

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZONIA-INPA  
MESTRADO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO – PPG-ATU**

USO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DA INCIDÊNCIA DA  
PODRIDÃO-DE-ESCLERÓCIO (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum* L.)

**ARIELTON DO NASCIMENTO CUNHA**

**MANAUS, AMAZONAS**

**AGOSTO, 2022**

**ARIELTON DO NASCIMENTO CUNHA**

USO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DA INCIDÊNCIA DA  
PODRIDÃO-DE-ESCLERÓCIO (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum* L.)

ORIENTADOR: DR. ROGÉRIO EIJI HANADA

COORIENTADORA: DRA. ROSALEE ALBUQUERQUE COELHO NETTO

Dissertação apresentada ao  
Mestrado em Agricultura no Trópico  
Úmido do Instituto Nacional de Pesquisas  
da Amazônia-Inpa como requisito para  
obtenção do título de mestre em  
Agricultura no Trópico Úmido

**MANAUS, AMAZONAS**

**AGOSTO, 2022**


## Folha de Aprovação

Banca Julgadora, abaixo assinada, **aprova** a Dissertação de Mestrado:

**Título:** Uso de *Trichoderma* spp. no controle da incidência da podridão-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

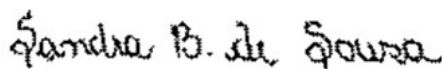
**Autor:** Arielton do Nascimento Cunha

### Banca Julgadora:

Documento assinado digitalmente  
 DANIEL FELIPE DE OLIVEIRA GENTIL  
Data: 25/07/2022 18:06:30-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

**Dr. Daniel Felipe de Oliveira Gentil (UFAM)**  
(Membro titular)



---

**Dra. Sandra Barbosa de Sousa (INPA)**  
(Membro titular)



---

**Dr. André Luís Willerding (INPA)**  
(Membro titular)

Manaus (AM), 25 de julho de 2022.

C972u Cunha, Arielton do Nascimento

Uso de *Trichoderma* spp. no controle da incidência da podridão-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii* sacc.) em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) / Arielton Do Nascimento Cunha; orientador Rogério Eiji Hanada; coorientadora Rosalee Albuquerque Coelho Netto. - Manaus:[s. 1.], 2023.

3.1 MB

44 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido – PPG-ATU) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. *Trichoderma* spp. 2. *Sclerotium rolfsii* sacc. 3. *Solanum lycopersicum* L. I. Hanada, Rogério Eiji. II. Netto, Rosalee Albuquerque Coelho. III. Título.

CDD 579.5

---

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente ao nosso grandioso Senhor Jeová, por ter me dado paciência, perseverança, capacidade e planejamento para poder finalizar o mestrado, segundo a minha esposa Leidiane da Costa Motta Cunha, por sua grande ajuda ao longo do curso, com, apoio na condução dos experimentos e força para continuar, aos meus pais Francisco Arimir e Antonia Aila Cunha pelo apoio e força, ao meu orientador Rogério Eiji Hanada e a coorientadora Rosalee Albuquerque Coelho Netto que com sua paciência e orientações me ajudaram a finalizar esse trabalho, a professora Denise Castro Lustosa, professora da Universidade Federal do Oeste do Pará- Ufopa, ao responsável técnico do laboratório de fitopatologia do Inpa, Msc. Luis Alberto Guimarães de Assis, aos técnicos José Nilton Figueiredo e Ariel Blind. Ao curso de mestrado em Agricultura no Trópico Úmido, ATU-Inpa pela oportunidade dada para realização desse trabalho. Aos Projetos Prospam/Fapeam – 2021 e Posgrad/Fapeam 2021 pelo apoio financeiro. Aos meus amigos de turma, 2019/1 e a todos que torceram pela finalização desse trabalho de mestrado.

## RESUMO

Diversos cultivos, incluindo o de hortaliças como o tomate, estão sujeitos a doenças que podem limitar sua produção. Em destaque, as causadas por fungos habitantes do solo responsáveis por perdas importantes. Espécies do gênero *Trichoderma* atuam como antagonistas e podem inibir patógenos causadores de um grande número de doenças de plantas como, por exemplo, a podridão-de-escleródio, causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle da podridão-de-escleródio em tomateiro. Foram avaliados 33 isolados de *Trichoderma* spp. isolados de diversos substratos e de diversas localizações. O isolado de *S. rolfsii* foi obtido do caule necrosado de tomateiro com sintomas característicos de podridão-de-escleródio, coletado na Estação Experimental de Hortaliças Alejo van der Pahlen, Inpa, município de Manaus-AM. Para seleção dos antagonistas com potencial de controle da podridão-de-escleródio foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo*. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamentos inteiramente casualizado. Os isolados de *Trichoderma* spp. que foram mais eficientes no controle da podridão do escleródio foram identificados a nível de espécie. Dos 33 isolados de *Trichoderma* spp. avaliados em pareamento de cultura, 25 isolados inibiram totalmente o crescimento da colônia de *S. rolfsii*, enquanto três inibiram em 66% e cinco em 33%. No primeiro experimento “*in vivo*” em casa-de-vegetação, os isolados Inpa 2473, Inpa 2951, Inpa 2957, Inpa 2959 e Inpa 2961 foram os mais eficientes no controle da doença e foram selecionados para serem avaliados novamente. No segundo experimento as plantas tratadas com os isolados Inpa 2473, Inpa 2957, Inpa 2959, apresentaram resultados estatisticamente similares a das plantas não inoculadas com o patógeno. Os cinco isolados pré-selecionados no primeiro experimento “*in vivo*” foram identificados como: *Trichoderma endophyticum* (Inpa 2473), *Trichoderma asperelloides* (Inpa 2951), *Trichoderma rugulosum* (Inpa 2957) e *Trichoderma asperellum* (Inpa 2959 e Inpa 2961), as novas sequências obtidas na análise molecular foram depositadas no GenBank. Adicionalmente, foi observado enrolamento das hifas dos isolados *Trichoderma* Inpa 2473 e Inpa 2961 nas hifas do patógeno após sete dias de cultivo, em microscópio eletrônico de varredura. Assim pode se concluir que os isolados de *Trichoderma* spp. são capazes de controlar a podridão de escleródio em tomateiro e os mecanismos de ação envolvidos podem ser micoparasitismo e/ou competição por nutrientes e por espaço.

Palavras Chave: Antagonismo, identificação de espécies, biocontrole, *Trichoderma* spp.

## ABSTRACT

Several crops, including vegetables such as tomatoes, are subject to diseases that can limit their production. In particular, those caused by soilborne fungi responsible for important losses. Species of the genus *Trichoderma* act as antagonists and can inhibit pathogen that cause disease in many species of plant, such as southern blight, caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. The objective of this work was to evaluate the potential of *Trichoderma* spp. in the control of southern blight in tomato. Thirty-three isolates of *Trichoderma* spp. isolated from different substrates and from different locations. The isolate *S. rolfsii* was obtained from the necrotic stem of a tomato plant with characteristic symptoms of southern blight, collected at the Experimental Station of Vegetables Alejo van der Pahlen, Inpa, and municipality of Manaus-AM. For the selection of antagonists with potential to control southern blight, experiments were carried out in vitro and in vivo. All experiments were carried out in completely randomized designs. *Trichoderma* spp., that were most efficient in controlling southern blight were identified at the species level. Of the 33 isolates of *Trichoderma* spp. evaluated in pairing, 25 isolates totally inhibited the growth of the *S. rolfsii* colony, while three inhibited it by 66% and five by 33%. In the first “in vivo” experiment in a greenhouse, plants treated with isolates Inpa 2473, Inpa 2951, Inpa 2957, Inpa 2959 and Inpa 2961 showed no disease symptoms and were selected to be evaluated again. In the second experiment, the incidence of the disease in plants treated with isolates Inpa 2473, Inpa 2957, Inpa 2959, presented results statistically similar to the plants of the control treatment, not inoculated with the pathogen. After making the morphological description and molecular identification, the five pre-selected isolates in the first “in vivo” experiment were identified as: *Trichoderma endophyticum* (Inpa 2473), *Trichoderma asperelloides* (Inpa 2951), *Trichoderma rugulosum* (Inpa 2957) and *Trichoderma asperellum* (Inpa 2959 and Inpa 2961)), the new sequences obtained were deposited in GenBank. In the scanning electron microscope, after seven days of cultivation of isolates Inpa 2473 and Inpa 2961 with *S. rolfsii*, curling of the hyphae of *Trichoderma* spp. in the hyphae of the pathogen. Thus, it can be concluded that the isolates of *Trichoderma* spp. are able to control southern blight in tomato and the mechanisms of action involved may be mycoparasitism and/or competition for nutrients and space.

Keywords: Antagonism, species identification, biocontrol, *Trichoderma* spp.

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	12
2	Referencial Teórico .....	13
2.1	Tomate - Aspectos Gerais .....	13
2.2	Podridão-de-escleródio.....	14
2.3	Utilização de <i>Trichoderma</i> spp. como controle biológico de doenças de plantas .....	16
3	Objetivos .....	19
3.1	Objetivo Geral .....	19
3.2	Objetivos Específicos.....	19
4	Material e Métodos.....	19
4.1	Origem dos Isolados de <i>Trichoderma</i> .....	19
4.2	Obtenção de culturas monospóricas.....	21
4.3	Obtenção do fitopatógeno <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	21
4.4	Avaliação do Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	21
4.5	Avaliação do controle da podridão-de-escleródio com <i>Trichoderma</i> spp. em tomateiro, em casa-de-vegetação.....	22
4.5.1	Produção do inóculo de <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	22
4.5.2	Produção de mudas de tomateiro .....	23
4.5.3	Produção de inóculo de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	23
4.5.4	Avaliação da incidência.....	24
4.6	Avaliação do Controle da podridão-de-escleródio com <i>Trichoderma</i> spp. em tomateiro, em casa-de-vegetação.....	24
4.7	Observação da interação de <i>Sclerotium rolfsii</i> em <i>Trichoderma</i> spp. sob microscópio eletrônico de varredura.....	24
4.8	Identificação morfológica dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	25
4.9	Identificação molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> .....	25
4.9.1	Extração de DNA.....	25
4.9.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o Sequenciamento do DNA.....	26
4.9.3	Análise Filogenética das espécies de <i>Trichoderma</i> .....	27
5	Resultados e Discussão.....	27
5.1	Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>Sclerotium rolfsii</i> em cultivo pareado.....	27
5.2	Avaliação do controle da podridão-de-escleródio, em tomateiros, em casa-de-vegetação, por <i>Trichoderma</i> spp. ....	29
5.3	Avaliação do controle da podridão-de-escleródio, em tomateiros, em casa-de-vegetação, por <i>Trichoderma</i> spp. pré-selecionados .....	31



5.4 Interação <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Trichoderma</i> spp. observada sob microscopia eletrônica de varredura.....	33
5.5 Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	34
5.5.1 Identificação Morfológica.....	34
5.5.2 Identificação molecular .....	35
6 Conclusões.....	38
7 Referências Bibliográficas.....	39

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A) Tomateiro sadio em solo infestado com *Sclerotium rolfsii* e tratado com o isolado do Inpa 2957, *Trichoderma* (B) tomateiro cultivado em solo infestado com *S. rolfsii* e tratado com isolado 1601-C, *Trichoderma*.....29
- Figura 2. Aspecto da região de confronto entre o isolado 2961 (*Trichoderma asperellum*) e 2970 (*Sclerotium rolfsii*) (A). A seta indica a hifa de *S. rolfsii* sendo parasitada pelo isolado 2473 de *Trichoderma* (B) .....33
- Figura 3: Árvore filogenética construída usando os métodos de Maximum Likelihood e análise Bayesiana com base no gene *tefl* $\alpha$  de espécies de *Trichoderma* do clado *harzianum* e seção *Trichoderma*. O número acima de cada ramificação indica o valor da porcentagem de bootstrap (ML) e valores de probabilidade a posteriori (PP). (ML/PP).....36

## INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Isolados de <i>Trichoderma spp.</i> , suas origens e locais de coleta.....	20
Tabela 2: Escala de notas para avaliação do crescimento do patógeno e do antagonista em cultura pareada segundo Bell et al, 1982, com modificações.....	22
Tabela 3: Componentes da reação de Polimerase em Cadeia (PCR), concentrações e quantidades usadas.....	26
Tabela 4: Média das notas atribuídas ao antagonismo entre <i>Trichoderma spp.</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> , agente causal da podridão-de-escleródio em cultivo <i>in vitro</i> .....	28
Tabela 5: Experimento <i>in vivo</i> - Percentual médio de plantas sobreviventes à podridão-de-escleródio em tomateiro cultivados em solo tratado com <i>Trichoderma spp.</i> , em casa-de-vegetação e média das notas de incidência.....	30
Tabela 6: Percentagem de plantas de tomateiro sobreviventes em teste <i>in vivo</i> com <i>Trichoderma spp.</i> contra podridão-de-escleródio e média das notas de incidência.....	32
Tabela 7: Características morfológicas dos cinco isolados de <i>Trichoderma spp.</i> .....	34

## 1 Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), pertencente à família das Solanaceas, é originário da América do Sul, da região dos Andes, compreendida entre o Equador, o Chile e o Peru (Alvarenga, 2004). A espécie foi introduzida no Brasil no século XIX, por imigrantes europeus (Filgueira, 2012). A cultura do tomateiro tem grande importância econômica pelo volume e valor da produção (Carvalho *et al.*, 2003). No Brasil a produção de tomate em 2020 foi de 3.753,595 t, área plantada 51.960 ha e um rendimento médio 72.240 kg ha<sup>-1</sup>, no Amazonas a produção de tomate em 2020, foi de 300 t, área plantada de 34 ha e uma produção de 8.824 Kg ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2020). Por outro lado, a cultura é acometida por inúmeras doenças entre elas a podridão-de-escleródio, causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc, habitante do solo (Soares *et al.*, 2017). A doença é favorecida por condições de alta umidade do solo onde favorece a germinação do patógeno e altas temperaturas (Amorim *et al.*, 2018).

A doença limita a produção de frutos, causando apodrecimento da base do caule, resultando na morte da planta. A doença reduz fortemente o estande de plantio e, conseqüentemente a produção, ocasionando perda significativa. A podridão-de-escleródio é observada também em outros cultivos de solanáceas cultivadas na Amazônia e nas demais regiões do país, como pimentão (*Capsicum annuum* L.), e cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) (Coelho Netto *et al.*, 2013). A podridão causada por *S. rolfsii* afeta mais de 500 espécies de plantas em cerca de 100 famílias (Ferreira e Boley, 2006). É uma doença de difícil controle devido ao longo período de sobrevivência do fungo no solo, que pode chegar a oito anos (Guerra *et al.*, 2015), ampla gama de hospedeiras e falta de controle adequado.

O controle de fitopatógenos que habitam o solo, de forma geral é difícil em virtude das suas estratégias de sobrevivência. O controle biológico com *Trichoderma* spp. tem sido bastante estudado tanto para o controle de doenças do solo, como da parte aérea, em condições de campo e em cultivo protegido, com aplicação tanto em pré como em plantio pós-colheita por patógenos habitantes do solo (Menezes e Gava, 2012). No Brasil, a produção massal e a comercialização de *Trichoderma*, iniciou em 1992, no estado do Rio Grande do Sul, com o nome de Bioagro Alam LTDA. Há no mercado, dentro do Brasil, 42 produtos registrados à base de *Trichoderma*, (Agrofit, 2022) usados nas diversas culturas e com a finalidade de não apenas ser usado como biocontroladores mas também de promover o crescimento da planta (Meyer *et al.*, 2019).

O potencial do gênero *Trichoderma* no controle de patógenos habitantes do solo nas culturas de tomate, maracujá (*Passiflora edulis* Sims), feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.)

Walp] e melancia [*Citrilus lanatus* (Thunb.) Matsum e Nakai] são registrados por diversos autores (Batista *et al.*, 2002; Tavares, 1999). Todavia, os mecanismos de ação do *Trichoderma* spp. envolvem a lise celular causada por enzimas como quitinases, proteases e glucanases, micoparasitismo, competição por recursos e espaço (Harman, 2006) indução de resistência (Yedidia *et al.*, 2003) e produção de antibióticos (Machado *et al.*, 2012). Dentro desse contexto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar isolados de *Trichoderma* spp. no controle da podridão-de-escleródio em tomateiros.

## **2 Referencial Teórico**

### **2.1 Tomate - Aspectos Gerais**

O tomateiro é uma dicotiledônea, que pertence à ordem Solanales, família Solanaceae, amplamente distribuído em todo o mundo. A família possui, aproximadamente, 85 gêneros e 1400 espécies (Dupin *et al.*, 2017). A espécie é originária de um estreito território, limitado ao norte pelo Equador, ao sul pelo norte do Chile, a oeste pelo oceano Pacífico e a leste pela cordilheira dos Andes foi introduzido na Europa pelos espanhóis nos anos entre 1523 e 1554. Inicialmente era considerada uma planta ornamental, sendo seu uso culinário retardado por temor de toxicidade (Filgueira, 2012).

A propagação do tomateiro se dá por sementes, a semeadura é feita em sementeira e o plantio definitivo ocorre quando as mudas apresentam de quatro a cinco folhas definitivas. É uma planta herbácea, com caule flexível, incapaz de suportar o peso dos frutos, no caso da produção de frutos para mesa, na qual é necessário o uso de um tutor para apoiar a planta e os frutos, mantendo-a na posição vertical. As folhas pecioladas, são compostas por número ímpar de folíolos e a floração e a frutificação ocorrem juntamente com a vegetação. Os frutos são bagas carnosas, com dois ou mais lóculos, apresentando superfície lisa ou canelada de coloração amarela e vermelha quando maduro. O ciclo biológico varia de quatro a sete meses, incluindo um a três meses de colheita. Em casa-de-vegetação, o ciclo e a colheita podem se prolongar ainda mais (Filgueira, 2012).

O tomate é a segunda hortaliça em importância econômica no Brasil, a maior parte da colheita nacional destina-se à mesa, mas boa parte da produção se destina às agroindústrias. A região Sudeste concentra a maior produção brasileira de tomate e a região Norte a menor produção. Os grandes problemas da produção de tomate na região Norte são as altas temperaturas e a umidade elevada que favorecem o aparecimento de doenças e pragas, que

tendem a reduzir a produção. Essas condições climáticas favorecem a ocorrência de doenças como podridão-de-escleródio, mancha alva [*Corynespora cassiicola* (Bert & Curt) Wei], e mosaico-do-tomateiro (Tomato Mosaic Virus) e a murcha-bacteriana [*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*,] (Lopes e Reis, 2011; Marques, 2018). Além disso, as altas temperaturas prejudicam a firmeza e a cor dos frutos, que tendem a ficar amarelados devido à inibição da síntese do licopeno e outros pigmentos que dão ao tomate a coloração vermelha (Silva e Giordano, 2000). A alta temperatura e umidade elevada prejudicam a polinização e a fertilização das flores do tomateiro e a frutificação (Filgueira, 2012).

## 2.2 Podridão-de-escleródio

*Sclerotium rolfsii* é o agente causal da podridão-de-escleródio, um fungo Basidiomycota e sua fase teleomórfica corresponde à espécie *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough (Blum e Rodriguez-Kábana, 2004). A classificação taxonômica do fungo é: reino Fungi, filo Basidiomycota, ordem, Atheliales, gênero, *Athelia*, espécie, *Athelia rolfsii* (Blancard *et al.*, 2013). É considerada um parasita facultativo, que infecta diversas espécies de plantas, comprometendo o cultivo de muitas culturas como exemplo, pimentão (*Capsicum annum* L.), alface (*Lactuca Sativa* L.), cebola (*Allium cepa* L.) entre outras, causando grandes prejuízos econômicos (Martins *et al.*, 2003). O fungo está distribuído em todas as regiões agrícolas, com prevalência em regiões tropicais e subtropicais, (Moraes e Paradela Filho, 1982). A dispersão se dá, principalmente, pelo transporte de solo infestado.

O fungo produz pequenas estruturas de resistência de 0,5 mm a 2 mm de diâmetro conhecido como escleródios (Guerra *et al.*, 2015). São de coloração marrons, que garantem a sobrevivência do fungo sob condições desfavoráveis de ambiente e, ao germinarem, originam novas hifas (Amorim *et al.*, 2018). Os escleródios são formados pela agregação de micélio, a qual é facilitada por uma lectina específica produzida pelo fungo (Inamdar *et al.*, 2012). Os escleródios permanecem viáveis no solo durante vários anos, o que dificulta o controle da doença (Singh, 2014). Entre os fatores físicos que exercem efeitos na formação dos escleródios, destaca-se a luz (Bianchini *et al.*, 2005). O fungo produz basidiocarpos (corpos frutíferos), que são lisos e brancos, eles consistem em hifas semelhantes a fitas com conexões de grampo, os basídios são em formas de clava com quatro basidiósporos lisos e elipsóides, medindo 4-7 por 3-5  $\mu\text{m}$  (Kimbrough e Tu, 1978).

Em testes realizados *in vitro*, verificou-se maior produção de escleródios e crescimento micelial de *S. rolfsii* quando o fungo é exposto a luminosidade contínua (Blum *et al.*, 2003). Diante da observação, os autores sugeriram, que a produção abundante de escleródios na superfície do solo está relacionada à presença de luz, a maior concentração de oxigênio e a questão de baixa umidade. (Kimati *et al.*, 2011), observaram que a germinação de escleródios diminui quando os mesmos se encontram mais profundos no solo e a faixa de pH ideal para germinação está entre 2,6 e 4,4, mas pode ocorrer até em pH 7,7. Em testes realizados por Marcuzzo e Schuller (2014), observaram que escleródios na superfície do solo tendem a germinar, antes dos que estão enterrados; pois nesta última condição, os escleródios permaneceram úmidos, apresentando maior período de dormência. Os mesmos autores observaram, que o fungo quando enterrado até a profundidade de 10 cm, apresentam maior capacidade de sobrevivência, possivelmente devido à estabilidade das condições ambientais.

A podridão-de-escleródio é considerada uma das doenças mais importantes da cultura do tomateiro nas condições da região Amazônica. Nas demais regiões do Brasil a doença ocorre em período chuvoso (primavera-verão), (Filgueira, 2012). Plantas afetadas murcham em consequências de necrose na região do colo. É comum observar crescimento micelial branco e escleródios pequenos marrons associados aos tecidos doentes, apesar de o fungo ser um habitante do solo, pode infectar frutos em contato com solo contaminado, também (Kurozawa e Pavan, 2005). A doença ocorre em áreas contaminadas com o fungo, no período de floração e de frutificação do tomateiro (Filgueira, 2012).

Quando ocorre a infecção do fungo na planta, a morte do tecido vegetal ocorre antes da penetração das hifas, devido à elevada produção de ácido oxálico e poligalacturonases, que atuam destruindo o tecido da hospedeira. O ácido oxálico sequestra cálcio das paredes celulares da planta para formar oxalato de cálcio e diminui o pH do tecido para otimizar a atividade da endopoligalacturonase e da celulase. Segundo (Kimati *et al.*, 2011), a infecção por este fungo é favorecida por ferimentos na planta hospedeira. As hifas crescem através do tecido da planta, tanto inter quanto intracelular, ocorrendo síntese do oxalato nas hifas. As enzimas que degradam a parede celular, em conjunto com o ácido oxálico, explicam, em parte, a extensa gama de plantas que sucumbem a infecção do fungo (Punja, 1985). O autor menciona que o padrão espacial da distribuição de inóculo de *S. rolfsii* em solos infestados é naturalmente agrupado.

Os sintomas da doença começam a surgir inicialmente na região do colo da planta, com lesões amareladas e, posteriormente, marrom-escuras e aquosas, que progridem para a raiz principal o caule, destruindo o córtex, ocorre a necrose da região afetada, encharcamento e morte dos tecidos afetados, causando a morte da planta, o sintoma observado na parte aérea é a murcha, amarelecimento, deficiência mineral, seca e morte (Blum *et al.*, 2003).

As medidas de controle vão desde adição de matéria orgânica e solarização do solo (Blum e Rodríguez-Kábana, 2004), rotação de cultura, eliminação de material infectado, maior espaçamento entre as plantas e drenagem do solo (Kimati *et al.*, 2011). Além de estratégias como tratamento químico, resistência genética, auxiliam na redução da população do patógeno, mas apresentam baixa eficiência (Souza e Blum, 2013). O uso de agentes de controle biológico, como espécies do gênero *Trichoderma* tem apresentados resultados mais eficientes no controle da doença (Antoine *et al.*, 2015).

### **2.3 Utilização de *Trichoderma* spp. como controle biológico de doenças de plantas**

O gênero *Trichoderma* é um anamórfio de *Hypocrea*, que pertence ao grupo Ascomycota, ordem Hypocreales, família Hypocreaceae (Pinheiro, 2016). Dentre os benefícios de *Trichoderma* spp. para as plantas podemos citar, promoção de crescimento vegetal, por meio de mecanismos como produção de fito hormônios, a exemplo do ácido indolacético, (Carvalho Filho *et al.*, 2008), aumento na disponibilidade de nutrientes no solo (Godes, 2007), por meio da reciclagem de nutrientes e, conseqüentemente, aumento da produtividade das culturas, além de serem utilizados na produção de enzimas e metabolitos para aplicação na indústria e na medicina (Pinheiro, 2016). Algumas espécies do gênero *Trichoderma* têm sido estudadas com relação à sua capacidade competitiva com fungos fitopatogênicos, devido à sua rápida taxa de crescimento micelial e a um antagonismo direto, envolvendo enrolamento de hifas e penetração, com secreção de antibióticos deletérios ao fungo hospedeiro (Jeffries e Young, 1994).

As espécies de *Trichoderma* desempenham um papel importante na saúde dos ecossistemas e estão adaptadas para viver em ambientes marinhos e terrestres. Colonizam a superfície do solo bem como órgão vegetais subterrâneos e crescem entre células vivas de plantas, em serapilheiras, em matéria orgânica do solo, como saprófitos e patógenos humanos, podendo inibir a síntese de proteínas de DNA e RNA e acarretam efeitos imunossupressores e hemorrágicos (Arruda e Beretta, 2019). *Trichoderma* spp. tem a capacidade de invadir e destruir outros fungos e, essa é a força motriz, por trás do sucesso comercial como biopesticida



(Mukherjee *et al.*, 2013). Esses fungos não apenas protegem as plantas matando o fungo patogênico e certos nematoides, conferem tolerância abiótica ao estresse, melhoram o crescimento e o vigor das plantas, solubilizam nutrientes vegetais e biorremediam contaminação por metais pesados poluentes nos solos (Mukherjee *et al.*, 2013). Os mecanismos específicos descritos de controle biológico foram micoparasitismo, produção de antibióticos e competição por nutrientes na rizosfera (Shoresh *et al.*, 2010).

*Trichoderma* spp. podem afetar, positivamente, a resposta da planta ao ataque de patógenos. Espécies de *Trichoderma* são capazes de induzir uma resposta mais forte na planta, em comparação à resposta desencadeada por patógenos. Linhagens efetivas de *Trichoderma* spp. produzem uma variedade de MAMPs (Padrões Moleculares Associados a Microrganismos). Além disso são capazes de neutralizar efetores de patógenos que são definidos como proteínas de virulência introduzidos nas células hospedeiras para suprimir as respostas de defesa do hospedeiro e causar a doença (Fu e Dong, 2013), mas podem desencadear resposta de defesa em função do reconhecimento por proteínas R (Proteína de resistência). Em contrapartida as plantas respondem com receptores especializados para detectar sinais de efetores, resultando na imunidade desencadeada por efetores. As espécies de *Trichoderma* são conhecidas como agente de biocontrole contra fungos fitopatogênicos, por produzirem uma variedade de quitinases, que são enzimas hidrolíticas que quebram as ligações glicosídicas da quitina, um dos principais componentes das paredes celulares dos fungos (Loc *et al.*, 2019).

A interação *Trichoderma*-planta, geralmente, se dá nas raízes, e pode ocorrer em diferentes níveis. Algumas linhagens de *Trichoderma* são capazes de colonizar apenas regiões específicas das raízes, enquanto outras espécies denominadas rizosfera-competente colonizam toda a superfície radicular e permanecem em associação com as raízes por longos períodos (Metcalf e Wilson, 2001), é nessa área que ocorre o processo de promoção de crescimento, que está relacionado com a produção de hormônios vegetais, vitaminas para a planta e permitindo uma melhor assimilação de água e nutrientes (Machado *et al.*, 2012; Pereira, 2012). Assim, fungos do gênero *Trichoderma*, podem colonizar o sistema radicular, superficial e o interior dos tecidos vegetais da planta, sem lhes causar doenças, por isso são fungos simbioses oportunistas avirulentos (Machado *et al.*, 2012).

A zona de contato *Trichoderma*-planta forma uma região de interação química, onde a planta e o fungo se comunicam por meio da troca de moléculas bioativas. Os metabolitos produzidos por *Trichoderma* spp. induzem o espessamento das paredes celulares vegetais e a

produção de compostos fenólicos, que delimitam o crescimento do fungo fitopatogênico à área de infecção, dificultando a infecção da planta (Shoresh e Harman, 2008). Há diversos relatos sobre os efeitos benéficos do uso de *Trichoderma* spp. como antagonista de *S. rolfsii*. *Trichoderma harzianum* Rifai é um inimigo natural de fungos fitopatogênicos como *R. Solani* Kuhn e *S. rolfsii* e seu uso é relatado com sucesso no controle destes fitopatógenos em campos de produção de cravo (*Caryophyllus aromaticus* L.) (Elad *et al.*, 1981).

*Trichoderma* spp. sobrevive no seu nicho, que são as raízes de plantas saudáveis, utilizando diferentes mecanismos como micoparasitismo, antibiose, competição por nutriente e espaço (Harman, 2000). (Well *et al.*, 1972), relataram que em plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e de tomate, o controle de podridão-de-escleródio (*S. rolfsii*) por *T. harzianum* chega a 100%. Em condições de solo adequadas (pH, textura e umidade) e inexistência de fatores bióticos desfavoráveis, os biocontroladores têm a capacidade de crescer e se multiplicar na rizosfera, controlando o fitopatógeno, antes mesmo deste infectar a hospedeira (Menezes *et al.*, 2004).

Em 2022 haviam registrados 42 produtos à base de espécies de *Trichoderma* no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Destes 66% dos produtos são à base de *Trichoderma harzianum*, 24% à base de *Trichoderma asperellum* 5% à base de *Trichoderma koningiopsis*, e 5% à base de *Trichoderma stromaticum*, (Agrofit, 2022). Esses produtos são usados nas diversas culturas como, soja, algodão, milho, hortaliças etc., não apenas como biocontroladores, mas também como promotores de crescimento. A importância do avanço na legislação que incentive o uso de biofungicidas, através de leis é de grande apoio para divulgação do uso desses produtos de baixa toxicidade e periculosidade (Meyer *et al.*, 2019).

A identificação morfológica de fungos filamentosos é baseada em características macroscópica e microscópica, sendo que as características microscópicas têm maior relevância para uma identificação mais precisa (Samson *et al.*, 2010). Nas características macroscópicas se levam em consideração, o diâmetro, a cor, a textura e a rugosidade da colônia. O gênero *Trichoderma* possui rápido crescimento, colônias brancas com formações tufo verdes ou amarelados. Enquanto que, as características microscópicas se levam em consideração as estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo.

Na identificação molecular ocorre a análise do DNA ribossômico (DNAr) que confere resultados com elevado índice de confiabilidade, conferindo uma vantagem em relação a

identificação morfológica. Aplica-se a análise molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cuja baseia-se na amplificação de uma região específica do DNA (Chen e Janes, 2002).

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle da podridão-de-escleródio em tomateiro, em casa-de-vegetação.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Selecionar isolados de *Trichoderma* spp. capazes de reduzir a incidência de podridão-de-escleródio em tomateiros.

Identificar os mecanismos de ação dos isolados selecionados como biocontroladores.

Identificar características morfológicas e moleculares das espécies de *Trichoderma* spp.

### **4 Material e Métodos**

#### **4.1 Origem dos Isolados de *Trichoderma***

Foram avaliados 33 isolados de *Trichoderma* spp. provenientes da coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- Inpa, Manaus-AM. Os fungos foram isolados de diversos substratos, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Isolados de *Trichoderma* spp. e locais de coleta.

<b>Isolado</b>	<b>Substrato</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Local</b>
189-B	Pé de Banana ( <i>Musa</i> spp.)	-----	Parintins-AM
1340	Cardeiro ( <i>Scleronema micranthum</i> )	2°35'20" S, 60°06'55" O	Manaus-AM
1351	Cardeiro ( <i>Scleronema micranthum</i> )	3°05'35" S, 60°26'29" O	Manaus-AM
1572-B	Solo de capoeira	-----	Manaus-AM
1599	Solo de capoeira	2°46'55" S, 60°02'14" O	Escola Rainha dos Apóstolos
1601-C	Cardeiro ( <i>Scleronema micranthum</i> )	-----	Manaus-AM
1611	Solo de capoeira	-----	Manaus-AM
2981	Solo de capoeira	-----	Viçosa-MG
2982	Solo de capoeira	-----	Santarém-PA
2983	Solo de capoeira	-----	Santarém-PA
2984	Solo de capoeira	-----	Santarém-PA
2990	Solo de capoeira	-----	Manaus-AM
2991	Solo de capoeira	-----	Manaus-AM
2114	Não identificado	-----	Patos de Minas-MG
2473	Cardeiro ( <i>Scleronema micranthum</i> )	3°05'29" S, 59°59'35" O	Manaus-AM
2478	Cardeiro ( <i>Scleronema micranthum</i> )	3°05'29" S, 59°59'35" O	Manaus-AM
2488	Cardeiro ( <i>Scleronema micranthum</i> )	3°05'29" S, 59°59'35" O	Manaus-AM
2946	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2947	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2948	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2949	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2950	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2951	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2952	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2954	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2955	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2956	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2957	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2958	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2959	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2960	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2961	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM
2962	Solo de capoeira	3°05'87" S, 59°58'40" O	Manaus-AM

## 4.2 Obtenção de culturas monospóricas

Foram preparadas as culturas monospóricas de *Trichoderma* spp., utilizando a técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento, segundo Azevedo e Costa (1983). Após as diluições dos conídios, 50 µL das suspensões  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram distribuídas, em triplicata, em placa de Petri contendo meio BDA e, após dois dias, foi selecionada uma colônia oriunda de um único conídio e, transferida para uma nova placa de Petri com meio BDA. As placas contendo as culturas puras foram mantidas em estufa BOD a 25 °C ( $\pm 2$  °C), sob fotoperíodo de 12 h até o crescimento e esporulação da colônia. Esses isolados foram armazenados em refrigeração a 5 °C em tubos de ensaios para futuros estudos.

## 4.3 Obtenção do fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*

O isolado de *S. rolfsii* (2970), foi obtido de tomateiro, com sintomas de podridão-de-escleródio, obtido na Estação Experimental de Hortaliças Dr. Alejo von der Pahlen, Inpa, km 14, na AM-010, Manaus, AM (02° 59'48" S, 60°01'22" O), pelo método de isolamento direto, segundo Severino *et al.* (2014). Os esclerócios de *S. rolfsii* foram purificados (mergulhados em álcool 70% por 1 minuto; posteriormente mergulhados em hipoclorito a 2% por 1 minuto; lavados com água destilada e esterilizada. Em seguida, secado em papel filtro e transferidos, com auxílio de um estilete, para placa de Petri contendo meio BDA, mantida em B.O.D., a 25 °C por sete dias. As placas foram armazenadas em refrigeração a 5 °C para futuros estudos.

## 4.4 Avaliação do Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Sclerotium rolfsii*

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. a *S. rolfsii* foi avaliado, utilizando o método de pareamento de culturas (Mariano,1993). A multiplicação inicial, tanto dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto do patógeno, foram realizadas em placas de Petri contendo o meio BDA, mantidas em estufas a 25 °C ( $\pm 2$  °C), com fotoperíodo de 12 h por sete dias. Discos de 5 mm de diâmetro foram retirados das culturas puras do antagonista (*Trichoderma* spp.) e do fitopatógeno (*S. rolfsii*), depositados opostamente a 1,0 cm da borda de uma placa de Petri (9 cm de diâmetro), contendo o meio BDA e mantidas nas mesmas condições descritas. Como controle, foram preparadas placas com meio BDA, contendo disco de colônia do patógeno, depositado a 1 cm da borda da placa de Petri. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento (33 isolados de *Trichoderma* e uma testemunha), sendo a unidade experimental constituída de uma placa de Petri e a testemunha somente com o

patógeno. Aos sete dias de incubação, o desenvolvimento dos isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliado de acordo com a escala proposta por (Bell *et al.*, 1982) (Tabela 2). Os dados foram submetidos a análise de variância e submetidos a teste de média de Scott - Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2: Escala de notas para avaliação do crescimento do patógeno e do antagonista em cultura pareada segundo Bell *et al.*, 1982, com modificações.

Notas	Descrição
1	Sobreposição da colônia de <i>Trichoderma</i> sp. ocupando toda a superfície do meio de cultura.
2	Sobreposição da colônia de <i>Trichoderma</i> sp., ocupando pelo menos, 2/3 da superfície do meio de cultura.
3	Sobreposição da colônia de <i>S. rolfsii</i> ocupando, ao menos, 2/3 da superfície do meio de cultura.
4	Sobreposição da colônia de <i>S. rolfsii</i> ocupando toda a superfície do meio de cultura.

#### 4.5 Avaliação do controle da podridão-de-escleródio com *Trichoderma* spp. em tomateiro, em casa-de-vegetação.

O primeiro experimento foi conduzido em casa-de-vegetação na Estação Experimental de Hortaliças Alejo van der Pahlen, Inpa, município de Manaus-AM, com os 33 isolados utilizados nos experimentos anteriores. Vasos de 5 kg de capacidade foram preenchidos com solo sob liteira autoclavado por 20 minutos (120 °C, 1 ATM), acrescido de 50 g de calcário agrícola, 100 g de adubo N, P, K, 4-14-8. Em seguida, em cada vaso foram incorporados, 30 g de arroz parboilizado colonizado com o fitopatógeno, segundo metodologia de Barbosa *et al.*, (2010). A cultivar de tomate utilizada foi Yoshimatsu L-3 resistente à murcha bacteriana. As mudas foram transplantadas nos vasos aos 40 dias após a semeadura, em cada vaso foram adicionados 100 ml de suspensão de conídios ( $6 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>) de *Trichoderma*. O solo foi infestado com auxílio de pulverizador, 48 horas após o transplante das plantas. A avaliação da incidência da podridão-de-escleródio foi efetuada uma única vez, no 35º dia após o transplante para vasos, foi observado e contado as plantas que apresentavam sinais da podridão-de-escleródio, sendo uma planta por vaso.

##### 4.5.1 Produção do inóculo de *Sclerotium rolfsii*

Para a produção do inóculo de *S. rolfsii*, foram utilizados 5 kg de arroz parboilizado embebidos em três litros de água destilada. Porções de 30 g de arroz foram esterilizadas em autoclave, por 20 min a 120 °C, em sacos de polipropileno (25 x 18 cm, espessura de 10 µm).

Para fechamento dos sacos e manutenção da aeração do cultivo, utilizou-se um anel de cano PVC (40 mm de largura x 38,1 mm de diâmetro) preso com uma liga de borracha na boca do saco e um tampão de algodão fechando a entrada do tubo. Após o resfriamento do arroz, cinco discos de 5 mm de diâmetro de colônia de *S. rolfsii*, cultivada por dez dias em meio BDA, foram transferidos para cada saco de polipropileno contendo arroz autoclavado. Os sacos foram mantidos sob temperatura de 25 °C ( $\pm 2$  °C), em fotoperíodo de 12 h, com o conteúdo sendo revolvido diariamente para uniformização do crescimento fúngico, até que os grãos estivessem totalmente colonizados, o que ocorreu ao 14º dia de cultivo. Em seguida, os inóculos dos diferentes sacos de 30 g de arroz foram utilizados para infestação do substrato de cada vaso. Os procedimentos aplicados se basearam nas metodologias mencionadas por Barbosa *et al.* (2010) e Coelho Netto *et al.* (2013).

#### **4.5.2 Produção de mudas de tomateiro**

Foram produzidas mudas da cultivar de tomate Yoshimatsu L-3, resistente à murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, em viveiro na estação Experimental de Hortaliças Alejo van der Pahlen, Inpa, município de Manaus-AM. Na semeadura, realizado no dia 23 de outubro de 2020, utilizou-se bandeja de poliestireno com 96 células contendo substrato comercial (Tropstrato HA Hortaliças, Vida Verde, Mogi Mirim-SP). Em cada célula foram colocadas três sementes. As bandejas foram mantidas em estufa com irrigação por aspersão, automática, duas vezes por dia, por quinze minutos, às 08:00 e às 16:00, por dez dias seguidos. Após esse período as mudas foram transferidas para copos plásticos com volume de 180 mL, utilizando o mesmo substrato comercial, misturado com terra de liteira peneirada, com furos no fundo para drenagem, mantidas até o período do transplante nos vasos.

#### **4.5.3 Produção de inóculo de isolados de *Trichoderma* spp.**

Utilizaram-se os 33 isolados de *Trichoderma* spp., já avaliados *in vitro* com relação ao antagonismo a *S. rolfsii* (Tabela 1). Cada isolado de *Trichoderma* spp. foi cultivado em três placas de Petri contendo meio BDA, durante dez dias. Em seguida, foram preparadas suspensões de conídios adicionando-se água destilada esterilizada às placas, raspando a superfície das culturas com lâminas de microscopia e filtrando-as em camada dupla de gaze. As concentrações das suspensões de conídios foram ajustadas para  $6 \times 10^7$  conídio mL<sup>-1</sup> com auxílio de câmara de Neubauer.

Para cada vaso foi vertida sobre solo, 100 mL da suspensão de conídios, após 48 horas, da aplicação de 30 gramas de arroz colonizado pelo patógeno. Duas testemunhas foram incluídas; uma com infestação do solo somente com *S. rolfsii* e a outra testemunha sem infestação do solo com *Trichoderma* e *S. rolfsii*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 35 tratamentos (33 isolados e duas testemunhas), com três repetições por tratamento, sendo cada vaso, com um tomateiro, uma unidade experimental.

#### **4.5.4 Avaliação da incidência**

A avaliação da incidência da podridão-de-escleródio foi efetuada uma única vez, no 35º quinto dia após o transplante. A avaliação foi obtida pela contagem de plantas que apresentaram sintomas típicos da podridão-de-escleródio, como murchamento das plantas e anelamento do caule, a avaliação dos sintomas foi feita através de análise visual, planta por planta e os valores foram expressos em porcentagem que foram usados para gerar as análises estatísticas, onde os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as medias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

#### **4.6 Avaliação do controle da podridão-de-escleródio com *Trichoderma* spp. em tomateiro, em casa-de-vegetação.**

A partir dos resultados desse experimento foi conduzido o segundo experimento com os cinco isolados que estatisticamente foram os que mais reduziram a incidência da doença. Os procedimentos da instalação e avaliação da incidência foram semelhantes ao experimento anterior. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 15 plantas para cada tratamento, sendo cada planta uma unidade experimental, onde os dados obtidos foram submetidos à análise variância e as medias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

#### **4.7 Observação da interação de *Sclerotium rolfsii* e *Trichoderma* spp. sob microscópio eletrônico de varredura**

A área de confronto das culturas de *S. rolfsii* com os cinco isolados de *Trichoderma* spp. (Inpa 2473, Inpa 2951, Inpa 2957, Inpa 2959, Inpa 2961) em meio de cultura BDA, onde cada colônia foi disposta nas extremidades da placa e que apresentaram melhor controle da podridão-de-escleródio, no experimento em casa-de-vegetação, foi observada, sob microscópio



eletrônico de varredura (MEV) no Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia do Inpa. Discos de BDA (5 mm) da área de confronto de colônias pareadas aos cinco dias de cultivo, foram submetidos ao procedimento descrito por Souza (2007): fixação com solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio (100  $\mu$ M, pH 7,2), lavagem com tampão cacodilato de sódio (100  $\mu$ M, pH 7,2), por três vezes, 10 minutos cada lavagem, desidratadas com etanol a 50%, 70%, 95%, 100% (2x) durante, 10 minutos, secas em secador de ponto crítico de CO<sub>2</sub> (CPD030, Bel-Tec, Liechtenstein) e metalizadas com eletrodepositor de ouro (SPD050, Bel-Tec, Liechtenstein). Cinco amostras foram visualizadas e fotografadas sob microscópio eletrônico (Vega3, Tescan - República Tcheca), com o detector de elétron secundário.

#### **4.8 Identificação morfológica dos isolados de *Trichoderma* spp.**

Foram feitas observações, sob microscópio estereoscópico (Carl Zeiss), do aspecto das colônias dos isolados Inpa 2473, Inpa 2951, Inpa 2957, Inpa 2959, Inpa 2961, cultivadas em meio BDA por sete dias a 25 °C ( $\pm$  2 °C), em fotoperíodo de 12 h, observando-se coloração da superfície frente e verso das colônias, aspecto do micélio e diâmetro da colônia. Em lâminas semipermanentes, sob microscópio luz (Carl Zeiss), na objetiva de 40x, coradas com azul de algodão e lactofenol (Bettiol *et al.*, 2013), foram realizadas medições das estruturas (conídios, fiálides e conidióforos) com trinta repetições de cada, em campos selecionados aleatoriamente. Usou-se o programa Zen 2.5 Lite (Zeiss) em microscópio de luz para o auxílio das medições. As médias das dimensões das estruturas foram comparadas com as descritas nas literaturas especializadas (Rifai, 1969; Samuels, 1996).

#### **4.9 Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma***

##### **4.9.1 Extração de DNA**

O DNA foi extraído seguindo o método CTAB Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio (CTAB), (Doyle e Doyle, 1987). Foram preparadas culturas monospóricas de cada isolado e, após o crescimento das colônias em meio BDA foi realizada a repicagem, onde 10 discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro dos isolados foram transferidos para Erlemeyer contendo 50 ml de meio líquido (Batata-Dextrose), mantido por agitação 125 RPM a (25  $\pm$  2 °C) por três dias, após esse período o micélio foi filtrado em papel filtro esterilizado e usado na extração do DNA genômico. Após a maceração feita em almofariz, com nitrogênio líquido, foram adicionados 700  $\mu$ L do tampão de extração CTAB. Em seguida, os tubos foram mantidos em banho maria,

a 65 °C, por 30 minutos, agitando a cada 10 min. Adicionaram-se 700 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) foi misturado gentilmente. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm, durante 5 minutos, e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Foram adicionados 2/3 do volume total recuperado, centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos e lavado duas vezes com álcool etílico P.A. 70% e uma vez com álcool etílico absoluto P.A. O pélete foi seco por 5 min, em temperatura ambiente e eluído em 50 µL de tampão TE (Tris-HCL 1M e EDTA 0,5M) mais 10 µg mL<sup>-1</sup> de RNase A e os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C, por 30 min.

A quantidade e qualidade do DNA obtido foi realizada em gel de agarose 0,8% e DNA lambda nas concentrações de 25,50 e 100 ng mL<sup>-1</sup>, corado com brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador L-Pix Chemi (Loccus).

#### 4.9.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o Sequenciamento do DNA

As reações de PCR foram realizadas conforme descrito na tabela 3, usando os primers *tef1α* aR (5`GGARGTACCAGTSATCATGTT3`) e *tef1α* aF (ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3`) que amplifica uma porção parcial do gene que codifica o fator de alongamento da transcrição (*tef1*). Para a amplificação foi utilizada um termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Massachusetts, EUA) nas seguintes condições: desnaturação: 1 Ciclo 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 seg. anelamento a 57 °C por 45 seg; extensão a 72 °C a 1:30 minuto, 1 ciclo com 10 min. de extensão final a 72 °C e 10 °C.

O produto da PCR, foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (10 mg ml<sup>-1</sup>) e visualizado em Fotodocumentador L-Pix Chemi (Loccus).

Tabela 3: Componentes da reação de Polimerase em Cadeia (PCR), concentrações e quantidades usadas.

Componentes	Concentração	Volumes
Água	-	17,25µL
Tampão MgCl <sub>2</sub>	10X	2,5µL
dNTP	10 mM	1 µL
Prime F	5 pmol	1 µL
Prime R	5 pmol	1 µL
Taq Polimerase	5U µL <sup>-1</sup>	0,25 µL
DNA	50 ng µL <sup>-1</sup>	2 µL
<b>Total</b>		<b>25 µL</b>

O sequenciamento foi realizado no equipamento 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), seguindo o protocolo descrito por Grover e Sharma (2014).

### 4.9.3 Análise Filogenética das espécies de *Trichoderma*

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA 7 para a formação consenso das sequências, posterior alinhamento e a geração da árvore filogenética baseada nos modelos de Maximum Likelihood e Neighbour-Joining (Edward e Carvalli-Sforza, 1965).

As sequências consenso foram obtidas com base no alinhamento das sequências forward e reverse usando o software (DNA baser, 2021). As novas sequências obtidas foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih>) sob os números de acesso: Inpa 2959 (MZ673385), Inpa 2961 (MZ673386), Inpa 2957 (MZ673387), Inpa 2473 (MZ673388), Inpa 2951 (MZ673389). A identificação filogenética dos cinco isolados, foi realizada utilizando uma coleção de 20 isolados de *Trichoderma* spp. da seção *Trichoderma* e 25 isolados do clado *Harzianum*.

As sequências foram alinhadas individualmente com a ferramenta MAFFT no software Ugene (Okonechnikov *et al.*, 2012). Os alinhamentos foram plotados no software Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016) e as análises filogenéticas foram conduzidas usando sequências do gene *tef1*, usando inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML). A análise ML incluiu 1000 replicatas (bootstrap) usando todos os sites, modelo estatístico GTR (General Time Reversible) e distribuição gamma discreta com quatro categorias. A inferência bayesiana foi baseada no modelo adotado no Paup\* 4 e MrModeltest v2 (Nylander, 2004). Todos os sites nos loci foram considerados, a análise foi executada por dez milhões de gerações, com os primeiros 25% das árvores descartadas usando a ferramenta MrBayes v 3.7 disponível no (Cipres, 2021) (<https://www.phylo.org/>). A probabilidade posteriori (PP) e a topologia da árvore foram visualizadas com o Figtree v 1.1.2 (Rambaut, 2009). A árvore consenso das análises de ML e BI foi gerada manualmente a partir da topologia obtida pelo Mega 7 derivada da análise de ML com os valores de bootstrap, acrescida dos valores de probabilidade a posteriori gerado pela análise bayesiana, utilizando o pacote de edição CorelDraw.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Sclerotium rolfsii* em cultivo pareado

De acordo com as avaliações, em cultivo pareado, dos 33 isolados de *Trichoderma* spp. avaliados, dois isolados sobrepuseram totalmente a colônia de *S. rolfsii*, 9 isolados obtiveram

nota entre 1,3 e 1,6 e foram estatisticamente iguais, 22 isolados obtiveram notas entre 2,0 e 2,6, que foi estatisticamente igual a testemunha (Tabela 4).

Tabela 4: Média das notas atribuídas ao antagonismo entre *Trichoderma* spp. e *Sclerotium rolfsii*, agente causal da podridão-de-escleródio em cultivo *in vitro*.

*Tratamentos	Isolados	Média das Notas
T1	1601-C	1,0 a
T2	2950	1,0 a
T3	2947	1,3 b
T4	2948	1,6 b
T5	2958	1,6 b
T6	2952	1,6 b
T7	2982	1,6 b
T8	2114	1,6 b
T9	2946	1,6 b
T10	2991	1,6 b
T11	2983	1,6 b
T12	1340	2,0 c
T13	2984	2,0 c
T14	2478	2,0 c
T15	2961	2,0 c
T16	2949	2,0 c
T17	2955	2,0 c
T18	1572-B	2,3 c
T19	2956	2,3 c
T20	2990	2,3 c
T21	189-B	2,3 c
T22	2473	2,3 c
T23	2488	2,3 c
T24	2954	2,3 c
T25	1599	2,3 c
T26	2960	2,3 c
T27	2981	2,3 c
T28	1611	2,6 c
T29	1351	2,6 c
T30	2957	2,6 c
T31	2959	2,6 c
T32	2951	2,6 c
T33	2962	2,6 c
T34	2970	4,0 c
CV (%)		9,43

\*Tratamentos: Testemunha 34 testemunhas (somente com *S. rolfsii*); T1 a T33 (Isolados de *Trichoderma* spp.); CV (Coeficiente de variância). Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% probabilidade.

Segundo (Bosah *et al.*, 2010), o teste de cultura pareada possui grande valor na avaliação do potencial de controle biológico do fitopatógeno, pois o bom desempenho neste teste sugere que o isolado avaliado seja efetivo quanto à rápida colonização das estruturas do patógeno. Os

mecanismos de ação avaliados no teste de cultura pareada, como rápida colonização de um patógeno do solo, podem variar entre isolados da mesma espécie. Este tipo de teste avalia o potencial do isolado para exercer hiperparasitismo e principalmente competição por espaço e nutrientes. Os isolados, Inpa 2950, Inpa 1601-C, se mostraram mais eficientes na inibição *in vitro*, do crescimento da colônia de *S. rolfsii* apresentando média de nota igual a 1, segundo escala de (Bell *et al.*, 1982).

## 5.2 Avaliação do controle da podridão-de-escleródio, em tomateiros, em casa-de-vegetação, por *Trichoderma* spp.

Na avaliação de 33 isolados de *Trichoderma* spp. no experimento *in vivo*, no controle da podridão-de-escleródio, as plantas foram avaliadas quanto a incidência da doença. A incidência é uma variável satisfatória para avaliar a intensidade de doenças sistêmicas como murchas, pois a correlação é alta entre a incidência e severidade, pelo fato de afetar a planta toda (Amorim *et al.*, 2018). A diferença entre a planta com sintomas da doença e as sem sintomas foi evidente (Figura 1).



Figura 1. (A) Tomateiro sadio em solo infestado com *Sclerotium rolfsii* e tratado com o isolado Inpa 2957, *Trichoderma* e (B) tomateiro cultivado em solo infestado com *S. rolfsii* e tratado com o isolado 1601-C, *Trichoderma*.

Quinze dos isolados não controlaram a doença e, três dos isolados controlaram 33% a doença nas plantas tratadas e 66% das plantas apresentaram sintomas da doença, dez isolados controlam 66% da doença nas plantas tratadas e 33% apresentaram sintomas, cinco isolados

controlaram 100% a doença nas plantas que receberam o tratamento, não apresentando nenhum sintoma da doença, estes foram selecionados para o segundo experimento *in vivo*. Em média, 15% dos isolados do total de 33 isolados avaliados, controlaram 100% a doença nas três repetições (Tabela 5).

Tabela 5: Experimento *in vivo* – Percentual médio de plantas sobreviventes à podridão-de-escleródio em tomateiro cultivados em solo tratado com *Trichoderma* spp., em casa-de-vegetação e média das notas de incidência.

* Tratamentos	Isolados	Porcentagem de Incidência da doença
T1	2473	0
T2	2951	0
T3	2957	0
T4	2961	0
T5	2959	0
T6	1351	33
T7	2960	33
T8	2947	33
T9	1611	66
T10	2958	66
T11	1599	66
T12	2984	66
T13	2488	66
T14	2990	66
T15	2946	66
T16	2956	66
T17	2114	66
T18	2952	66
T19	2478	100
T20	2954	100
T21	1601-C	100
T22	2955	100
T23	1340	100
T24	2962	100
T25	2981	100
T26	2948	100
T28	2949	100
T29	2982	100
T30	1572-B	100
T31	2991	100
T32	2983	100
T33	2950	100
T34	-	0
T35	2970	100
CV (%)	-	5,04

\*Tratamentos: Testemunhas 34 (Sem *S. rolfsii*) e 35 (com *S. rolfsii*); T1 a T33 (Isolados de *Trichoderma* spp.). Médias iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade

Em trabalho semelhante, (Ávila *et al.*, 2005), observaram que isolados de *Trichoderma* spp. Mostraram capacidade de controlar a podridão-de-escleródio em culturas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* L.) em casa-de-vegetação, a taxa de redução variou de 75% a 100%. (Ferreira *et al.*, 2009), observaram que a mortalidade de plantas inoculadas com *S. rolfsii* e tratadas com isolados de *Trichoderma* spp., foi de apenas de 25% e plantas inoculadas com *S. rolfsii*, a mortalidade foi de 90% (Dania e Henry, 2022), mostraram a eficiência de *Trichoderma* contra *S. rolfsii* em cultura de feijão-caupi, se observou que *T. atroviride* Rifai e *T. virens*, estimularam o crescimento e rendimento da cultura e reduziram significativamente a incidência e gravidade da podridão do caule e da raiz. Resultados semelhantes foram obtidos no experimento desse trabalho, em casa-de-vegetação.

O efeito inibitório de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *S. rolfsii* em condições de casa-de-vegetação, também, é documentado por (Auler *et al.*, 2013), que observaram em experimento em casa-de-vegetação, com cultura de feijoeiro, que os tratamentos com *Trichoderma harzianum* Rifai foram similares ao controle, cujo solo não foi infestado com patógeno, apresentando valores médios elevados ( $\geq 83\%$ ) de porcentagem de plantas saudas, aos 15 dias de semeio. Em trabalho, similar (Adandonon *et al.*, 2006), verificaram que adicionando formulações de *Trichoderma* sp., em solo artificialmente infestado por *S. rolfsii*, em casa-de-vegetação, apenas 21% de plantas de feijão caupi foram atacadas pelo patógeno 30 dias após o plantio. Os autores especulam que o tipo de aplicação (tratamento de substrato ou das sementes) pode afetar a eficácia do agente de biocontrole. O sucesso do controle biológico com *Trichoderma* spp. depende de fatores como temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração, pH e teor de matéria orgânica os quais influenciam na sobrevivência de *Trichoderma* spp. no solo ou substrato (Howell, 2003).

### **5.3 Avaliação do controle da podridão-de-escleródio, em tomateiros, em casa-de-vegetação, por *Trichoderma* spp. pré-selecionados**

Os cinco isolados antagonistas avaliados foram similares no controle da podridão-de-escleródio e a incidência da doença não apresentou diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados confirmaram os resultados obtidos no primeiro teste. Os isolados Inpa 2473, Inpa 2957, Inpa 2959, a incidência da doença foi completamente inibida (Tabela 6).

Tabela 6. Percentagem de plantas de tomateiro sobreviventes em teste *in vivo* com *Trichoderma* spp. contra podridão-de-escleródio e média das notas de incidência.

* Tratamentos	Isolados	Porcentagem de Incidência da doença
T1	Inpa 2473	0 a
T2	Inpa 2957	0 a
T3	Inpa 2959	0 a
T4	Inpa 2951	6 a
T5	Inpa 2961	13 a
Testemunha com <i>S. rolfsii</i>	-	100 b
Testemunha sem <i>S. rolfsii</i>	-	0 a
CV (%)		9,14

Médias seguidas por mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \geq 0,05$ ).

O controle da doença confirma a eficácia dos isolados selecionados de *Trichoderma* spp. Os isolados, Inpa 2473, Inpa 2957, Inpa 2959 controlaram em 100% a incidência da podridão-de-escleródio, e as plantas não apresentaram sintomas da doença. Com o isolado Inpa 2951, obteve-se 94% de controle e com o isolado Inpa 2961, obteve-se 87% de controle sobre a doença. Na repetição do teste de controle da podridão-de-escleródio, as plantas tratadas com os isolados Inpa 2473, Inpa 2957, Inpa 2959 não apresentaram sintomas da doença da podridão-de-escleródio. Assim, o uso de *Trichoderma* spp. mostrou ser uma ferramenta importante para controlar a podridão-de-escleródio em tomateiro, obtendo-se o controle da doença.

Em trabalhos parecidos, (Reyes *et al.*, 2002), conseguiram 100% de controle da podridão-de-escleródio nos tomateiros com *T. harzianum*. Aplicações de *Trichoderma* spp. no solo e nas sementes, garantiram a proteção dos tomateiros planta, (Tsayouridou e Thanassouloupoulos, 2002), conseguiram resultados semelhantes, onde tratando semente de tomate com *Trichoderma*, por até dois meses, conseguiram proteger as sementes e as mudas de tomateiro do patógeno. (Mello *et al.*, 2007), com soja cultivada em casa-de-vegetação, também conseguiram observar o controle da podridão-de-escleródio com o tratamento com *Trichoderma* spp. No solo tratado com isolados de *Trichoderma*, observou-se redução da doença e promoção de germinação de sementes e sobrevivência de plantas em 32% a 100% respectivamente. (Gomes *et al.*, 2005), em trabalho com 20 isolados de *Trichoderma* spp., visando o controle da podridão-de-escleródio em soja, em casa-de-vegetação, verificaram controle da doença acima de 79% de redução da incidência da doença. (Loc *et al.*, 2019), observaram que *T. asperellum* inibiu significativamente a incidência da doença em amendoim, eles observaram que sementes pré-tratadas com quitinase tiveram uma taxa muito baixa de infecção fúngica em comparação ao controle, antes e 30 dias após a germinação. Os autores observaram também a eficiência de *T. asperellum* para prevenir contra antracnose causada por *Colletotrichum* sp. em manga (*Mangifera indica* L.) e pimenta (*Capsicum* spp.). (Sousa, 2012)



observou que o tratamento com *T. harzianum* em solo com *S. rolfsii*, a incidência do patógeno foi reduzida em 23,3%, no experimento com cebola (*Allium cepa* L.). Nesse trabalho foram selecionados cinco isolados de *Trichoderma* spp. com potencial no biocontrole da podridão-de-escleródio em tomateiro sob casa-de-vegetação. É importante realizar um estudo em condições do campo para testar o comportamento destes isolados na eficiência no controle da doença.

#### 5.4 Interação *Sclerotium rolfsii* e *Trichoderma* spp. observada sob microscopia eletrônica de varredura.

Nas observações sob microscópio eletrônico de varredura (MEV) da área de confronto de cinco isolados de *Trichoderma* spp. com o fitopatógeno *S. rolfsii* observou-se competição entre os microrganismos. Ao MEV foi observado após sete dias, enrolamento das hifas de *Trichoderma* spp., deformação das hifas do patógeno. Comprova o hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfsii*.

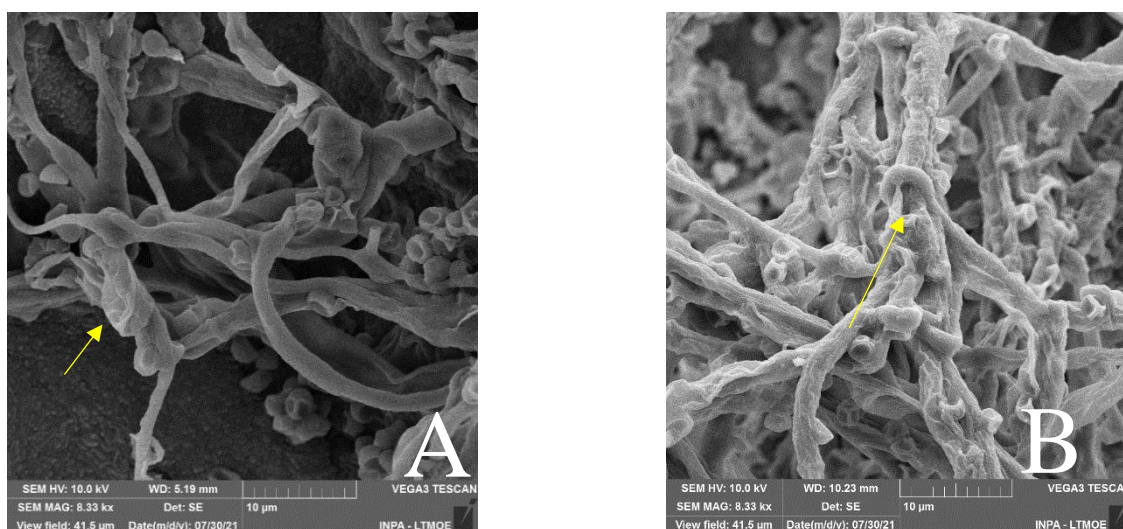


Figura 2. Aspecto da região de confronto entre o isolado 2961 (*Trichoderma asperellum*) e Inpa 2970 (*Sclerotium rolfsii*) (A). A seta indica a hifa de *S. rolfsii* sendo parasitada pelo isolado Inpa 2473 de *Trichoderma* (B).

(Reis, 2014), observou também em microscopia eletrônica a interação entre *Trichoderma* e *Sclerotium rolfsii*, onde foi observado penetração e colonização do fitopatógeno, o mesmo observou entrelaçamento e deformação de hifas de *Sclerotium rolfsii* por *Trichoderma* spp. (Perello *et al.*, 2003), observou que mais de um mecanismo pode estar simultaneamente envolvido nessas ações antagônicas. O enrolamento e estrangulamento das hifas do patógeno podem promover a destruição da parede celular, seguindo-se a liberação de nutrientes a partir de células mortas (Melo, 1998). (Elad *et al.*, 1982), já constataram a produção de enzimas degradadoras de paredes, como quitinases e celulases, como modo de ação de *Trichoderma* spp. contra fungos fitopatogênicos.

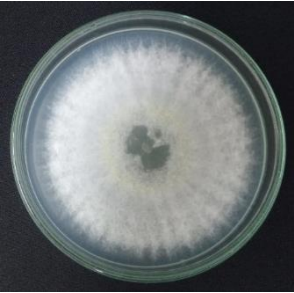

Nas observações feitas por microscopia eletrônica, neste trabalho, foi observado o hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfsii*, resultados semelhantes com os trabalhos citados acima.

## 5.5 Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

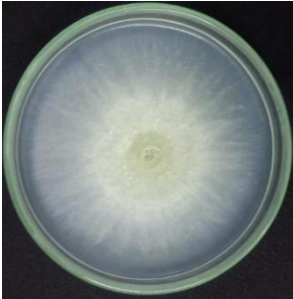
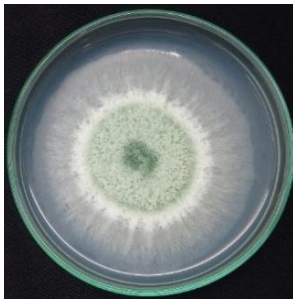
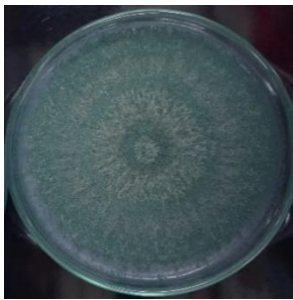
### 5.5.1 Identificação Morfológica

Os resultados das observações morfológicas das colônias de *Trichoderma* spp., dos isolados Inpa 2473, Inpa 2951, Inpa 2957, Inpa 2959, Inpa 2961, cultivados em meio BDA, estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7: Características morfológicas dos cinco isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados	Aspecto da Colônia	Descrição
Inpa 2473		<i>Trichoderma endophyticum</i> F.B. Rocha, Samuels & P. Chaverri, apresentou colônia de crescimento rápido, 7 cm de diâmetro aos cinco dias, micélio aéreo cotonoso, ausência de zonação, cores: amarelo a branco, com reverso amarelo, largura do conídio entre 0,817 $\mu\text{m}$ - 1,757 $\mu\text{m}$ , média 1,287 $\mu\text{m}$ , comprimento dos conidióforos entre 7,655 $\mu\text{m}$ - 150,150 $\mu\text{m}$ , média 78,902 $\mu\text{m}$ , largura entre 0,357 $\mu\text{m}$ - 2,774 $\mu\text{m}$ , média 1,565 $\mu\text{m}$ , presença de fiálides 4,05 $\mu\text{m}$ - 18,15 $\mu\text{m}$ x 0,84 $\mu\text{m}$ - 8,8 $\mu\text{m}$ septos dos conidióforos entre 0 - 1.
Inpa 2951		<i>Trichoderma asperelloides</i> , Samuels, Lieckf & Nirenberg apresentou colônia de crescimento rápido, 5 cm de diâmetro aos cinco dias, largura do conídio entre 1,457-2,075 $\mu\text{m}$ , média 1,766, comprimento dos conidióforos entre 11,549 $\mu\text{m}$ - 107,806 $\mu\text{m}$ , média de 59,677 $\mu\text{m}$ , largura entre 0,468 $\mu\text{m}$ - 2,604 $\mu\text{m}$ , média de 1,536 $\mu\text{m}$ , presença de fiálides 2,73 $\mu\text{m}$ - 3,56 $\mu\text{m}$ x 0,86 $\mu\text{m}$ - 1,07 $\mu\text{m}$ septos dos conidióforos entre 0 - 2.

Continuação: Tabela 7: Características morfológicas dos cinco isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados	Aspecto da Colônia	Descrição
Inpa 2957		<i>Trichoderma rugulosum</i> M.S. Park,S-Y. Oh & Y.W. Lin apresentou colônia de crescimento rápido, 9 cm de diâmetro aos cinco dias, micélio aéreo cotonoso, flocos verdes no centro da placa e branco na periferia, cores da colônia: branco a verde, cor do reverso: branco, largura do conídio entre 0,916 $\mu\text{m}$ - 2,79 $\mu\text{m}$ , média 2,31 $\mu\text{m}$ , comprimento dos conidióforos entre 15,009 $\mu\text{m}$ - 55,429 $\mu\text{m}$ , média 35,219 $\mu\text{m}$ , largura entre 0,672 $\mu\text{m}$ e 3,037 $\mu\text{m}$ , média 2,19 $\mu\text{m}$ , presença de fiálides 2,73 $\mu\text{m}$ - 3,58 $\mu\text{m}$ x 0,88 $\mu\text{m}$ - 1,09 $\mu\text{m}$ , septos dos conidióforos entre 0 - 2.
Inpa 2959		<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf & Nirenberg apresentou colônia de crescimento rápido, 8 cm de diâmetro aos cinco dias, micélio aéreo cotonoso, verde no centro da placa e branco na periferia, cores da colônia: branco a verde, cor do reverso, branco, largura dos conídios entre 0,555 $\mu\text{m}$ - 1,622 $\mu\text{m}$ , média, 1,366 $\mu\text{m}$ , comprimento do conidióforos entre 18,361 $\mu\text{m}$ - 118,620 $\mu\text{m}$ , média 68,49 $\mu\text{m}$ , largura entre 1,093 $\mu\text{m}$ - 2,805 $\mu\text{m}$ média, 2,49 $\mu\text{m}$ , presença de fiálides 2,54 $\mu\text{m}$ - 3,84 $\mu\text{m}$ x 0,83 $\mu\text{m}$ - 1,20 $\mu\text{m}$ septos dos conidióforos entre 0 - 3.
Inpa 2961		<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf & Nirenberg apresentou colônia de crescimento rápido, 8 cm de diâmetro aos cinco dias, micélio aéreo cotonoso, verde no centro da placa e branco na periferia, cores da colônia: branco a verde, cor do reverso, branco, largura dos conídios entre 0,770 $\mu\text{m}$ - 1,993 $\mu\text{m}$ média 1,76 $\mu\text{m}$ , comprimento dos conidióforos entre 10,821 $\mu\text{m}$ - 103,242 $\mu\text{m}$ , média de 62,442 $\mu\text{m}$ , largura 1,465 $\mu\text{m}$ - 2,644 $\mu\text{m}$ , média 2,78 $\mu\text{m}$ , presença de fiálides 3,15 $\mu\text{m}$ - 4,8 $\mu\text{m}$ x 0,89 $\mu\text{m}$ - 1,25 $\mu\text{m}$ septos dos conidióforos entre 0 - 4.

### 5.5.2 Identificação molecular

O alinhamento resultou em 718 caracteres encontrados, incluindo *gaps*. O modelo evolutivo mais adequado para explicar a inferência Bayesiana foi GTR+G (*General time reversible + gamma*) para *tefl $\alpha$* . Os cinco isolados estudados neste trabalho pertencem a quatro espécies de *Trichoderma*, sendo os isolados Inpa 2473 e Inpa 2957 pertencentes às espécies *T. endophyticum* e *T. rugulosum* (clado *Harzianum*), respectivamente. Os isolados Inpa 2951, Inpa

2959 e Inpa 2961 se agruparam com espécies da seção *Trichoderma*, sendo o isolado Inpa 2951 identificado como *T. asperelloides* e Inpa 2959 e Inpa 2961 identificados como *T. asperellum* (Figura 3).

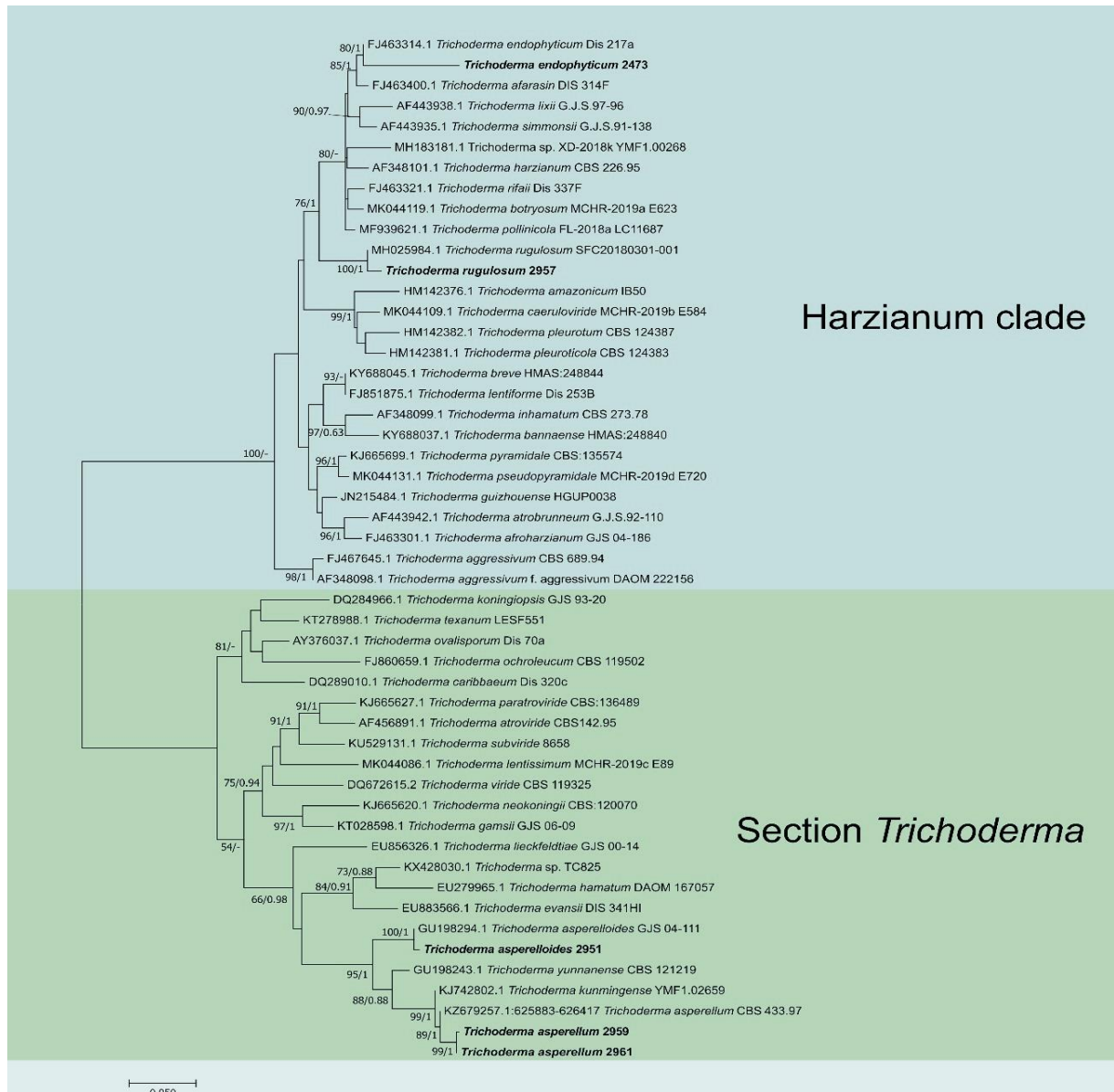


Figura 3: Árvore filogenética construída usando os métodos de Maximum Likelihood e análise Bayesiana com base no gene *teflα* de espécies de *Trichoderma* do clado harzianum e seção *Trichoderma*. O número acima de cada ramificação indica o valor da porcentagem de bootstrap (ML) e valores de probabilidade a posteriori (PP). (ML/PP).

A identificação do gênero baseada apenas nas características morfológicas tem se mostrado insatisfatória (Druzhinina *et al.*, 2006), pois acredita-se não ser suficiente para esclarecer as diferenças genéticas entre as espécies (Chaverri e Samuels, 2003). Portanto, não há uma identificação satisfatória e segura baseada apenas em características morfológicas. Desta maneira a identificação molecular constitui uma ferramenta essencial para uma identificação mais confiável de espécies de *Trichoderma* (Simões *et al.*, 2013).

Atualmente os biofungicidas registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa) são à base de *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis* Oudem e *T. stromaticum*, a espécie *harzianum* é a mais comercializada mundialmente (Meyer *et al.*, 2019). Considerando o número de 254 espécies de *Trichoderma* conhecidas, apenas 4% desse número é usado para controle biológico (Meyer *et al.*, 2019). Trichodermil é um produto usado por produtores, de forma preventiva contra fungos do solo, como, *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, agindo por antagonismo, antibiose e micoparasitismo. (Silva *et al.*, 2005), observaram que com a aplicação de 800 mL ha<sup>-1</sup> ou 1000 mL ha<sup>-1</sup> de Trichodermil, produto comercial foi capaz de reduzir o inóculo de *F. solani* no solo em 67% e 59%, respectivamente, o mesmo produto e com as mesmas dosagens foi observado redução de 83,5% e 55% do inóculo de *R. solani*. Trichosav-34 é um produto à base de *T. harzianum*, que previne a podridão-de-escleródio em diversas culturas, Biotam, Remedier, Tenet WP, são produtos à base de *T. asperellum*, comercializados nos EUA e União Europeia e, ajudam no controle à podridão radicular, causada por *S. rolfsii* (Meyer *et al.*, 2019). O isolado Inpa 2473, identificado como *T. endophyticum*, pertence ao complexo de espécies do *T. harzianum* (Chaverri *et al.*, 2015). Os isolados Inpa 2959 e 2961, foram identificados como *T. asperellum*.

Nesse estudo as espécies selecionadas mostraram-se eficientes no controle da podridão-de-escleródio em tomateiro com os isolados Inpa 2473, Inpa 2951, Inpa, 2957, Inpa 2959, Inpa, 2961 em 100% nos três primeiros isolados e 94% e 87% respectivamente nos demais. Pelos dados obtidos ficou evidente a significativa redução da podridão-de-escleródio em tomateiro com uso do biocontrole. Uma das possíveis razões seria a ação de parasitismo de *Trichoderma* spp. nos escleródios de *S. rolfsii* (Henis *et al.*, 1983). (Mello e Faull, 2000), demonstraram que diferentes *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento de *R. solani*, chegando a reduzir em mais de 60% seu crescimento no cultivo *in vitro*, (Silveira *et al.*, 1994), relataram a capacidade variável dos isolados *Trichoderma* spp. de inibir o crescimento micelial e a produção de escleródio de *S. rolfsii* em feijão caupi. O presente trabalho demonstrou que isolados de *Trichoderma* spp. podem inibir a podridão-de-escleródio em tomateiro, Inpa 2473, Inpa 2957 e Inpa 2959, reduziram em 100% a incidência da doença, os isolados Inpa 2951 e Inpa 2961, reduziram 94% e 87%, respectivamente. O resultado do controle biológico com *Trichoderma* spp. mostra a importância e a capacidade do uso de antagonistas no controle de patógenos que produzem escleródio, visto que o uso de controle químico não apresenta bons resultados de controle (Gamliel *et al.*, 2000).

O controle biológico com *Trichoderma* spp., pode ser uma boa opção ao produtor rural, no entanto, é pouco utilizado em condições de campo, devido a limitada disponibilidade de produtos comerciais, difusão de conceitos e vantagens, ações dos produtos biológicos ainda é incipiente o que possibilita a manutenção da hegemonia do uso de produtos químicos (Machado *et al.*, 2012).

## **6 Conclusões**

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados apresentaram algum nível fungistático e/ou fungicida sobre *S. rolfsii*, em condições *in vitro*. Por outro lado, em condições de casa de vegetação nem todos apresentaram potencial no controle da doença.

Os isolados mais eficientes na inibição de crescimento não foram os mesmos que obtiveram menores incidência da doença, ou seja, não houve correspondência entre os resultados *in vitro* e *in vivo*.

Alguns isolados apresentaram potenciais de se tornarem produtos biocontroladores da podridão-de-escleródio em tomateiro.

## 7 Referências Bibliográficas

- Adandonon, A.; Aveling, T.A.S.; Labuschagne, N.; Tamo, M. 2006. Biocontrol agents in combination with *Moringa oleífera* extract for integrated control of *Sclerotium*-caused cowpea damping-off and stem rot. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 409-418.
- Agrofit. 2022. *Sistemas de Agrotóxicos Fitosanitários*. Disponível em: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons/ap\\_produto\\_form\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_produto\\_formulado\\_tecnico=7855&p\\_tipo\\_janela=NEW](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=7855&p_tipo_janela=NEW). Acesso em 12/05/2022.
- Alvarenga, M.A.R. 2004. *Origem botânica e descrição da planta*. In: Alvarenga M.A.R. *Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e hidroponia*. 1ª ed. Editora Universidade Federal de Lavras. p. 15-16.
- Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A. 2018. Manejo integrado de doenças. In: Amorim, L.; Bergamim Filho, A. (Ed.). *Manual de fitopatologia*. v.1. Princípios e conceitos. Editora Ceres, São Paulo 573 p.
- Antoine, B.B.B.; Hilaire, K.T.; Koffi, K.G.; Fernand, K.; Seydou, T.; Mamadou, C.; Bomisso, L.; Daouda, K. 2015. Inhibition *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Corticaceae), agente causal de la pourriture du collet de la tige de la tomate (Solanaceae), par *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. rich (Annonaceae) et *Trichoderma* sp. *European Scientific Journal*, 11: 61-86.
- Auler, A.C.V.; Carvalho, D.D.C.; Mello, S.C.M. 2013. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. *Revista Agro@ambiente on line*, 7: 359:365.
- Arruda, A.D.; Beretta, A.L.R.Z. 2019. Micotoxinas e seus efeitos à saúde humana: revisão de literatura. *Revista RBAC*, 51: 4.
- Ávila, Z.R.; Carvalho, S.S.; Braúna, L.M.; Gomes, D.M.P.A.; Silva, M.C.F.; Mello, S.C.M. 2005. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotium*. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Embrapa, Brasília, DF, 13 p.
- Azevedo, J.L.; Costa, S.O.P. 1983. *Exercícios práticos de genética*. 1 ed. Editora Nacional, São Paulo, 288 p.
- Barbosa, R.N.T.; Halfeld-Vieira, B.A.; Nechet, K.L.; Souza, G.R. 2010. Método para inoculação de *Sclerotium rolfsii* em tomateiro. *Revista Agroambiente*, 4: 49-52.
- Batista, D.C.; Oliveira, S.M.A.; Tavares, S.C.C.H.; Laranjeira, D.; Neves, R.A.V.; Silva, R.L.X. 2002. Efeitos de fungicidas inibindo o crescimento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e interferência com *Trichoderma* spp. *Summa Phytopathologica*, 28: 305-310.
- Bell, D.K.; Wellls, H.D.; Markham, C.R. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382.
- Bettiol, W.; Morandi, M.A.B.; Pinto, Z.V.; Lucon, C.M.M.; Lobo Júnior, M.; Costa, J.C.B. *et al.*, 2013. *Metodologia para Controle de qualidade de produtos biológicos à base de Trichoderma*. Jaguariúna, São Paulo: Embrapa meio ambiente, 37 p.
- Bianchini, A.; Maringoni, A.C.; Carneiro, S. M.T.P.G. 2005. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M (Ed.). *Manual de fitopatologia*. v.2. Ceres, São Paulo, 353 p.

- Blancard, D.; Laterrot, H.; Marchoux, G.; Candresse, T. 2013. *Tomato diseases. Identification, biology and control*. Second edition. Quae, Florida, 499 p.
- Blum, L. E. B.; Amarante, C. V. T.; Arioli, C. J.; Guimarães, L.S.; Dezanet, A.; Hack Neto, P.; Scheidt, F. R. 2003. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 96-100.
- Blum, L.E.B.; Rodríguez-Kábana, R. 2004. Efeito de alterações orgânicas do solo sobre a germinação de escleródios, crescimento micelial e doenças induzidas por *Sclerotium rolfsii*. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 66-74.
- Bosah, O.; Igeleke, C.A.; Omorusi, V.I. 2010. *In vitro* microbial control of pathogenic *Sclerotium rolfsii* *International Journal of Agriculture e Biology*, 12: 474-476.
- Carvalho Filho, M.R.C.; Mello, S.C.M.; Santos, R.P.; Menêzes, J.E. 2008. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, 16 p.
- Carvalho, J.O.M.; Luz, J.M.Q.; Juliatti, F.C.; Melo, F.C.; Teodoro, R.E.F.; Lima, L.M.L. 2003. Desempenho de famílias e híbridos comerciais de tomateiro para processamento industrial com irrigação por gotejamento. *Horticultura Brasileira*, 21: 535-533.
- Chaverri, P.; Branco Rocha, F.; Jaklitsch, W.; Gazis, R.; Degenkolb, T.; Samuels, GJ. 2015. *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* 107: 558-590.
- Chaverri, P.; Samuels, G.J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology*, 48: 101-119.
- CIPRES. 2021 – Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research. Disponível em: (<https://www.phylo.org>.) Acesso em 18/08/2021.
- Chen, B.Y., Janes, H.W. 2002. *PCR cloning protocols*. Second edition. New Brunswick, NJ: Humana Press, 421 p.
- Coelho Netto, A.R.; Ferreira, A.A.B.; Noda, H. 2013. Manejo da podridão-de-sclerotium em pimentão em um argisolo no Amazonas. *Acta Amazonica*, 43: 315-322.
- Dania, V.O.; Henry, E.U. 2022. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* Isolates Causing Stem and Root Rot Disease of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) and Management Using *Trichoderma* Species. *Journal of Agriculture Science*, 44: 105-118.
- DNA baser. Sequence assembly software. Disponível em: <http://www.dnabaser.com/>. Acesso em 20/08/2021.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolate procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Druzhinina, I.S.; Kopchinskiy, A.G.; Kubicek, C.P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47: 55-64.
- Dupin, J.; Matzk NJ, Sarkinen, T.; Knapp, S.; Olmstead RG, Bohs, L.; Smith SD. 2017. Bayesian estimation of the global biogeographical history of the Solanaceae. *Journal of Biogeography*, 44: 887-899.
- Edward, A.W.; Cavalli-Sforza, L.L. 1965. A Method for cluster analysis. *Biometrics*, 21: 362-375.



- Elad, Y.; Hadar, E; Chet, I.; Henis, Y. 1981. Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* in carnation. *Plant Disease*, 65: 675-677.
- Elad, Y.; Chet, I.; Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28: 719-725.
- Ferreira, A.S.; Boley, R.A. 2006. *Sclerotium rolfsii*. *Crop knowledge Master* ([http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/s\\_rolfs.htm](http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/s_rolfs.htm)). Acesso em 20/06/2022.
- Ferreira, A.A.B.; Hanada, R.E.; Coelho Netto, R.A. 2009. Quantificação da população de escleródios de *Sclerotium rolfsii* no solo e seleção de *Trichoderma* spp. para controle da podridão-de-sclerotium em pimentão. In: XVIII Jornada de Iniciação Científica Pibic CNPq/Fapeam/Inpa, p. 36.
- Ferreira, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039-1042.
- Filgueira, F.A.R. 2012. *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 194 p.
- Fu, Z.Q.; Dong, X. 2013. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 839-863.
- Gamliel, A.; Austerweil, M.; Kritzman, G. 2000. Non-chemical approach to soilborne pest management – organic amendments. *Crop Protection*, 19: 847-853.
- Godes, A. 2007. *Perspectivas de los inoculantes fúngicos en Argentina*. In: Izaguirre-Mayoral, M.L.; Labandera, C.; Sanjuan, J. (Ed.). *Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial*. Imprenta Denad Internacional, Montevideo, p.11-14.
- Gomes, D.M.P.A.; Ávila, Z.R.; Pádua, R.R.; Alvarenga, D.O.; Carvalho Filho, M.R.; Mello, S.C.M.; Silva, J.B.T. 2005. Ação de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento de *Sclerotium rolfsii*. In: *10 Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília-DF. Anais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 227 p.
- Grover, A.; Sharma, P.C. 2014. Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8551: 1-13.
- Guerra, Y.L.; Oliveira, T.A.S.; Laranjeira, D.; Lima, L.M.; Melo Filho, P.A.; Santos, R.C. 2015. Control of *Sclerotium rolfsii* in peanut by using *Cymbopogon martinii* essential oil. *African Journal of Microbiology Research*, 9: 1684-169.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190-194.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*, 84: 377-393.
- Henis, Y.; Adams, P.B.; Lewis, J.A.; Papavizas, G.C. 1983. Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 73: 1043-1046.
- Howell, C.R. 2003. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87: 4-10.
- IBGE. 2020 - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: (<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tomate/br>). Acesso em 20/06/2022.

- Inamdar, S.R.; Savanur, M.A.; Eligar, S.M.; Chachadi, V.B.; Nagre, N.N.; Chen, C.; Barclays, M.; Ingle, A.; Mahajan, P.; Borges A.; Shastry, P.; Kalraiya, R.D.; Swamy, B.M.; Rhodes, J.M.; Yu, L.G. 2012. The TF- antigen binding lectin from *Sclerotium rolfsii* inhibits growth of human colon cancer cells by inducing apoptosis in vitro and suppresses tumour growth *in vivo*. *Glycobiology*, 22: 1227- 1235.
- Jeffries, P.; Young, T.W.K. 1994. *Interfungal parasitic relationship*. Cambridge: University Press, 296 p.
- Kimati, H.; Amorin, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. 2011. *Manual de Fitopatologia. V. 2: Doenças de Plantas Cultivadas*. Ceres, São Paulo, 704 p.
- Kimbrough, J.W.; Tu, C.C. 1978. Systematics and phylogeny of fungi in the *Rhizoctonia* complex. *The University of Chicago Press Journals*, 139: 454-466.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Kurozawa, C.; Pavan, M. 2005. *Doenças do tomateiro (Solanum lycopersicum Mill)*. In: Kimati, H.; Amorin, L.; Bergamin, Filho A.; Camargo, L.; Rezende, J. (Eds.) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças de Plantas Cultivadas. 4ª Ed. São Paulo SP. Agronômica Ceres. p. 607-626.
- Loc, N.H.; Huy, N.D.; Quang, H.T.; Lan, T.T.; Ha, T.T.T. 2019. Caracterização e atividade antifúngica da quitinase extracelular de um fungo de biocontrole, *Trichoderma asperellum* PQ34, *Directory of Open Access Journals*. 11: 38-48.
- Lopes, C.A.; Reis, A. 2011. *Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido*. Circular técnica, 2ª edição. Embrapa hortaliças, Brasília, DF, 5 p.
- Machado, D.F.M.; Parzainello, F.R.; Silva, A.C.F.; Antonioli, Z.I. 2012. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 35: 274-288.
- Marcuzzo, L.L.; Schuller, A. 2014. Sobrevivência e viabilidade de escleródios de *Sclerotium rolfsii* no solo. *Summa Phytopathologica*, 40: 281-283.
- Mariano, R.L.R. 1993. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 1: 369-409.
- Marques, M.J. 2018. *Obtenção de progênies endogâmicas de tomate com resistência a Ralstonia solanacearum*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus-Amazonas 53 p.
- Martins, M.V.V.; Silveira, S.F.; Carvalho, A.J.C.; Souza, E.F. 2003. Erradicação de escleródios de *Sclerotium rolfsii* em substratos tratados em coletores solares, em Campos de Goytacazes-RJ. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 421-424.
- Melo, I.S. 1998. *Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos*. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Ed.) Controle biológico. Jaguariúna. Embrapa. 264 p.
- Mello, S.C.M.; Ávila, Z.R.; Braúna, L.M.; Pádua, R.R.; Gomes, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. Para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11:3-9.
- Menezes, M.; Machado, A.L.M.; Silveira, M.C.V.; Silva, R.L.X. 2004. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* com espécies de *Trichoderma* aplicadas no tratamento de sementes de feijão e no solo. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, 1: 133-140.

- Menezes, M.E.L.; Gava, C.A.T. 2012. Eficiência de Isolados de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. *Revista Ciência Agronômica*, 43: 633-640.
- Metcalf, D.A.; Wilson, C.R.T. 2001. The process of antagonismo of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology*, London, 50: 249-257.
- Meyer, M. C.; Mazaro, S. M.; Silva, J. C. 2019. Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. In. Bettiol, W.; Pinto, Z.V.; Silva, J.C.; Fornes, C.; Faria, M.R.; Pacifico, M.G.; Costa, L.S.A.S. (1ª Ed.) *Trichoderma uso na agricultura*. Editora Embrapa soja, p. 45-160.
- Moraes, S.A.; Paradela Filho, O. 1982. Técnica simples e prática para diagnosticar e isolar o fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. em plantas. *Ecossistema*, 7: 108-111.
- Mukherjee, P.K.; Horwitz, B.A.; Estrella, A.H.; Schmoll, M.; Kenerley, C.M. 2013. *Trichoderma* research in the genoma era. *Annual Review Phytopathology*, 51: 105-129.
- Nylander, J.A.A. 2004. Mr Modeltest V2. Program distributed by the Author. *Bioinformatics*, 24: 581-583.
- Okonechnikov, K.; Golosova, O.; Fursov, M. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28: 1166-1167.
- Pereira, G.V.M. 2012. *Promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro inoculadas com Trichoderma spp.* Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia. 67 p.
- Perello, A.; Monaco, C.; Simon, M.R.; Sisterna, e Dal Bello, G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* for tan spot of wheat in Argentina. *Crop Protection*, 22: 1099-1106.
- Pinheiro, A.R.B.N. 2016. *Efeito da inoculação de Trichoderma na promoção do crescimento de forragens no cerrado tocantinense.* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, Tocantins. 72 p.
- Punja, Z.K. 1985. The biology, ecology and control *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 97-127.
- Rambaut, A. 2009. FigTree v1.3.1. Instituto de biologia evolutiva, Universidade de Edimburgo, Edimburgo. Ashworth Laboratories Edinburgh EH9 3JT (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Acesso em 22/05/2021.
- Reis, M.T. 2014. *Identificação e avaliação do potencial de uso de isolados de Trichoderma contra Sclerotinia sclerotiorum e Sclerotium rolfsii.* Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília. 117 p.
- Reyes, R.A.; Martinez, B.B.; Rivero, G.G.; Montejó, G.J. 2002. Actividad *in vivo* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* em plantulas de tomate. *Manejo integrado de Plagas y agroecologia*, Costa Rica, 66: 45-48.
- Rifai, M.A. 1969. A Revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116: 1-56.
- Samson, R.A.; Houbraken, J.; Thrane, U.; Frisvad, J.C.; Andersen, B. 2010. *Food and Indoor Fungi*, Vol. 2. CBS-Knaw Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands. 390 p.
- Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research*, 100: 923-935.
- Severino, J.J.; Dias-Arieira, C.R.; Abe, V.H.F.; Roldi, M.; Silva, C.N.; Tessmann, D.J.J. 2014. First report of *Sclerotium rolfsii* in dandelion in Parana, Brazil. *Journal of Phytopatology*, 162: 553-555.

- Shoresh, M.; Harman, G.E. 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiology*, 147: 2147-2163.
- Shoresh, M.; Harman, G.E.; Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 21-43.
- Silva, J.B.C.; Giordano, L.B. 2000. *Tomate para processamento industrial*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia – Embrapa Hortaliças. 168 p.
- Silva, C.C.; Wruck, F.J.; Aidar, H.; Kluthcousky, J.; Silva, J.G. 2005. *Resultados obtidos na área Polo de feijão no período de 2002 a 2004*. Santo Antônio de Goiás, Goiás. Embrapa arroz e feijão, Documentos 174, 14 p.
- Silveira, N.S.S.; Michereffi, S.J.; Menezes, M.; Takaki, G.M.C. 1994. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, 20: 22-25.
- Simões, M.F.; Santos, C.; Lima, N. 2013. Structural diversity of *Aspergillus* section Nigri spores. *Microscopy Microanalysis*, 19: 1-8.
- Singh, S.P.; Singh, H.B.; Singh, K.D. 2014. Biocontrol potential of mixture of *Trichoderma* isolates of damping off and collar root of tomato. *The Bioscan*, 9: 1301-1304.
- Soares, J.V.C.; Bentes, J.L.S.; Gasparotto, L. 2017. Reação de genótipos de *Capsicum* spp. à podridão do colo (*Sclerotium rolfsii*). *Summa Phytopathologica*, 43: 58-59.
- Souza, W. 2007. *Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas*. 3 ed. Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. 55 p.
- Souza, T.G. 2012. *Controle da podridão por Sclerotium rolfsii em alho (Allium sativum L.) e cebola (Allium cepa L.) por Trichoderma*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília. 58 p.
- Souza, T.G.; Blum, L.E.B. 2013. Uso de *Trichoderma harzianum* e condicionador orgânico de solo para controle da podridão por *Sclerotium rolfsii* em alho. *Revista de Biociências*, 29 p.
- Tavares, C.C.H. 1999. *Mix de Trichoderma spp. como antagonista e promotor de crescimento em feijoeiro na região semiárida do vale do São Francisco*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Curitiba. *Fitopatologia Brasileira*, 24: 337. Suplemento.
- Tsahoridou, P.C.; Thanassouloupoulos, C.C. 2002. Proliferation of *Trichoderma konogii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii* Soil. *Biology and Biochemistry*, 34: 767-776.
- Yedidia, I.; Shoresh, M.; Kerem, Z.; Benhamou, N.; Kapulnik, Y.; Chet, I. 2003. Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (t-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 7343-7353.