais sensível, com 3,21 cm (Figura 5 e Tabela 3).

Na avaliação da PIC, a espécie *C. tropicale* obteve a maior porcentagem de inibição do crescimento micelial (30,59%), diferindo estatisticamente das demais, sendo esta a mais sensível à ação de metabólitos produzidas por *T. harzianum*, seguidas por *C. plurivorum* (23,56%) e *C. brevisporum* (23,14%), que tiveram comportamento semelhante. As espécies *C. theobromicola* e *C. fructicola* obtiveram as menores PICs, como 22,41 e 19,02%, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3.**

Índice de velocidade de crescimento micelial e porcentual de inibição micelial *in vitro* de *Colletotrichum* spp. no teste de metabólitos voláteis com *Trichoderma harzianum*

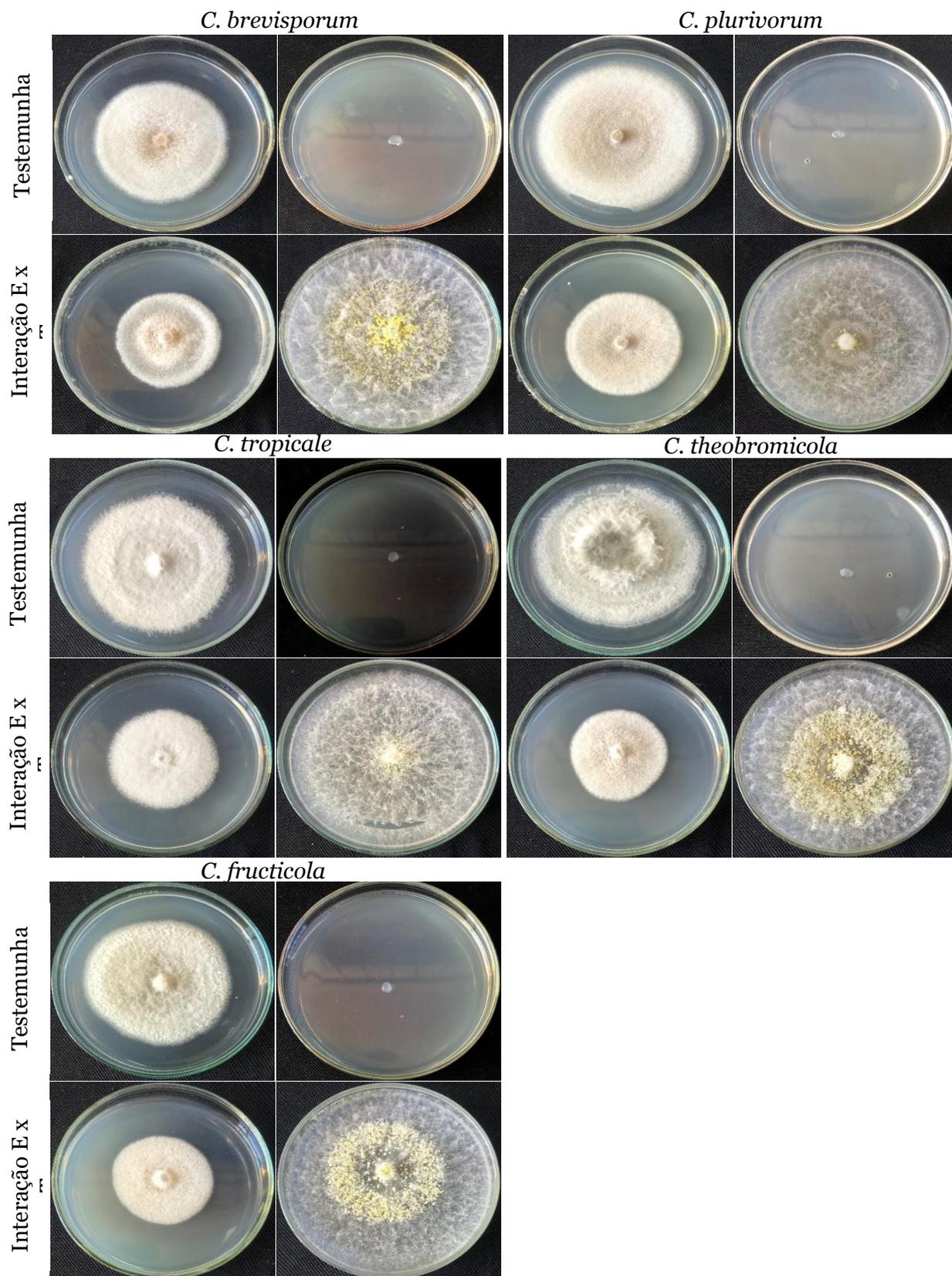
Espécies de <i>Colletotrichum</i>	IVCM (cm) ( <i>Colletotrichum</i> spp.)	IVCM (cm) (Interação E x T)	PIC (%) (Interação E x T)
<i>C. plurivorum</i>	3,73 bA	3,21 cB	23,56 ab
<i>C. fructicola</i>	3,91 bA	3,56 bcB	19,02 b
<i>C. tropicale</i>	4,72 aA	3,61 bB	30,59 a
<i>C. brevisporum</i>	4,58 aA	3,92 abB	23,14 ab
<i>C. theobromicola</i>	4,69 aA	4,03 aB	22,41 b
Espécies (E)	32.0301 **		
Tratamento (T)	120.8450 **		5.1740 **
Interação E x T	4.5004 **		
CV (%)	5,28		17,49

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. (\*\*) Significativo a 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); CV= Coeficiente de variação.

Fonte: Autores (2023).

**Figura 5.**

Teste de metabólitos voláteis utilizando *Trichoderma harzianum* no controle de *Colletotrichum* spp.



## Discussão

A busca por estratégias de manejo eficazes vem crescendo ativamente nos últimos anos, tendo como exemplo o controle biológico. Acredita-se que esse resultado seja reflexo da procura do agricultor por tecnologias para melhorar a produtividade, principalmente, no controle de fitopatógenos (Bettioli et al., 2019). Dentro do controle biológico destacam-se as espécies do gênero *Trichoderma*, que vem alavancando o manejo de doenças de plantas no Brasil (Morandi et al., 2009; Hermosa et al., 2014; Monte et al., 2019). Alguns autores relatam as vantagens do *T. harzianum*, quanto à competição por espaço e nutrientes, devido ao seu rápido crescimento micelial, no controle de fitopatógenos (Medeiros et al., 2018; Meyer et al., 2019; Quevedo et al., 2022).

Neste estudo foi observada a atividade antifúngica do produto comercial Trichodermil SC 1306/KOPPERT (*Trichoderma harzianum*) contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* spp., proveniente da doença antracnose na cultura do maracujazeiro. Observou-se que o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* e do antagonista *T. harzianum* é o mesmo com base no tempo inicial, mas não é o mesmo no final da observação quando cultivado em meio de cultura BDA. Isso mostrou que o antagonista apresenta uma vantagem no crescimento em relação às espécies de *Colletotrichum*, e acredita-se que esse fato ocorreu devido à alta capacidade do *Trichoderma* em colonizar substratos com diferentes características (Monte et al., 2019). Além disso, cepas de *Trichoderma* isoladas com potencial de biocontrole de fitopatógenos têm sido obtidas de ambientes que apresentam altas temperaturas, solos salinos ou alcalinos e sob condições de baixa umidade, com isso, se favorece a sobrevivência em ambientes com diferentes condições (Monte et al., 2019). Quevedo et al. (2022) afirmam que uma característica desejável é o antagonista apresentar crescimento micelial mais rápido que o patógeno, pois se ambos competirem por espaço e nutrientes, a tendência é do microrganismo que apresenta desenvolvimento mais rápido ter vantagem sobre o de crescimento mais lento.

No teste de pareamento observa-se, macroscopicamente, um evidente antagonismo do *T. harzianum* contra as espécies de *Colletotrichum*. Esse mecanismo deve-se, possivelmente, à competição por nutrientes e espaço presentes no meio de cultura, bem como o micoparasitismo, que apresenta uma ação direta sobre o fitopatógeno, por meio da infecção (penetração e colonização), degradação enzimática e o consumo dos nutrientes presentes nas hifas dos fungos (Suassuna et al., 2019). De acordo com Bell et al. (1982), espécies do gênero *Trichoderma* conseguem localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção, isto pode ocorrer devido a estímulos químicos produzidos pelo micélio do hospedeiro.

Nossos estudos são análogos com várias pesquisas do controle biológico de agentes patogênicos de plantas que apresentam resultados promissores para eficácia do antagonista *Trichoderma* spp. como meio de controlar fitopatógenos utilizando a técnica de confronto, como, por exemplo, no trabalho de Quevedo et al. (2022), no qual utilizaram a técnica de

pareamento de culturas para avaliar a ação antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium oxysporum*, verificando que a espécie *T. harzianum* apresentou uma porcentagem de inibição de 14,24%, ficando próximo dos resultados encontrados neste trabalho.

Os resultados obtidos por Grano-Maldonado et al. (2021) mostraram que as espécies de *C. ti* e *C. queenslandicum* apresentaram um percentual de inibição micelial em torno de 70%. Resultado semelhante foi observado por Sutarman et al. (2020) ao testar o antagonismo de *T. harzianum* em relação a *C. gloeosporioides* (65%) e *C. capsicum* (64,2%), patógenos associados a antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*). Teja et al. (2020) também testaram o potencial de *Trichoderma* spp. em relação ao *C. graminicola*, agente causal da antracnose do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e observaram que o maior percentual de inibição foi obtido pela espécie *T. harzianum*, com 50,8%. Ahmed e El-Fiki, (2017) relataram a capacidade de espécies de *Trichoderma* spp. em micoparasitar hifas de *Colletotrichum* spp., isolados de morangueiro, *in vitro*. Segundo Druzhinina et al. (2011), a eficácia na porcentagem de inibição micelial da ação do *Trichoderma* sobre os fitopatógenos depende de uma série de fatores que agem coordenadamente, dentre eles, destacam-se as espécies de *Trichoderma* e o fungo fitopatogênico.

Adicionalmente ao teste de pareamento foi utilizada a escala de notas proposta por Bell et al. (1982), em que nossos resultados corroboram com os encontrados por Quevedo et al. (2022), Morales-Mora et al. (2020) e Costa et al. (2019). Diante das respostas obtidas usando a escala de notas, o produto comercial Trichodermil SC 1306/KOPPERT apresenta potencial de biocontrole para, pelo menos, quatro espécies de *Colletotrichum*. De acordo com o fabricante, o produto apresenta modo de ação por meio da competição, parasitismo e metabólitos produzidos pelo *T. harzianum* 1306 (protease, lipase, glucanase e quitinase), que promovem degradação da parede celular de fungos (Koppert, 2023). Tijerino et al. (2011) afirmam que os metabólitos produzidos por espécies de *Trichoderma* contribuem com as enzimas degradadoras da parede celular no potencial de controle.

Estudos *in vitro* visando os metabólitos secundários das espécies de *Trichoderma* têm sido alvo de diversas pesquisas, principalmente no controle de fungos fitopatogênicos de importância econômica (Ramada et al., 2019). A metodologia utilizada em nossas pesquisas assemelha-se à dos trabalhos de alguns autores que mostram espécies de *Trichoderma* atuando diretamente na inibição do crescimento micelial do agente patogênico por ação de metabólitos, como por exemplo, Barbosa et al. (2021), que obtiveram redução no crescimento micelial de *C. musae* por meio dos metabólitos voláteis liberados por *Trichoderma*, com percentuais de inibição que variaram de 47% a 74%. Lohmann et al. (2022) testaram diferentes espécies de *Trichoderma* no controle de *C. gloeosporioides*, isolado da planta ornamental (*Cassia fistula* L.) por meio de metabólitos voláteis, e observaram que a espécie *T. harzianum*

destacou-se na inibição do crescimento micelial deste fitopatógeno e atribuem o resultado a antibiose, pois por meio dela o antagonista pode controlar a ação do patógeno, mesmo não estando em contato direto com ele.

Carvalho et al. (2014) afirmam que existe uma variabilidade de resposta na inibição dos fitopatógenos devido aos diferentes metabolitos ativos, podendo variar entre uma mesma espécie ou gêneros fúngicos. As pesquisas mostram que em maior ou menor escala, todas as espécies de *Trichoderma* são eficazes parasitas de fungos fitopatogênicos como uma estratégia de nutrição biotrófica (Druzhinina et al., 2011; Barbosa et al., 2021; Grano-Maldonado et al., 2021; Sutarman et al., 2020).

Estudos do controle biológico de agentes patogênicos de plantas apresentam resultados promissores para eficácia do antagonista como meio de controlar fitopatógenos, sendo as pesquisas *in vitro* importantes para auxiliar na seleção de agentes de biocontrole.

### Conclusão

O Trichodermil SC 1306/KOPPERT (*Trichoderma harzianum*) apresenta ação antagonista às espécies de *C. brevisporum*, *C. plurivorum*, *C. tropicale*, *C. theobromicola* e *C. fructicola*, agentes causais da antracnose do maracujazeiro.

### Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL). Agradecemos também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado. Também agradecemos a empresa KOPPERT pelo fornecimento do produto comercial Trichodermil SC 1306.

### REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira das Empresas de controle biológico. (2023). <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/panorama-e-desafios-do-controle-biologico-no-brasil-77.pdf> .
- Ahmed, M. F. A., El-Fiki, I. A. I. (2017). Effect of Biological Control of Root Rot Diseases of Strawberry Using *Trichoderma* spp. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 7(3), 482-492, 2017.
- Barbosa, G. G., Costa, F. A., Costa, A. C., Ulhoa, C. J. (2021). Evaluation of the potential of *Trichoderma* spp. native to the state of Mato Grosso do Sul against the fungus *Colletotrichum musae*. *Brazilian Journal of Development*, 7(3), 29484-29502, mar. 2021.
- Bastos, C. N. (1997). Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelise* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, 22(3), 441 - 443, 1997.
- Bell, D. K., Wells, H. D., Markham, C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal phytopathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382, 1982.

- Bettiol, W., Morandi, M. A. B., Pinto, Z. V., Paula Júnior, T. J., Corrêa, É. B., Moura, A. B., Lucon, C. M. M., Costa, J. C. B., Bezerra, J. L. (2012). Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. *Embrapa Meio Ambiente*, 155.
- Bettiol, W., Pinto, Z. V., Silva, J. C., Forner, C., Faria, M. R., Pacífico, M. G., Costa, L. S. A. S. (2019). Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. In: M. C. Meyer, S. M. Mazaro, J. C. Silva (orgs.), *Trichoderma: Uso na agricultura*. (pp. 538). Embrapa.
- Bomfim, M. P., José, A. R. S., Rebouças, T. N. H., Almeida, S. S., Souza, I. V. B., Dias, N. O. (2010). Antagonic effect *in vitro* and *in vivo* of *Trichoderma* spp. to *Rhizopus stolonifer* in yellow passion fruit. *Summa phytopathol*, 36(1), 2010.
- Carvalho, D. D. C., Junior, M. L., Martins, I., Inglis, P. W., Mello, S. C. M. (2014). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology*, 39, 384-391, 2014.
- Costa, K. K., Rufino, C. P. B., Macedo, P. E. F., Nogueira, S. R. (2019). Antagonism of *Trichoderma* spp. about *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of antracnosis of *Euterpe precatoria*. *SAJEBTT*, 6(1), 391-397, 2019.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430, 2012.
- Dennis, C., Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 359-363, 1971.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, H., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 749-759, 2011.
- Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária (2023). <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/1038/maracuja-azedo-brs-sol-do-cerrado-brs-sci#:~:text=Maracuj%C3%A1%20azedo%20BRS%20Sol%20do%20Cerrado%20%28BRS%20SC1%29,apresentando%20rendimento%20de%20polpa%20em%20torno%20de%2038%25..>
- Grano-Maldonado, M. I., Ramos-Payan, R., Rivera-Chaparro, F., Aguilar-Medina, M., Romero-Quintana, J. G., Rodríguez-Santiago, A., Nieves-Soto, M. (2021). *Fusarium* sp. Isolated from Mangrove in Mexico and the Antagonist Effect of *Trichoderma harzianum* as an Effective Biocontrol Agent. *Plant Pathol J.*, 37(5), 465-475, 2021.
- Hermosa, R., Cardoza, R. E., Rubio, M. B., Gutiérrez, S., Monte, E. (2014). Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In: V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina, M. Tuohy (orgs.). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. (pp. 125-137). Elsevier.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2022). <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>
- Koppert. (2023). <https://www.koppert.com.br/>.

- Lohmann, G. T., Rabuske, J. E., Savian, L. G., Tonetto, T. S., Muniz, M. F. B. (2022). Ação antagonística de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Biológica Catarinense*, 9(1), 25-35, 2022.
- Ministério de Agricultura, pecuária e Abastecimento. (2023). <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/Mapa-registra-recorde-de-95-defensivos-biologicos-em-2020> .
- Medeiros, F. H. V., Silva, J. C. P., Pascholati, S. F. (2018). Controle biológico de doenças de plantas. In: L. Amorim, J.A.M. Rezende, A. Bergamin Filho. (orgs.), *Manual de fitopatologia*. (pp. 573). Agronômica ceres.
- Meletti, L. M. M. 2011. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume Especial, 83-91, 2011.
- Meyer, M. C.; Mazaro, S.M.; Silva, J. C. (2019). *Trichoderma: Uso na agricultura*. Embrapa.
- Monte, E., Bettiol, W., Hermosa, R. (2019). *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: M.C. Meyer, S.M. Mazaro, J.C. Silva (orgs.), *Trichoderma: uso na agricultura*. (pp. 538). Embrapa.
- Morales-Mora, L. A., Andrade-Hoyos, P., Valência-De Itá, M. A., Romero-Arenas, O., Silva-Rojas, H. V., Contreras-Paredes, C. A. (2020). Characterization of strawberry associated fungi and *in vitro* antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*. *Rev. mex. Fitopatol*, 38(3), 2020.
- Morandi, M. A. B., Bettiol, W., Paulo Júnior, T. J. (2014). Controle biológico de doenças de plantas. In: L. Zambrolim, W.C. Jesus Júnior, F.A. Rodrigues (orgs.) *O essencial da fitopatologia: Controle de doenças de plantas*. (pp.117). UFV.
- Morandi, M. A. B., Júnior, T. J. P., Bettiol, W., Teixeira, H. (2009). Controle biológico de fungos fitopatogênicos. In: M. Venzon, T.J.P. Júnior, W. Bettiol, H. Teixeira (orgs.), *Controle biológico de pragas, doenças e plantas invasoras*. (pp. 124). Epamig.
- Oliveira, J. A. (1991). Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). [Dissertação de Mestrado em Agronomia / Fitossanidade), Universidade Federal de Lavras]
- Quevedo, A. C., Muniz, M. F. B., Savian, L. G., Sarzi, J. S., Saldanha, M. A. (2022). *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* spp. about *Fusarium oxysporum*. *Ciência Florestal*, 32(4), 2288-2303, 2022.
- Ramada, M. H., Lopes, F. A. C., Ulhoa, C. J. (2019). *Trichoderma*: metabólitos. In: M. C. Meyer, S. M. Mazaro, J. C. Silva. (orgs.) *Trichoderma: uso na agricultura*. (pp. 538). Embrapa.
- São José, A. R. Controle fitossanitário do maracujá. (2015). <https://revistacampoenegocios.com.br/controle-fitossanitario-do-maracuja/>
- Silva, F. A. S., Azevedo, C. A. V. 2016. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res*, 11(39), 3733-3740, 2016.
- Silva, J. L., Lopes, E. M. L., Silva-Cabral, J. R. A., Costa, J. F. O., Lima, G. S. A., Assunção, I. P. 2022. *Espécies de Colletotrichum associadas à antracnose em maracujazeiros no Brasil*. *Diversitas journal*, 7 (3), 2022.
- Suassuna, N. D., Silva, J. C., Bettiol, W. (2019). Uso do *Trichoderma* na cultura do algodão. In: M. C. MEYER, S. M. MAZARO, J. C. SILVA (orgs.) *Trichoderma: uso na agricultura*. (pp. 538) Embrapa.

- Sutarman, A., Miftahurrohmat, A., Nurmalasari, I. R., Prihatinnigrum, A. E. (2020). *In Vitro* Evaluation of The Inhibitory Power of *Trichoderma harzianum* Against Pathogens that Cause Anthracnose in Chili. *Journal of Physics: Conference Series*, 1764, 15-16, 2020.
- Teja, M. B. S., Mishra, J. P., Prasad, R., Sekhar, J. C., Reddy, V. P., Kumar, S., Kiranmayee, V. (2020). Isolation and *in vitro* evaluation of bio control agents against anthracnose of sorghum caused by *Colletotrichum graminicola*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(4), 2020
- Tijerino, A., Cardoza, R. E., Moraga, J., Malmierca, M. G., Vicente, F., Aleu, J., Collado, I. G., Gutiérrez, S., Monte, E., Hermosa, R. (2011). Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(3), 285-296, 2011.