



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Fitopatologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE *Trichoderma* NO CONTROLE DE *Thielaviopsis* sp.  
EM CANA-DEAÇÚCAR**

**ANA LUIZA BEZERRA CARDOSO**

Brasília  
Distrito Federal – Brasil  
2022

**ANA LUIZA BEZERRA CARDOSO**

**AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE *Trichoderma* NO CONTROLE DE *Thielaviopsis* sp.  
EM CANA-DEAÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Corrêa Marques de Mello

Brasília  
Distrito Federal – Brasil  
2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

Cardoso, Ana Luiza Bezerra

Avaliação de linhagens de *Trichoderma* no controle de *Thielaviopsis* sp. em cana-deaçúcar

Brasília, 2022.

Número de páginas: 97

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília - DF.

1. Fitopatologia – Controle Biológico de Doenças

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT

II. Avaliação de linhagens de *Trichoderma* no controle de *Thielaviopsis* sp. em cana-deaçúcar

Brasília

Distrito Federal – Brasil

2022

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se  
cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

*Leonardo da Vinci*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me proporcionado muita saúde, força e determinação para que eu pudesse realizar este trabalho.

Agradeço a toda minha família, em especial à minha mãe, Maria do Perpétuo Socorro e minha irmã, Ângela, por todo apoio, amor, incentivo e momentos de alegria, para passar por essa etapa de forma mais suave. Ao meu companheiro de todos os dias, meu namorado, José Patrício, por toda motivação, apoio, amizade, amor e compreensão.

Aos demais familiares e amigos por estarem sempre por perto, torcendo pelas minhas conquistas durante essa trajetória.

À Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello pela orientação, apoio, ensinamentos, ajuda pessoal e muita dedicação para o desenvolvimento deste trabalho, serei eternamente grata.

Ao Dr. José de Ribamar Nazareno dos Anjos, pesquisador da Embrapa Cerrados, pela ajuda com a obtenção do patógeno e material vegetal, além de todo cuidado, atenção e orientações durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus grandes amigos de laboratório: Amanda, Lincon, Leonardo e Marcel por toda ajuda, suporte, conhecimentos compartilhados e momentos de muita alegria.

Ao meu eterno professor e amigo Eder Marques, pois sem a presença dele no decorrer da minha vida acadêmica, muitos sonhos não teriam sido alcançados, sou muito grata por tudo.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade a mim concedida.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por toda estrutura e tecnologia fornecidas para condução do projeto de pesquisa.

A todos aqueles que, mesmo não citados, contribuíram de alguma forma para a conclusão desse trabalho.

Muito obrigada a todos!

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Dr<sup>a</sup> Sueli Corrêa Marques de Mello**, com apoio institucional e financeiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE *Trichoderma* NO CONTROLE DE  
*Thielaviopsis* sp. EM CANA-DEAÇÚCAR**

**ANA LUIZA BEZERRA CARDOSO**

DISSERTAÇÃO APROVADA em 19 / 12 / 2022 por:

---

**Prof. Dr. Eder Marques**

Universidade Federal de Goiás

(Examinador Externo)

---

**Prof. Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum**

Universidade de Brasília

(Examinador Interno)

---

**Profa. Dr<sup>a</sup>. Orientadora Sueli Corrêa Marques de Mello**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

(Presidente)

---

**Prof. Dr. Danilo Batista Pinho**

Universidade de Brasília

(Suplente)

Brasília, Distrito Federal – Brasil

2022

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>RESUMO GERAL</b> .....	14
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1. Importância econômica da cana-de-açúcar no Brasil.....	18
2.2. Aspectos biológicos e agrônômicos da cultura .....	19
2.3. <i>Thielaviopsis</i> (De Seynes) von Höhn agente causal da podridão abacaxi .....	20
2.4. Fungos do gênero <i>Trichoderma</i> como agentes de biocontrole .....	24
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
4.1. Objetivo geral.....	30
4.2. Objetivos .....	30
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
5.1. Local dos experimentos.....	31
5.2. Origem e preservação das linhagens <i>Trichoderma</i> utilizadas e do patógeno <i>Thielaviopsis</i> sp. ....	31
5.3. Experimentos.....	33
5.3.1. Pareamento de culturas .....	33
5.3.2. Testes de produção de compostos orgânicos voláteis bioativos .....	33
5.3.3. Testes para detecção de compostos termoestáveis bioativos em filtrados de cultura.....	34
5.3.4. Exposição aos compostos orgânicos voláteis produzidos pelas linhagens de <i>Trichoderma</i> em diferentes fases de desenvolvimento.....	35
5.3.5. Avaliação da severidade da podridão abacaxi em cana-de-açúcar na presença de <i>Trichoderma</i> spp.....	36
5.3.6. Ação de linhagens de <i>Trichoderma</i> quanto ao controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar, em casa de vegetação, .....	39
<b>6. RESULTADOS</b> .....	42
6.1. Inibição do crescimento micelial de <i>Thielaviopsis</i> sp. pelos isolados de <i>Trichoderma</i> pelo método de pareamento de culturas .....	42

6.2. Inibição do crescimento micelial de <i>Thielaviopsis</i> sp. por meio da exposição aos compostos orgânicos voláteis de linhagens de <i>Trichoderma</i> .....	45
6.3. Inibição do crescimento micelial de <i>Thielaviopsis</i> sp. após a exposição aos filtrados de isolados <i>Trichoderma</i> .....	47
6.4. Exposição aos compostos orgânicos voláteis pelas linhagens de <i>Trichoderma</i> em diferentes fases de desenvolvimento .....	48
6.5. Redução da severidade da podridão abacaxi em cana-de-açúcar por <i>Trichoderma</i> spp. em laboratório .....	54
6.6. Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por <i>Trichoderma</i> spp. em casa de vegetação .....	58
6.6.1. Primeiro ensaio: Inverno (julho a agosto de 2022).....	58
6.6.2. Segundo ensaio: Inverno/primavera (agosto a outubro de 2022) .....	63
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	68
7.1. Pareamento de culturas.....	68
7.1.1. Testes de produção de compostos orgânicos voláteis bioativos .....	71
7.1.2. Testes para detecção de compostos termoestáveis bioativos em filtrados de cultura.....	72
7.2. Exposição de <i>Thielaviopsis</i> aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por <i>Trichoderma</i> spp., em diferentes fases de desenvolvimento das culturas.....	74
7.3. Redução na severidade da podridão abacaxi em cana-de-açúcar por <i>Trichoderma</i> spp. ....	75
7.4. Ação de linhagens de <i>Trichoderma</i> em casa de vegetação, no controle de <i>Thielaviopsis</i> sp. em cana-de-açúcar .....	77
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	82
<b>9. CONCLUSÕES</b> .....	84
<b>10. REFERÊNCIAS</b> .....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Linhagens de <i>Trichoderma</i> pertencentes à Coleção de Microrganismos para o Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa CENARGEN e produto comercial à base de <i>Trichoderma</i> .....	322
<b>Tabela 2.</b> Inibição do crescimento micelial médio (ICM%) aos 3 DAI de <i>Thielaviopsis</i> sp. em teste in vitro de pareamento de culturas com 15 linhagens de <i>Trichoderma</i> e uma cepa de produto comercial .....	431
<b>Tabela 3.</b> Inibição do crescimento micelial médio (ICM%) de <i>Thielaviopsis</i> sp. por compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Trichoderma</i> spp. e cepa de produto comercial. ....	465
<b>Tabela 4.</b> Inibição do crescimento micelial de <i>Thielaviopsis</i> sp. por filtrados de cultura de <i>Trichoderma</i> spp e cepa de produto comercial. ....	487
<b>Tabela 5.</b> Análise estatística da inibição do crescimento micelial de <i>Thielaviopsis</i> sp. por COVs produzidos em diferentes fases de desenvolvimento de <i>Trichoderma</i> spp. na primeira execução. ....	50
<b>Tabela 6.</b> Análise estatística da inibição do crescimento micelial de <i>Thielaviopsis</i> sp. por COVs produzidos em diferentes fases de desenvolvimento de <i>Trichoderma</i> spp. na segunda execução. ....	532
<b>Tabela 7.</b> Médias dos níveis de severidade de sintomas causados pelo <i>Thielaviopsis</i> sp. nos mini toletes de cana-de-açúcar em Gerbox. ....	554
<b>Tabela 8.</b> Efeito de linhagens de <i>Trichoderma</i> (concentração $1 \times 10^8$ conídios/ml) no controle de <i>Thielaviopsis</i> sp. (concentração $1 \times 10^5$ conídios/ml) nas variáveis avaliadas em casa de vegetação no primeiro ensaio. ....	60
<b>Tabela 9.</b> Efeito de linhagens de <i>Trichoderma</i> (concentração $1 \times 10^8$ conídios/ml) no controle de <i>Thielaviopsis</i> sp. (concentração $1 \times 10^5$ conídios/ml) na variável massa seca de raízes (g) no primeiro ensaio .....	60
<b>Tabela 10.</b> Médias dos níveis de severidade de sintomas causados por <i>Thielaviopsis</i> sp. nos mini toletes de cana-de-açúcar retirados da casa de vegetação no primeiro ensaio	622
<b>Tabela 11.</b> Efeito de linhagens de <i>Trichoderma</i> (concentração $1 \times 10^8$ conídios/ml) no controle de <i>Thielaviopsis</i> sp. (concentração $1 \times 10^5$ conídios/ml) nas variáveis avaliadas em casa de vegetação no segundo ensaio. ....	644

**Tabela 12.** Efeito de linhagens de *Trichoderma* (concentração  $1 \times 10^8$  conídios/ml) no controle de *Thielaviopsis* sp. (concentração  $1 \times 10^5$  conídios/ml) na variável massa seca de raízes (g) no segundo ensaio..... 644

**Tabela 13.** Médias dos níveis de severidade de sintomas causados por *Thielaviopsis* sp. nos mini toletes de cana-de-açúcar retirados da casa de vegetação no segundo ensaio 666

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microconídios e macroconídios de *Thielaviopsis* sp. visualizados ao microscópio óptico/40x. **A:** Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar (*BDA*). **B:** macroconídios (aleuroconídios ou clamidósporos) em cadeia maduros (seta azul) e imaturos (seta vermelha). **C:** microconídios (artroconídios) (seta amarela). ..... 32
- Figura 2.** Esquematização do ensaio com Gerbox, contendo o mini tolete de uma repetição referente à testemunha após 7 dias de incubação (sem qualquer dos tratamentos).. ..... 38
- Figura 3.** Ilustração da escala de notas empregada na avaliação da severidade da doença causada por *Thielaviopsis* sp. em mini toletes de cana-de-açúcar da variedade CTC20. Sendo **A:** referente à nota de severidade 1; **B:** referente à nota 2; **C:** referente à nota 3; **D:** referente à nota 4; **E:** referente à nota 5 ..... 39
- Figura 4.** Montagem e execução do ensaio em casa de vegetação. **A:** Mini toletes foram imersos em suspensão de *Trichoderma* spp. na concentração de  $1 \times 10^8$  por 60 minutos. **B:** Retirada dos mini toletes da suspensão. **C:** Patógeno aplicado via aspersão na concentração de  $1 \times 10^5$  em cada lado do mini tolete e **D:** Plantio em sacos com capacidade para 5 litros. .... 40
- Figura 5.** Plantas de cana em casa de vegetação aos 45 dias após o plantio. .... 41
- Figura 6.** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Thielaviopsis* sp. após 3 dias de incubação. **A:** CEN162. **B:** CEN167. **C:** CEN201. **D:** CEN281. **E:** CEN287. **F:** CEN288. **G:** CEN511. **H:** CEN1070. **I:** CEN1075. **J:** CEN1080. **K:** CEN1242. **L:** CEN1277. **M:** 1513; **N:** CEN1546; **O:** CEN1559 e **P:** ESALQ-1306. .... 443
- Figura 7.** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Thielaviopsis* sp. após 7 dias de incubação. **A:** CEN162. **B:** CEN167. **C:** CEN201. **D:** CEN281. **E:** CEN287. **F:** CEN288. **G:** CEN511. **H:** CEN1070. **I:** CEN1075. **J:** CEN1080. **K:** CEN1242. **L:** CEN1277. **M:** 1513. **N:** CEN1546. **O:** CEN1559 e **P:** ESALQ-1306. .... 454
- Figura 8.** Culturas de *Thielaviopsis* sp. após três dias de exposição aos compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma* spp. **A:** CEN281. **B:** CEN287. **C:** CEN288. **D:** CEN1242. **E:** CEN1277. **F:** CEN1513. **G:** CEN1546 e **H:** ESALQ-1306. .... 476
- Figura 9.** Culturas de *Thielaviopsis* sp. crescidas em meios contendo filtrados termoestáveis de *Trichoderma* spp. na primeira execução após três dias de incubação. **A:**

CEN281. <b>B:</b> CEN287. <b>C:</b> CEN288. <b>D:</b> CEN1242. <b>E:</b> 1277. <b>F:</b> CEN1513. <b>G:</b> 1546 e <b>H:</b> ESALQ-1306.....	48
<b>Figura 10.</b> Interação tratamento <i>versus</i> tempo de cultivo. À esquerda execução 1; à direita execução 2. ....	498
<b>Figura 11.</b> Interação tempo de cultivo <i>versus</i> tratamento. À esquerda execução 1; à direita execução 2. ....	49
<b>Figura 12.</b> Colônias de <i>Thielaviopsis</i> sp. após exposição aos compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. na primeira execução. As figuras nas colunas, em <b>A:</b> CEN281. <b>B:</b> CEN1277. <b>C:</b> 1513. <b>D:</b> 1546. <b>E:</b> ESALQ-1306. Nas linhas, as respectivas horas. ....	51
<b>Figura 13.</b> Colônias de <i>Thielaviopsis</i> sp. após exposição aos compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. na segunda execução. As figuras nas colunas, em <b>A:</b> CEN281. <b>B:</b> CEN1277. <b>C:</b> 1513. <b>D:</b> 1546. <b>E:</b> ESALQ-1306. Nas linhas, as respectivas horas. ....	53
<b>Figura 14.</b> Colônia de <i>Thielaviopsis</i> sp. referente à placa controle apenas com o patógeno (controle). ....	543
<b>Figura 15.</b> Sintomas da podridão abacaxi induzidos por diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i> em mini toletes de cana de açúcar acondicionados em caixas <i>Gerbox</i> <b>A:</b> Testemunha inoculada com o patógeno. <b>B:</b> Testemunha não inoculada. <b>C:</b> CEN281. <b>D:</b> CEN1277. <b>E:</b> CEN1513. <b>F:</b> CEN1546. <b>G:</b> ESALQ-1306. ....	554
<b>Figura 16.</b> Sintomas da podridão abacaxi induzidos por diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i> em mini toletes de cana de açúcar acondicionados em caixas <i>Gerbox</i> após 24 horas da primeira avaliação. <b>A:</b> Testemunha inoculada. <b>B:</b> Testemunha não inoculada. <b>C:</b> CEN281. <b>D:</b> CEN1277. <b>E:</b> CEN1513. <b>F:</b> CEN1546. <b>G:</b> ESALQ-1306. ....	56
<b>Figura 17.</b> Mini toletes de cana-de-açúcar exibindo micélio e esporulação do antagonista e do patógeno nas extremidades, sendo <b>A:</b> Testemunha inoculada. <b>B:</b> CEN281. <b>C:</b> CEN1277. <b>D:</b> CEN1513. <b>E:</b> CEN1546. <b>F:</b> ESALQ-1306.....	57
<b>Figura 18.</b> Mini toletes de cana-de-açúcar evidenciando a presença de raízes em cada um dos tratamentos: <b>A:</b> Testemunha inoculada com o patógeno; <b>B:</b> Testemunha sem tratamento com antagonista nem com o patógeno; <b>C:</b> CEN281. <b>D:</b> CEN1277. <b>E:</b> CEN1513. <b>F:</b> CEN1546. <b>G:</b> ESALQ-1306.....	58
<b>Figura 19.</b> Análise estatística do efeito de tratamentos com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em mini toletes de cana, na presença de <i>Thielaviopsis</i> sp., agente causal da podridão	

abacaxi no primeiro ensaio, onde, <b>A:</b> altura das plantas (cm). <b>B:</b> massa seca de parte aérea (g). <b>C:</b> massa seca de raízes (g) e <b>D:</b> diâmetro do colmo (mm).....	61
<b>Figura 20.</b> Efeito dos tratamentos com as linhagens de <i>Trichoderma</i> , na podridão abacaxi em plantas de cana referentes ao primeiro ensaio onde, <b>A:</b> testemunha inoculada. <b>B:</b> testemunha não inoculada. <b>C:</b> CEN281. <b>D:</b> CEN1277. <b>E:</b> CEN1513. <b>F:</b> CEN1546 e <b>G:</b> ESALQ-1306.....	61
<b>Figura 21.</b> Efeito dos tratamentos com as linhagens de <i>Trichoderma</i> , em raízes de mini toletes de cana inoculados com <i>Thielaviopsis</i> sp. referentes ao primeiro ensaio onde, <b>A:</b> testemunha inoculada; <b>B:</b> testemunha não inoculada; <b>C:</b> CEN281; <b>D:</b> CEN1277; <b>E:</b> CEN1513; <b>F:</b> CEN1546 e <b>G:</b> ESALQ-1306.....	62
<b>Figura 22.</b> Efeito dos tratamentos com as linhagens de <i>Trichoderma</i> na severidade da podridão abacaxi, de <i>Thielaviopsis</i> sp. referentes ao primeiro ensaio onde, <b>A:</b> testemunha inoculada; <b>B:</b> testemunha não inoculada; <b>C:</b> CEN281; <b>D:</b> CEN1277; <b>E:</b> CEN1513; <b>F:</b> CEN1546 e <b>G:</b> ESALQ-1306.....	62
<b>Figura 23.</b> Análise estatística do efeito de tratamentos com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em mini toletes de cana, na presença de <i>Thielaviopsis</i> sp., agente causal da podridão abacaxi no segundo ensaio onde, <b>A:</b> altura das plantas (cm); <b>B:</b> massa seca de parte aérea (g); <b>C:</b> massa seca de raízes (g); <b>D:</b> diâmetro do colmo (mm). .....	65
<b>Figura 24.</b> Efeito dos tratamentos com as linhagens de <i>Trichoderma</i> , na podridão abacaxi em plantas de cana referentes ao segundo ensaio onde, <b>A:</b> testemunha inoculada; <b>B:</b> testemunha não inoculada; <b>C:</b> CEN281; <b>D:</b> CEN1277; <b>E:</b> CEN1513; <b>F:</b> CEN1546 e <b>G:</b> ESALQ-1306.....	65
<b>Figura 25.</b> Efeito dos tratamentos com as linhagens de <i>Trichoderma</i> , em raízes de mini toletes de cana inoculados com <i>Thielaviopsis</i> sp. referentes ao primeiro ensaio onde, <b>A:</b> testemunha inoculada; <b>B:</b> testemunha não inoculada; <b>C:</b> CEN281; <b>D:</b> CEN1277; <b>E:</b> CEN1513; <b>F:</b> CEN1546 e <b>G:</b> ESALQ-1306.....	66
<b>Figura 26.</b> Efeito dos tratamentos com as linhagens de <i>Trichoderma</i> na severidade da podridão abacaxi, de <i>Thielaviopsis</i> sp. referentes ao segundo ensaio onde, <b>A:</b> testemunha inoculada; <b>B:</b> testemunha não inoculada; <b>C:</b> CEN281; <b>D:</b> CEN1277; <b>E:</b> CEN1513; <b>F:</b> CEN1546 e <b>G:</b> ESALQ-1306.....	66

## RESUMO GERAL

CARDOSO, Ana Luiza Bezerra. **Avaliação de linhagens de *Trichoderma* no controle de *Thielaviopsis* sp. em cana-de-açúcar.** 2022. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é a principal fonte de matéria-prima para a produção de açúcar e etanol combustível no Brasil, razão pela qual ocupa papel de destaque na economia do país. A cultura é acometida pela doença podridão abacaxi, causada por *Thielaviopsis* spp., fungo este que prejudica, principalmente, a brotação das gemas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro* e *in vivo*, 15 linhagens de *Trichoderma*, presentes na Coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e uma linhagem comercial (incluída como referência), quanto à eficiência no controle da doença. Adotaram-se diferentes métodos de laboratório, como pareamento de culturas, exposição aos compostos orgânicos voláteis (COVs) em atmosfera compartilhada e exposição aos extratos brutos autoclavados do antagonista. Todas as linhagens de *Trichoderma* foram capazes de inibir o crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp. Os demais ensaios realizados seguiram com as linhagens que apresentaram melhores desempenhos, sendo elas CEN281 (*T. afroharzianum*), CEN1277 (*T. asperelloides*), CEN1513 (*T. koningiopsis*), CEN1546 (*T. afroharzianum*) e CEN219 (*T. harzianum*). Esta última, trata-se da cepa ESALQ-1306 comercialmente registrada como Trichodermil, a qual foi obtida por isolamento monospórico, a partir do lote 305/12/CO5GO. Abordou-se também a inibição do crescimento micelial do patógeno quando exposto aos COVs emitidos por *Trichoderma* em diferentes fases de cultivo. O principal momento de inibição do patógeno ocorreu após 72 horas do desenvolvimento das colônias do antagonista, com a maioria das linhagens testadas. Os experimentos *in vivo* consistiram na inoculação do patógeno e antagonistas em toletes de cana-de-açúcar da variedade “CTC20”. A redução da severidade da doença pelas linhagens de *Trichoderma* foi avaliada, tanto em ambiente de laboratório, como em casa de vegetação. Nestes últimos, tomaram-se os valores médios de altura de plantas, massa seca de raízes e parte aérea, diâmetro do colmo, além da severidade da doença. Esta foi reduzida em aproximadamente 70% por uma das linhagens selecionadas. Com base nos ensaios conduzidos, comprovou-se a eficácia das linhagens estudadas no controle da podridão abacaxi em cana-de-açúcar. Infere-se, a partir dos testes realizados, que o agente biocontrole pode ser utilizado, em tratamento dos toletes previamente ao plantio, como uma medida profilática para o controle da podridão abacaxi e, também, como um promotor de enraizamento para a cultura, inclusive na produção de mudas pré-brotadas (MPB). Em todos os ensaios realizados, a linhagem CEN1277, identificada como pertencente à espécie *T. asperelloides* destacou-se dentre as demais linhagens da Coleção avaliadas e apresentou resultados semelhantes aos verificados com a linhagem comercial que vem sendo indicada para controle da doença. Portanto, essa linhagem pode ser disponibilizada para o desenvolvimento de um novo bioproduto, conforme demanda o mercado de fungicidas biológicos.

**Palavras-chave:** controle biológico, podridão abacaxi, *Saccharum* spp.

## GENERAL ABSTRACT

CARDOSO, Ana Luiza Bezerra. **Evaluation of *Trichoderma* lineages in the control of *Thielaviopsis* sp. in sugar cane.** 2022. 97 p. Dissertation (Master's degree in Plant pathology) – University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is the main source of raw material to produce sugar and fuel ethanol in Brazil, which is why it occupies a prominent role in the country's economy. The crop is affected by the pineapple rot disease, caused by *Thielaviopsis* sp., a fungus that mainly damages bud sprouting. The objective of this work was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the efficiency of 15 strains of *Trichoderma*, belonging to the Collection of Biological Control Agents of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, in addition to a commercial lineage (included as a reference), in terms of efficiency in controlling the disease. Different laboratory methods were adopted, such as pairing of cultures, exposure to volatile organic compounds (VOCs) in shared atmosphere and exposure to autoclaved crude extracts of the antagonist. All *Trichoderma* strains were able to inhibit the mycelial growth of *Thielaviopsis* sp. The other tests carried out continued with the strains that presented the best performances, namely CEN281 (*T. afroharzianum*), CEN1277 (*T. asperelloides*), CEN1513 (*T. koningiopsis*), CEN1546 (*T. afroharzianum*) and CEN219 (*T. harzianum*). The latter is the ESALQ-1306 strain commercially registered as Trichodermil, which was obtained by monosporic isolation, from batch 305/12/CO5GO. The inhibition of mycelial growth of the pathogen when exposed to VOCs emitted by *Trichoderma* in different stages of cultivation was also discussed. The main moment of pathogen inhibition occurred after 72 hours of development of the antagonist colonies, with most strains tested. The *in vivo* experiments consisted of the inoculation of the pathogen and antagonists in “CTC20” cane stalks. The reduction in the severity of the disease by the *Trichoderma* strains both in laboratory tests and in greenhouse tests was evaluated. In the latter, the average values of plant height, dry mass of roots and shoots, stem diameter, in addition to disease severity were taken. This was reduced by approximately 70% for one of the selected strains. Based on the tests carried out, the efficacy of the studied strains in the control of pineapple rot in sugarcane was confirmed. In conclusion, the biocontrol agents can be used in the treatment of stalks prior to planting, as a prophylactic measure for the control of pineapple rot and, also, as a rooting promoter for the crop, including in the production of pre-sprouted seedlings (PSS). In all tests out, the CEN1277 strain identified as belonging to the *T. asperelloides* species, stood out among the other strains from the Collection, and showed similar results to those verified with the commercial strain that has been indicated for the disease control. Therefore, this strain can be made available for the development of a new bioproduct, supplying the growing market demand for biological fungicides.

**Keywords:** biological control, pineapple rot disease, *Saccharum* spp.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo, por isso tem posição de destaque no ranking dos maiores produtores de açúcar e do biocombustível etanol (Silva 2018; YARA 2021). Esta espécie botânica é fonte de produtos destinados a culinária, ao setor de biocombustíveis e outros subprodutos com destaque para a economia mundial (Goes et al., 2008; Medeiros 2015). A cultura está presente em todas as regiões do território nacional, com destaque para a região Sudeste como a maior produtora (CONAB 2021).

A cana-de-açúcar foi descrita por Linneau em 1753, que a nomeou genericamente de *Saccharum* e pertence à família botânica das Poaceae (Magro et al., 2011; Rodrigues & Ross 2020). A cultura é proveniente do Sul e Sudeste Asiático, tendo como centro de origem, para a espécie *Saccharum barberi*, a Índia e, para a espécie *Saccharum officinarum*, a Ilha de Nova Guiné. O gênero pertence à família Poaceae e possui seis espécies, sendo *S. officinarum* a principal e mais utilizada em programas de melhoramento genético, devido às características de melhor desempenho agrônomo. Entretanto, sua produtividade pode ser afetada pois, diversos problemas sanitários, com críticos danos potenciais, podem prejudicar o desenvolvimento da cultura (Nocelli et al., 2017).

Dentre as doenças que acometem a cultura, pode-se destacar a podridão-abacaxi, doença causada pelo fungo imperfeito *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) von Höhn. O fungo produz microconídios (artroconídios), hialinos, pequenos, eretos e eliminados na forma de bastonetes em cadeia. Outra forma de conídios produzidos por *T. paradoxa* são os macroconídios (clamidósporos) ovais, pardo-escuros, com volume 3 a 4 vezes maior que o dos microconídios e originários de conidióforos curtos, a partir de hifas mais velhas (Edgerton 1958; Sansoli-Chanquinie 2015; Ferreira 2018). Sua fase perfeita (teleomórfica) é o fungo *Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Moreau (Gheller 1995).

*Thielaviopsis paradoxa* é um fungo polífago, presente em quase todas as regiões onde a cultura da cana-de-açúcar está estabelecida (Medeiros 2015). Ataca também outras culturas (bananeira, abacaxizeiro e coqueiro, por exemplo) e pode sobreviver em restos de cultura e em forma de clamidósporos (estruturas de sobrevivência) por mais de um ano no solo. O fungo penetra o interior dos tecidos a partir de ferimentos e, como o caule da cana-de-açúcar (colmo) é seccionado para o plantio, a área cortada permite a penetração a partir das extremidades dos toletes. Após a infecção, é possível observar um

encharcamento do tecido que, com o avanço da podridão torna-se avermelhado. Com o progresso da doença, essa coloração vai se alterando para cinza, parda-escura e, finalmente, negra (Sansoli-Chanquinie 2015). O sintoma mais típico dessa doença é o odor agradável exalado, devido a fermentação dos tecidos, similar ao cheiro de abacaxi, motivo pelo qual a doença foi nomeada podridão abacaxi; esse odor é mais acentuado no período inicial da doença, quando os toletes ainda possuem reservas de açúcar (Tokeshi 1997).

A busca por potenciais agentes de biocontrole tornou-se um fator de grande relevância nos últimos anos, devido à preocupação com os impactos causados pelo uso recorrente de defensivos agrícolas (Pinheiro et al., 2018). Os fungos do gênero *Trichoderma* possuem diversas habilidades e são capazes de se desenvolverem em condições ambientais adversas, além disso, são capazes de aumentar o desempenho agrônomo de culturas através da promoção de crescimento e/ou ganho em produtividade (Bettiol et al., 2019). Diversos estudos demonstram a capacidade de *Trichoderma* spp. para inibir o crescimento micelial de inúmeros patógenos, incluindo-se *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, que possuem estruturas de sobrevivência, os escleródios, cujas formação e germinação dificilmente são afetados pelos métodos de controle mais comuns (Iqbal e Mukhtar, 2020; Silva et al., 2020).

A Coleção de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) contém mais de 1600 isolados de *Trichoderma*. Alguns desses vêm sendo estudados quanto à habilidade em controlar diferentes fitopatógenos e possuem elevado potencial como agentes de biocontrole de doenças de plantas causadas por fungos habitantes do solo (Silva et al., 2020; Botelho, 2022). O mercado brasileiro de biofungicidas conta com mais de 30 produtos à base de *Trichoderma* (AGROFIT, 2022), entretanto, apenas um desses produtos está indicado para o controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar. Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi avaliar linhagens de *Trichoderma* da Coleção quanto à supressão de *Thielaviopsis* sp. *in vitro* e *in vivo*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Importância econômica da cana-de-açúcar no Brasil

A introdução da cana-de-açúcar no território brasileiro ocorreu por volta do século XVI. A partir desse momento, o açúcar passou a ganhar importância na economia colonial, de modo que o período entre os séculos XVI e XVII, foi caracterizado, pelo momento histórico, como “Ciclo do Açúcar”. Desde então até os dias de hoje, a produção canavieira se encontra em grande parte relacionada às demandas do mercado internacional (Fontanetti & Bueno, 2017; Araújo & Araújo Sobrinho 2020; NOVACANA 2021). A cultura se estabeleceu primeiramente na Região Nordeste, considerada o polo de produção e cultivo da época, pela boa adaptação às condições de solo e clima tropical brasileiros (Silva 2018; Araújo & Araújo Sobrinho 2020).

O Brasil é hoje o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (Silva 2018), seguido pelos países Índia, China e Tailândia (YARA 2021). Na década de 1970, com a crise do petróleo e a consequente elevação do preço desse produto no mercado internacional a patamares elevados, foi dada a largada para a produção do álcool combustível no país. Assim, em 1975 foi criado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), para substituir a gasolina pelo etanol. O Proálcool impulsionou o desempenho da cultura e foi responsável pelo estabelecimento de usinas de produção e beneficiamento do álcool e do açúcar (Carneiro et al., 2015; Fontanetti & Bueno, 2017; Araújo & Araújo Sobrinho 2020). Ofereceram-se incentivos fiscais e crédito a baixas taxas de juros aos produtores de cana-de-açúcar como forma de viabilizar o desenvolvimento, pelas indústrias automobilísticas, de automóveis movidos a álcool. Estes alcançaram grande sucesso na década de 1980. Entretanto, uma queda acentuada no preço do barril de petróleo bruto no mercado, na década seguinte, diminuiu a vantagem do álcool em relação à gasolina. Os usineiros, por sua vez, passaram a priorizar a produção de açúcar para o mercado internacional. Já no início deste século, uma nova crise do petróleo trouxe de volta o interesse pelo álcool como combustível. O destaque nesse período foi a criação dos automóveis bicombustíveis (*flex fuel*), que imprimiu novo fôlego ao consumo do álcool como biocombustível. Dessa forma, a produção canavieira vem garantindo um equilíbrio no fluxo comercial açúcar x álcool, além de exercer papel

importante na estratégia energética para um desenvolvimento sustentável. É importante enfatizar que o álcool, em substituição ao combustível fóssil (gasolina), firmou-se como fonte de energia limpa cada vez mais adotada por se tratar de uma opção menos poluente, em que pese o preço elevado do açúcar no mercado das *commodities* (Góes et al., 2008; Filippin, 2021). Acresce-se a isso, o fato de gerar subprodutos e detritos que são aproveitados para a cogeração de energia elétrica, fabricação de ração animal e fertilizantes para as lavouras (Araújo 2018; Filippin, 2021). Dessa forma, a cana-de-açúcar é uma das culturas de maior destaque socioeconômico para o Brasil, visto que o setor sucroalcooleiro do país compreende um grande polo industrial, gerando inúmeros postos de trabalho e colocando o país em posição de maior produtor de açúcar e segundo maior produtor do biocombustível etanol no mundo.

## 2.2. Aspectos biológicos e agrônômicos da cultura

A cana-de-açúcar foi descrita por Linneau em 1753, que a nomeou genericamente de *Saccharum* (Magro et al., 2011; Rodrigues & Ross 2020). A cultura é proveniente do Sul e Sudeste Asiático, tendo como centro de origem, para a espécie *Saccharum barberi*, a Índia e, para a espécie *Saccharum officinarum*, a Ilha de Nova Guiné; ambas foram disseminadas para as demais regiões a partir da migração humana, começando a ser comercializadas, principalmente, na costa do Mar Mediterrâneo e chegou nas Américas através da expansão marítima (SYNGENTA 2021; Rodrigues & Ross 2020).

O gênero pertence à família Poaceae e possui seis espécies, sendo *S. officinaram* a principal e mais utilizada em programas de melhoramento genético, devido às seguintes características: capacidade em acumular altos teores de sacarose, boa pureza do caldo e qualidade das fibras que a tornam ideal para moagem. Por outro lado, sendo altamente suscetível a pragas e doenças, é amplamente utilizada em cruzamentos, gerando diferentes híbridos interespecíficos mais resistentes (Araújo 2018; Matos 2022). A cana-de-açúcar é uma planta de metabolismo do tipo C4, ou seja, apresenta elevada capacidade para converter energia radiante em energia química. Entretanto, essa conversão é mais efetiva quando certos parâmetros, como luz, concentração de CO<sub>2</sub> e disponibilidade de água, nutrientes e temperaturas, encontram-se em situações ideais (Magro et al., 2011; Carneiro et al., 2015; Matos 2022).

O processo de fotossíntese da cana é um fator de grande importância para o meio ambiente, em se tratando de uma planta C<sub>4</sub>, que absorve maior quantidade do CO<sub>2</sub> acumulado na atmosfera. Esse gás carbônico em grandes quantidades para a cultura reflete em maior produção de biomassa de raízes, colmos e folhas, conseqüentemente, aumento na produtividade. Isso resulta, também, em sequestro de carbono do meio ambiente, o que contribui para redução do aquecimento global e do efeito estufa, em prol de seu próprio desenvolvimento em biomassa (Magro et al., 2011)

O clima ideal para o desenvolvimento da cultura é o tropical ou subtropical, sendo, o primeiro, predominante no Brasil. Esse clima é característico da região Centro-Sul do país, onde atualmente se localiza a maior produção nacional (Chapola 2014; Medeiros 2015). O cultivo da cana-de-açúcar pode ocorrer em diferentes épocas do ano. Porém, no Centro-Sul existem dois momentos de plantio: o período de janeiro a março, que configura o melhor momento para desenvolvimento das plantas, conhecido como plantio de ano e meio e o de outubro e novembro, denominado plantio de ano (Brandi et al., 2018). Essa janela de plantio é o momento em que a cana-de-açúcar terá um período de 15 a 18 meses para se desenvolver. Assim a cultura terá maiores produtividades a partir do primeiro corte. Entretanto, este é o momento que favorece o aparecimento de podridões, devido às baixas temperaturas, e assim prejudica o desenvolvimento da cultura (Brandi et al., 2018; Ferreira et al., 2018; Dias 2011; Ferreira et al., 2008).

O estado de São Paulo se destaca no cultivo dentro do território nacional, devido às condições climáticas favoráveis para cultura em praticamente todas as áreas de cultivadas (CONAB 2021) e, também pela tecnificação avançada e grande investimento na indústria sucroenergética (Domingues 2014; Fontanetti & Bueno, 2017).

Entre os fatores que podem interferir no desenvolvimento da cultura, a temperatura é o mais importante. Temperaturas abaixo de 21° C podem afetar drasticamente a brotação, portanto o ideal é de 31° a 36°C. No Centro-Sul, plantios realizados entre a primeira quinzena de abril e a primeira semana de setembro, estarão expostos ao clima frio e seco, limitando as brotações e favorecendo a incidência de podridões, como é o caso da podridão abacaxi (Chapola 2014).

### **2.3. *Thielaviopsis* (De Sarynes) Höhn. agente causal da podridão abacaxi**

*Thielaviopsis* spp. é um gênero de fungos composto por fitopatógenos de grande importância para diferentes culturas, como é o caso do coco (*Cocos nucifera* L.) e o dendê (*Elais guinensis* Jacq.), entre outras palmeiras, além do cacau (*Theobroma cacao* L.) e da banana (*Musa* spp.). Todas essas culturas contribuem com o aumento da fonte de inóculo (Pinheiro et al., 2018; Ferreira 2018; Alhudaib et al., 2022). O agente etiológico da podridão abacaxi da cana-de-açúcar tem sido relatado como *Thielaviopsis paradoxa*, (de Seynes) von Höhn na fase anamórfica, imperfeita ou assexuada como é encontrado na cultura. Na fase teleomórfica (perfeita) trata-se de *Ceratocystis paradoxa* (Gheller 1995), pertencente ao filo Ascomycota, família Ceratocystidaceae. Apesar do fato de que no Brasil não ocorrem as condições mais propícias ao crescimento da fase sexual, há relatos de *C. paradoxa* causando a podridão pós-colheita na cultura do coco (Tokeshi 1997; Pinho et al., 2013), no país.

A fase assexuada do fungo foi relatada na cultura do abacaxi pela primeira vez no ano de 1886, por De Seynes, que o nomeou como *Sporochisma paradoxum*. Em 1892 Saccardo se referiu ao mesmo fungo pelo nome de *Chalara paradoxa* (De Seynes) Sacc. Já em 1893, Went relatou a espécie *Thielaviopsis ethaceticus* como causador de uma grave doença na cana-de-açúcar em Java, Indonésia. Em 1904, Von Höhnel mostrou que os fungos identificados e descritos por De Seynes e Went eram o mesmo, já que ele suspeitava tratar-se do fungo causador de uma doença em coqueiros, a qual vinha estudando; ambos teriam se combinado, formando a espécie hoje conhecida como *Thielaviopsis paradoxa*.

Dade, em 1928, encontrou o fungo *Ceratostomella paradoxa* (de Seynes) que acreditava ser o estágio sexual e que posteriormente foi renomeado como *Ceratocystis paradoxa* por Moreau em 1952 (Cook, 1933; Álvarez et al., 2012; Nascimento et al., 2019; Uzan, 2019). Em 2014, De Beer e colaboradores propuseram o uso de um único nome para o mesmo fungo nas fases perfeita e imperfeita. Assim, na família Ceratocystidaceae, muitos fungos do complexo *Thielaviopsis* foram realocados no complexo *Ceratocystis*, devido a estudos moleculares mostrarem um aumento na diversidade de espécies dentro do gênero.

O patógeno é considerado agressivo e de difícil controle, infectando monocotiledôneas, entre essas, gramíneas e palmáceas; é capaz de sobreviver no solo por longos períodos de modo saprofítico, principalmente, em restos de culturas e associa-se também às doenças de plantas que sofrem algum tipo de estresse, como déficit nutricional e/ou hídrico. Sua dispersão ocorre pela chuva, ventos, insetos e ferimentos causados por

ferramentas utilizadas na colheita, em tratos culturais ou para erradicação de plantas doentes (Tokeshi1997; Nascimento et al., 2019)

O fungo possui microconídios (artroconídios) hialinos, pequenos, eretos, produzidos sobre conidióforos e liberados na forma de bastonetes em cadeia; estes são responsáveis pela rápida disseminação do patógeno. Já os macroconídios (clamidósporos), formados nas hifas mais velhas a partir de numerosas ramificações são produzidos em conidióforos curtos, de coloração pardo-escuros, com tamanho 3 a 4 vezes maior que o microconídio e atuam como estrutura de sobrevivência, já que permanecem viáveis em condições climáticas adversas. Na fase sexuada, formam-se estruturas fechadas (peritécios) e dentro delas produzem-se as ascas que contêm os ascósporos (Edgerton 1958; Sansoli-Chanquinie 2015; Ferreira 2018).

O patógeno infecta cana-de-açúcar a partir de ferimentos ou cortes nas mudas e não por penetração direta ou por aberturas naturais como estômatos (Tokeshi1997). Este fato possui relevância, pois o plantio dessa cultura quando realizado mecanicamente favorece a infecção pelo patógeno, já que os colmos são seccionados para o plantio e, desse modo, oferecem portas de entrada para o patógeno (Medeiros 2015). Segundo Gheller (1995), o seccionamento é necessário para impedir a dominância apical entre as gemas e favorecer a brotação da maioria delas.

Inicialmente, os sintomas são observados nas extremidades do tolete, por onde o patógeno foi inserido, em forma de encharcamento do tecido a partir do corte, progredindo para dentro do colmo. Observa-se a formação de um tecido avermelhado, devido à produção de substâncias de defesa pela planta (Tokeshi1997; Borges et al., 2019; Nascimento et al., 2019). O nó é considerado como uma barreira física, uma estrutura de difícil colonização, mas quando a infecção ocorre em variedades altamente suscetíveis, pode acontecer de toda a muda ou colmo serem infectados (Medeiros 2015).

De acordo com o avanço da podridão, a coloração dos tecidos vai sendo modificada, primeiramente fica cinza, em seguida pardo-escura e, por fim, negra, devido aos clamidósporos maduros. No momento em que os tecidos ficam negros, somente a casca das mudas permanece intacta, pois os feixes fibrovasculares internos ficam soltos e recobertos por uma massa negra de esporos; o desenvolvimento do sistema radicular é inibido, devido a produção de etileno pela planta. Algumas mudas infectadas podem brotar, desenvolvendo a parte aérea e o sistema radicular. Porém, estas apresentam crescimento retardado e, em certo ponto, inibido, podendo morrer antes de emergirem da

superfície do solo. Em qualquer caso, o desenvolvimento é lento, resultando em plantas fracas, que morrem na competição com plantas vizinhas ou espontâneas.

Uma das formas mais recorrentes para a identificação da podridão abacaxi é o odor agradável que é exalado a partir da fermentação dos colmos e que se apresenta mais acentuado nos momentos iniciais da infecção, quando a muda/tolete ainda possui reservas de sacarose (Wismer 1961; Tokeshi1997; Chapola 2014; Uzan 2019). A liberação do cheiro de abacaxi está intimamente ligada à fermentação, pois durante esse processo é produzido o acetato de etila, um gás fitotóxico induzido no tecido da planta hospedeira pelo fungo *T. paradoxa*, provocando o efeito destrutivo às brotações e enraizamento das mudas (Chapola 2014; Borges et al., 2019; Nascimento et al., 2019).

Os toletes de cana-de-açúcar, em condições normais de solo e temperatura, desenvolvem-se rapidamente, emitindo raízes e brotações das gemas, estabelecendo assim uma população de perfilho satisfatória. Entretanto, as brotações podem ser prejudicadas por fatores de solo como, temperatura muito baixa, alta umidade ou muito baixa e cobertura de solo muito espessa sobre os toletes. Esses são fatores que desfavorecem a brotação das gemas e oferecem ao patógeno mais tempo para colonização do tecido. Conforme Boyd e Galli (1966) o patógeno só possui vantagem sobre as gemas que demoram mais de 16 dias para brotarem, tempo necessário para se desenvolver e atacar as brotações. Porém, uma gema sadia começa o brotamento com até 15 dias, a depender da variedade cultivada, portanto, existe uma corrida no tempo entre a brotação da gema e a invasão pelo patógeno (Gheller 1995).

No campo, os prejuízos causados por essa doença podem ser devastadores, pois, as áreas em que a doença está presente apresentam falhas e geram irregularidades. As perdas são mais significativas em canaviais de solo argilosos e mal drenados, podendo chegar a 47% de perdas na germinação e redução da produtividade entre 31% e 35% (Talukder et al., 2007). As plantas com brotações precárias afetam todos os cortes do canavial. Em casos muito severos de falhas, há necessidade de realizar o replantio, o que configura prejuízo (Wismer 1961; Chapola 2014).

O fungo *T. paradoxa* possui formas de sobrevivência e disseminação que é favorecido pela elevada esporulação quando colonizam as mudas, sendo assim, seguida a etapa de colonização o tecido apodrece e, com isso, uma grande quantidade de esporos é liberada no solo. Estes constituem inóculo para os próximos plantios (Raid 2012). De acordo com Rott et al. (2000), a sobrevivência do fungo no solo pode durar até 15 meses.

Os esporos liberados concentram-se nos primeiros 25 cm de profundidade do solo (Wismer 1961; Raid 2009).

Existem relatos de que *T. paradoxa* pode ser disseminado por insetos vetores. De acordo com Parra et al., (2003) identificou-se o transporte do fungo por besouros da espécie *Rhynchophorus palmarum*, coleóptero cujas plantas hospedeiras são da família Arecaceae, como o coqueiro, que também é hospedeiro deste patógeno. Postulou-se, assim, que exista uma ligação entre o inseto e *T. paradoxa*.

Como medidas de controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar, estão as que auxiliam no processo de brotação das gemas, por abrirem portas de entrada para o fungo, portanto, a escolha de cultivares que apresentem rápida brotação, resultam boas respostas para o controle da doença (Tokeshi1997). Outro fator que deve ser levado em consideração sobre as gemas é a idade, pois quanto mais novas forem as gemas, mais rapidamente elas brotam, e quanto mais velhas a brotação é retardada (Casagrande 1991).

Para minimizar a ocorrência de *T. paradoxa*, recomenda-se o correto manejo da cultura, desde o preparo do solo: descompactação do solo e eliminação de torrões, para facilitar a emergência das brotações das gemas; plantio mais raso, para diminuir o tempo de emergência (Uzan 2019); escolha da época de plantio adequada, contribuindo para a redução da incidência do patógeno. Os plantios de verão mostram-se desfavoráveis à ocorrência da podridão abacaxi. Entretanto, nos casos em que não é possível escolher o momento do plantio, lança-se mão do uso de fungicidas para controle, principalmente em regiões que possuem histórico da doença na área (Chapola 2014).

Talukder et al. (2007) observaram, por meio de ensaios de laboratório, que uma linhagem do fungo *Trichoderma harzianum*, inibiu o crescimento micelial de *T. paradoxa*. No mesmo trabalho, os autores verificaram, que mudas de cana-de-açúcar tratadas com o fungo antagonista apresentaram índices superiores de brotação e produtividade comparada às mudas não tratadas.

#### **2.4. Fungos do gênero *Trichoderma* como agentes de biocontrole**

A população mundial cresce de maneira exponencial e as mudanças climáticas pelas quais o planeta vem passando constituem um grande desafio para o setor agrícola global: combinar aumento da produção de alimentos e sustentabilidade em meio ao estresse abiótico, de forma a minimizar também a ocorrência de patógenos e pragas nas

lavouras (Bettiol & Morandi 2009). Por isso, atenção vem sendo dada à associação de métodos de controle biológico de pragas e doenças a outras medidas de manejo, desde que compatíveis. O manejo integrado de doenças (MID) contribuiriam para a redução da necessidade do uso de fungicidas químicos altamente poluentes (Bettiol 1991; Pinheiro et al., 2018) e que vem intensificando as adversidades climáticas.

O controle biológico/biocontrole foi definido por BAKER e COOK (1983) como sendo a redução do metabolismo e/ou intensidade do inóculo causador da doença, seja ela provocada por patógenos ou parasitas, que podem estar em estado de dormência ou atividade, utilizando outros organismos de maneira natural ou por meio de manipulação antrópica. O biocontrole é uma alternativa eficaz que pode ser utilizada individualmente, e dependendo do organismo utilizado, poderá surtir efeito por um período maior se comparado com fungicidas sintéticos. Os organismos que compõem o controle biológico têm capacidade de se estabelecerem, colonizarem e se dispersarem pelo ambiente em que foram inseridos e com isso reduzir a densidade do patógeno (Mello et al., 2007).

Nos últimos anos o mercado de produtos biológicos tem avançado no Brasil. De acordo com o MAPA (Ministério da Agricultura e Abastecimento) (2021) foram registrados 95 produtos de controle biológico no ano de 2020; atualmente estão disponíveis aos agricultores um total de 411 biopesticidas, formulados para diferentes grupos de patógenos e inimigos naturais. Dentre esses produtos registrados para o controle biológico incluem-se bactérias e fungos indicados para uso contra diferentes pragas que acometem as culturas, como é o caso do fungo *Beauveria bassiana*, utilizado no controle de insetos-praga; diferentes espécies do gênero *Bacillus*, que são eficientes no controle de algumas espécies de insetos-praga, fungos, bactérias e nematoides em diferentes culturas (AGROFIT, 2022), a depender da espécie. Entre os fungos agentes de biocontrole, destaca-se o gênero *Trichoderma*. Este é o principal agente de biocontrole de doenças fúngicas e compõe a maioria dos produtos biológicos registrados para controle de doenças. Além da capacidade de antagonizar outros microrganismos por diferentes mecanismos de ação, *Trichoderma* spp. atuam também na promoção do crescimento de plantas (AGROFIT, 2022; Montalvão et al., 2020; Silva et al., 2011).

O gênero *Trichoderma* foi descrito por Persoon em 1794 (Teleomorfo: *Hypocrea*), como pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae (NCBI 2021). Trata-se de fungos filamentosos de vida livre, que se reproduzem assexuadamente e são encontrados com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (Machado et al., 2012). Rifai (1969) descreveu o

fungo a partir de observações microscópicas, como se segue: conidióforo geralmente ramificado em diferentes níveis e estes podem apresentar apêndices estéreis em algumas espécies; nas extremidades dos conidióforos formam-se as células conidiogênicas do tipo fiálides, onde são produzidos os conídios e estes podem ser unicelulares, globosos ou elipsoidais. As características desses esporos são variáveis de acordo com a espécie e comumente são hialinos ou mais frequentemente verdes, com parede lisa, rugosa ou estriada.

Os fungos do gênero *Trichoderma*, são microrganismos naturalmente encontrados no solo. Sua principal característica morfológica é a formação de micélio, com coloração inicialmente branca, e crescimento acelerado. Com a idade, as colônias poderão apresentar aspecto cotonoso e compacto, com tufo verde. A quantidade de conídios de pigmentação verde confere a coloração da colônia, de diferentes nuances de verde (Saito et al., 2009).

Por serem amplamente distribuídos no solo e apresentarem capacidade para hiperparasitar fungos fitopatogênicos e/ou estabelecer interações benéficas na rizosfera de plantas cultivadas, espécies de *Trichoderma* são utilizadas em tratamento de sementes ou aplicados em vastas áreas de cultivo para o controle biológico de doenças de plantas e promoção do crescimento vegetal. Por isso, trabalhos de pesquisa com *Trichoderma* spp. vem sendo cada vez mais demandados. É importante mencionar que, pela compatibilidade do fungo com outros métodos de controle de doenças, o mesmo pode ser integrado a outras técnicas de manejo de doenças (Carvalho et al., 2015; Abreu e Pfenning, 2019).

O potencial das espécies de *Trichoderma* como agente de controle biológico foi reconhecido primeiramente por Weindling (1936), que realizou em série de pesquisas na década de 1930, determinando a ação micoparasítica desse fungo sobre o patógeno *Rhizoctonia*. Desde então, várias espécies do gênero vêm sendo pesquisadas e desenvolvidas como agentes de biocontrole para diversos patógenos (Mello et al., 2007).

A capacidade de *Trichoderma* para controlar/reduzir o efeito negativo causado por outros microrganismos se deve a diferentes mecanismos de ação desenvolvidos por este fungo (Sharma 2011). Os mecanismos de biocontrole além de complexos, são influenciados pelas condições ambientais e pela presença de outros microrganismos (Howell, 2003). Dentre os mecanismos de ação desenvolvidos por *Trichoderma* estão os de contato direto que são a antibiose, o micoparasitismo e a competição por espaço e

nutrientes; como interação indireta estão a indução de resistência e promoção de crescimento de plantas (Kumar 2013; Machado et al., 2012; Mello et al., 2020).

Antibiose é o mecanismo que consiste na associação entre dois organismos com prejuízos ao menos para um dos dois, em razão da produção de compostos antimicrobianos, principalmente metabólitos secundários (MSs), sejam eles metabólitos voláteis (MVs) ou metabólitos não voláteis (MNVs). Os compostos incluem antibióticos, enzimas líticas, substâncias voláteis, sideróforos, peptídeos, proteínas, fenóis, terpenos, policetídeos, entre outros (Benítez et al. 2004; Marques et al., 2018; Mello et al., 2020). Ensaio *in vitro* demonstraram a capacidade de metabólitos secundários produzidos por espécies de *Trichoderma* para inibir o crescimento micelial de fitopatógenos de solo, como de *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium dahliae*, e *S. sclerotiorum* (Isaias et al., 2014). Em outro estudo realizado avaliando inibição do crescimento, mas nesse caso, encontrava-se a fase anamórfica *Ceratocystis paradoxa* na cultura do coqueiro, as espécies antagonistas *T. viridae*, *T. harzianum* e *T. polysporum* inibiram em até 60% o crescimento de *C. paradoxa* (Kannangara et al., 2017).

Micoparasitismo é um processo que consiste na destruição da parede celular do fitopatógeno, que pode ocorrer pela ação de enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas pelos agentes de biocontrole (Melo 1998). A interação entre patógeno-hospedeiro exige um período longo de contato, que pode ser físico ou metabólico com digestão de enzimas hidrolíticas como, quitinases, proteases, glucanases e lipases (Bettiol 1991; Romão-Dumaresq et al., 2012). Por meio da liberação de estímulos químicos pelo patógeno, o micoparásita o identifica e ataca as hifas, estruturas de reprodução e de sobrevivência e, assim, reduz a quantidade de inóculo e, conseqüentemente, a infecção (Steindorff, 2016).

Já a competição é a interação entre dois organismos, ou mais, que estão em busca de um mesmo recurso, como espaço, nutrientes, água, e o uso destes reduz a quantidade disponível para o outro (Bettiol 1991; Mello et al., 2020). Para que os fitopatógenos sejam capazes de infectar a hospedeira, eles precisam, em sua maioria, penetrar e colonizar o tecido da planta internamente, entretanto, os agentes de biocontrole agem justamente nesse processo, impedindo o acesso aos nutrientes da hospedeira pelo fitopatógeno. Dessa forma, é considerado um bom agente de biocontrole de fungos aquele que apresenta rizocompetência, ou seja, habilidade em colonizar raízes vegetais, ocupando os sítios de penetração/infecção que são utilizados pelo patógeno (Mello et al., 2020; Montalvão et al., 2020).

O mecanismo indireto de indução de resistência, também conhecido como indução de proteção ou imunidade, é o processo em que as plantas estão expostas a algum fator que possa apresentar risco para ela, seja biótico ou abiótico, e, com isso, ativa seus mecanismos de defesa latentes (Pascholati et al., 2019). A indução de resistência e a promoção de crescimento são fatores que estão interligados, pois, a planta mantém-se protegida e em crescimento constante mesmo com a presença do patógeno. Em um estudo realizado por Silva e colaboradores (2011), foram avaliados isolados de *Trichoderma* para promoção de crescimento e indução de resistência em pepineiro no controle de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose, os resultados obtidos para promoção de crescimento atingiram 100% e a proteção da cultura contra antracnose 88,39%.

Existem relatos de *Trichoderma* antagonizando *T. paradoxa* por diferentes mecanismos de ação. Vale citar os trabalhos conduzidos por Silva e colaboradores (2019) por ensaios *in vitro* utilizando o método de culturas pareadas (Weindling 1932), utilizando *Trichoderma* spp. contra os fungos *T. paradoxa* e *Fusarium oxysporum*. Os autores relataram a inibição do crescimento dos patógenos em 83,61% para *Fusarium oxysporum* e 79,16% para *T. paradoxa*. Talukder e colaboradores (2007) realizaram ensaios *in vitro*, mostrando que houve inibição do crescimento micelial de *T. paradoxa*. e *in vivo* foi demonstrado que a brotação e produtividade apresentaram resultados melhores quando comparados às mudas não tratadas com o antagonista. Esses são resultados satisfatórios utilizando uma linhagem *T. harzianum*.

A podridão abacaxi na cana-de-açúcar pode causar danos irreversíveis ao estabelecimento da cultura, levando, em alguns casos, ao replantio, pelo não brotamento devido à severidade da doença. Considera-se, portanto, que *Trichoderma* spp. podem apresentar-se como aliados ao sistema de manejo da cana-de-açúcar em condições de campo e podem ser integrados de maneira que venha a proporcionar maior resistência e produtividade para a cultura.

### 3. JUSTIFICATIVA

*Thielaviopsis spp.*, causador da podridão abacaxi, tem sido responsável por sérios prejuízos à cultura da cana-de-açúcar. O fato de a podridão abacaxi impedir, principalmente, a brotação das gemas e se referir a um patógeno de solo, reveste-se de importância, especialmente pela dificuldade na aplicação de medidas de controle. O Centro-Oeste do Brasil vem se firmando na exploração dessa cultura. Entretanto, a janela de plantio para essa região coincide com a estação de inverno, caracterizada por baixas temperaturas, entre 19° C a 25° C, favorável à ocorrência da doença. Certas espécies/linhagens de *Trichoderma* atuam como agentes de biocontrole por diferentes mecanismos de ação e possuem potencial para serem utilizados no controle desta doença. Entre os mecanismos de ação desses fungos, estão a antibiose, o micoparasitismo e a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) e não voláteis. Esses fungos são também relatados como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças. No entanto, ainda se conhece pouco sobre as interações de linhagens de *Trichoderma* contra o patógeno *Thielaviopsis sp.*, alvo deste estudo. Dessa forma, foi proposto, nesta dissertação de mestrado, avaliar a capacidade antagônica das linhagens de *Trichoderma* da Coleção da Embrapa contra esse patógeno e determinar os mecanismos de ação envolvidos no biocontrole. A escassez de informações disponíveis na literatura especializada, como verificado na principal plataforma brasileira para busca de trabalhos científicos (Periódicos CAPES) sobre o tema, justificou a realização deste trabalho, com os objetivos descritos a seguir.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de linhagens de *Trichoderma* para o controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

### 4.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar quinze linhagens de *Trichoderma* quanto à capacidade para inibir o crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp. por meio de ensaios *in vitro* como, pareamento de culturas;
- II. Avaliar a inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp. por compostos orgânicos voláteis e não voláteis termoestáveis produzidos por *Trichoderma* spp.
- III. Realizar ensaios para comparação entre linhagens de *Trichoderma* da Coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com a linhagem comercial registrada para controle da doença, quanto à capacidade de suprimir o patógeno/doença, em laboratório e casa de vegetação.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Local dos experimentos

Os ensaios *in vivo* e *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação, ambos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), em Brasília, Distrito Federal, no período compreendido entre janeiro de 2022 a novembro de 2022.

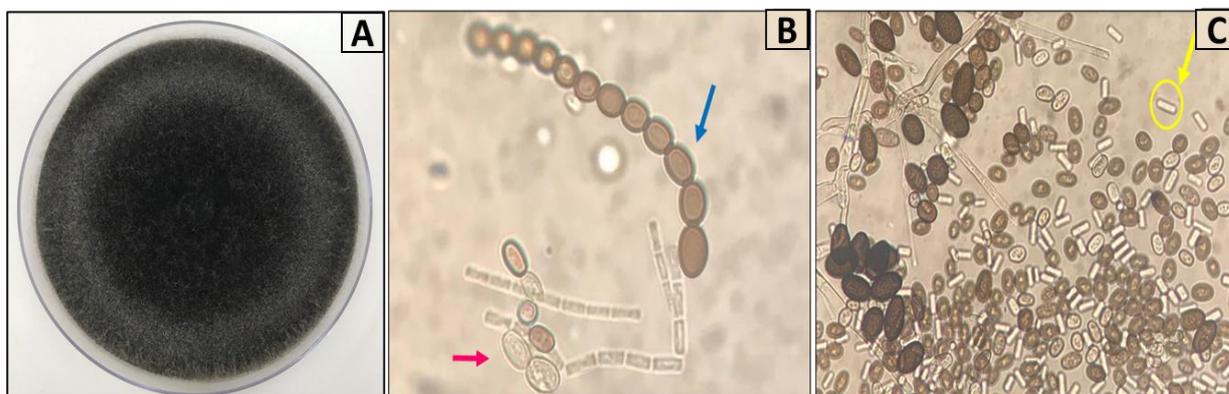
### 5.2. Origem e preservação das linhagens *Trichoderma* utilizadas e do patógeno *Thielaviopsis* sp.

Os isolados de *Trichoderma* utilizados neste estudo (Tabela 1) pertencem à Coleção de Agentes de Controle Biológico da Embrapa abrigada no CENARGEN e foram escolhidos com base em testes anteriormente conduzidos com outros patógenos. A linhagem comercial (ESALQ-1306), descrita como pertencente à espécie *T. harzianum*, foi incluída neste estudo, pelo fato de ela ser indicada para controle da doença em questão, essa linhagem foi inserida na Coleção através do seu cultivo monospórico e adquiriu o código CEN219. As culturas, após reativação em meio a base de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), foram mantidas à temperatura de 10° C, em tubos de ensaio contendo 20 ml do mesmo meio. Para a instalação dos experimentos, amostras retiradas desses tubos de ensaio foram cultivadas por cinco dias em placas de Petri contendo meio BDA.

O patógeno *Thielaviopsis* sp. (CEN1647) foi isolado a partir de amostras de cana-de-açúcar ‘RB074046’, que apresentava os sintomas de escurecimento dos tecidos e o odor de abacaxi. Realizou-se o plaqueamento de partes do tecido do colmo que indicavam a transição entre o tecido sadio e o infectado. As colônias crescidas em meio BDA apresentavam coloração escura e observou-se, em exames microscópicos, os dois tipos de esporos unicelulares característicos de *Thielaviopsis*: microconídios pequenos, hialinos em forma de bastonete em cadeia; macroconídios cilíndricos a ovais, ou até mesmo, levemente elipsoides e de coloração pardo-escura (Figura 1). Essas características foram relatadas por autores ao realizarem a identificação morfológica de *Thielaviopsis* sp. (Edgerton, 1910; Tokeshi 1997; Nascimento et al., 2020; Alhudaib et al., 2022)

**Tabela 1.** Linhagens de *Trichoderma* pertencentes à Coleção de Microrganismos para o Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas do CENARGEN e produto comercial à base de *Trichoderma* empregados neste estudo.

Nº	Códigos	Espécie	Solo/substrato	Local de origem
1	CEN 162	<i>T. asperelloides</i>	Arroz	Goianira/GO
2	CEN 167	<i>Trichoderma</i> sp.	Goiaba	Rio Verde/GO
3	CEN 201	<i>T. asperellum</i>	Solo da raiz de <i>Vochysiaceae</i>	Itacajá/TO
4	CEN 281	<i>T. afroharzianum</i>	Algodão	Copebrás/GO
5	CEN 287	<i>T. afroharzianum</i>	Algodão	Copebrás/GO
6	CEN 288	<i>T. rifaii</i>	Algodão	Copebrás/GO
7	CEN 511	<i>T. brevicompactum</i>	Goiaba	Petrolina/PE
8	CEN 1070	<i>Trichoderma</i> sp.	Tomate	Brasília/DF
9	CEN 1075	<i>Trichoderma</i> sp.	Tomate	Brasília/DF
10	CEN 1080	<i>Trichoderma</i> sp.	Tomate	Brasília/DF
11	CEN 1242	<i>T. azevedoi</i>	Milho	Rajadinha/DF
12	CEN 1277	<i>T. asperelloides</i>	Salsa	Rajadinha/DF
13	CEN 1513	<i>T. koningiopsis</i>	Cacau	Manaus/AM
14	CEN 1546	<i>T. afroharzianum</i>	Pantanal	Poconé/MT
15	CEN 1559	<i>T. asperelloides</i>	Pantanal	Poconé/MT
16	CEN219 (ESALQ-1306)	<i>T. harzianum</i>	Formulação comercial	-
17	CEN1647	<i>Thielaviopsis</i> sp.	Cerrado Nativo	Tuverlândia/GO



**Figura 1.** Microconídios e macroconídios de *Thielaviopsis* sp. visualizados ao microscópio óptico/40x. **A:** Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). **B:** macroconídios (aleuroconídios ou clamidósporos) em cadeia maduros (seta azul) e imaturos (seta vermelha). **C:** microconídios (artroconídios) (seta amarela).

### 5.3. Experimentos

#### 5.3.1. Pareamento de culturas

Para o experimento acerca da inibição do crescimento micelial foram previamente cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) o patógeno (*Thielaviopsis* sp.), o antagonista (*Trichoderma* spp. e a linhagem comercial ESALQ-1306), em câmara de crescimento (25°C), dotada de fotoperíodo (12 horas), por 5 dias. Discos de micélio (5 mm de Ø) retirados de cada colônia foram colocados a 1 cm da borda de uma nova placa de Petri (90 mm Ø) contendo o mesmo meio de cultura, em lados opostos (Weindling, 1932 & 1934). O tratamento controle/testemunha consistiu na placa que continha apenas o patógeno em uma das extremidades da placa. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a partir do momento em que ocorreu a ocupação completa da superfície da placa em que continha apenas o fungo fitopatogênico, aos 3 dias após incubação (DAI), esta análise foi realizada para obtenção dos dados estatísticos. Houve uma segunda avaliação qualitativa das placas que ocorreu após 4 dias da primeira avaliação, totalizando 7 dias de incubação.

Ao fim do período de cultivo, foram tomadas as medidas do diâmetro das colônias com auxílio de uma régua milimetrada. Os cálculos de percentuais de inibição foram realizados pela fórmula:  $I = (C-T/C) \times 100$ , onde I = índice de inibição (%); C diâmetro das colônias na placa controle e; T = diâmetro das colônias do patógeno nos pareamentos. Cada tratamento continha quatro repetições, o experimento foi conduzido duas vezes em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos, percentuais de inibição do crescimento micelial, foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

#### 5.3.2. Testes de produção de compostos orgânicos voláteis bioativos

Na exposição aos compostos orgânicos voláteis, os isolados de *Trichoderma* spp. foram previamente cultivados em meio BDA, por 5 dias, a 25° C e fotoperíodo de 12 horas. Discos (5 mm de Ø) do meio contendo o micélio foram transferidos para bases de novas placas de Petri (90 mm Ø), contendo meio BDA. Após incubação por 96 horas à

25°C e fotoperíodo de 12 horas, discos de meio BDA colonizado por *Thielaviopsis* sp. foram transferidos para outras bases de placas, também contendo o meio BDA. Em seguida, as bases que continham o patógeno foram sobrepostas àquelas em que estava o *Trichoderma*. Para realização desse experimento, as linhagens de *Trichoderma* foram cultivadas quatro dias (96 horas) antes da montagem do experimento de atmosfera compartilhada, devido a relatos de que quando o antagonista está em sua fase de esporulação, sua capacidade para inibir o crescimento micelial do patógeno é maior (Silva et al., 2021). Para unir as bases das placas sobrepostas, foi utilizado Parafilm. O conjunto foi selado com filme plástico transparente. Em câmara de crescimento à 25°C com fotoperíodo de 12 horas, as combinações foram distribuídas ao acaso, mantendo sempre o patógeno na posição superior do conjunto. Os tratamentos controle/testemunha consistiram em combinações de placas que continham o patógeno na parte superior e apenas meio BDA na parte inferior (Dennis & Webster, 1971).

As avaliações foram realizadas quando o tratamento controle, havia colonizado todo o meio BDA. Tomaram-se as medidas do diâmetro das colônias com auxílio de uma régua milimetrada, conforme mencionado anteriormente. Os cálculos de percentuais de inibição foram dados pela fórmula:  $I = (C-T/C) \times 100$ , onde I = índice de inibição (%); C diâmetro das colônias na placa controle e; T = diâmetro das colônias do patógeno nos pareamentos. O experimento foi conduzido duas vezes em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos, percentuais de inibição do crescimento micelial, foram submetidos à análise de variância e, as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

### 5.3.3. Testes para detecção de compostos termoestáveis bioativos em filtrados de cultura

O patógeno *Thielaviopsis* sp. foi exposto aos filtrados de culturas das oito linhagens de *Trichoderma*, após autoclavagem. Para isso, foram distribuídos 150 ml de meio líquido (Batata-Dextrose-BD) em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 ml. Os frascos receberam três discos de micélio das colônias de *Trichoderma*, individualmente. As culturas foram mantidas sob agitação por sete dias, a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , com rotação de 150 rpm (rotações por minuto). Os filtrados foram, então, coletados em gaze esterilizada e incorporados, individualmente, à alíquota de meio BDA destinada ao

cultivo do patógeno, na proporção de 25% (Guimarães et al., 2016, adaptado). Após autoclavagem à (temperatura de 121 °C por 20 minutos), os meios contendo filtrado de *Trichoderma* foram vertidos em placas de Petri (90 mm de Ø) e um disco de micélio de 5 mm de diâmetro (Ø), colonizado com patógeno foi depositado centralmente na superfície do meio. Placas contendo meio sem adição de filtrado de *Trichoderma* foram utilizadas como tratamento controle/testemunha. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com nove tratamentos (isolados de *Trichoderma* + controle/testemunha) e quatro repetições, conduzido em triplicata.

A avaliação foi realizada a partir da medição dos diâmetros das colônias do patógeno e cálculo das porcentagens de inibição do crescimento micelial. Os dados foram submetidos à análise de variância e, as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, à 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

#### **5.3.4. Exposição aos compostos orgânicos voláteis produzidos pelas linhagens de *Trichoderma* em diferentes fases de desenvolvimento**

Com base nos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* anteriores, foram selecionadas quatro linhagens com os melhores resultados de supressão do patógeno para que fossem avaliadas em casa de vegetação. Essas linhagens foram testadas em outros dois ensaios *in vitro*, para verificar o melhor tempo de inibição que possam ocorrer em um ambiente de campo. Para tanto, foi realizado o primeiro ensaio, para o qual se utilizou a metodologia do item 5.3.2, porém, com algumas alterações. O antagonista foi previamente cultivado e adotado o sistema fechado após os diferentes períodos de cultivo, quais foram: 96 horas, 72 horas, 48 horas, 24 horas e 0 hora. Discos de cultura das linhagens de *Trichoderma* foram transferidos para o centro de placas de Petri (90 mm diâmetro de Ø) contendo meio BDA e acondicionadas em câmara de crescimento à  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, cada placa preparada com o respectivo tempo de crescimento. O patógeno foi repicado somente no dia da montagem do sistema, utilizando o mesmo procedimento, sendo o disco de cultura colocado no centro de outras bases de placa de Petri, sobre o meio BDA. Foram, então, sobrepostas as bases de placas com o antagonista, combinado ao patógeno, sendo o sistema vedado com Parafilm® e selado com plástico filme transparente. Em câmara de crescimento a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas, as combinações de culturas foram distribuídas de maneira casualizada,

mantendo sempre o patógeno na posição superior do conjunto. O experimento foi realizado em duplicata. Os tratamentos controle/testemunha foram preparados da mesma forma, porém consistindo em combinações de placas com o patógeno na parte superior, e a inferior, contendo meio BDA sem o antagonista.

A avaliação foi realizada a partir da medição dos diâmetros das colônias dos patógenos e cálculo das porcentagens de inibição do crescimento micelial, em relação ao controle utilizando a fórmula:  $I = (C - T) / C \times 100$ , onde I representa a porcentagem de inibição, C o valor da medida de diâmetro da cultura dos patógenos nos tratamentos controle e T, dos valores dos tratamentos com a presença do antagonista. 3

Foram elaborados modelos de ANOVA na tentativa de representar o comportamento de cada linhagem para comparação entre elas e entre os tempos. Para tanto, os modelos seguiram a ideia sobre como as interações podem indicar diferença entre as amostras. Portanto, dentre os modelos elaborados o que melhor representa as amostras é o modelo ‘completo’:  $Y \sim T + P + T * P$ , onde Y é a variável resposta, ou seja, o ICM (índice de crescimento micelial), T é o tratamento, representado pelas linhagens, P é o tempo e T\*P é referente a interação. Este modelo considera interação entre o tratamento e o tempo e, além disso, corrobora a inspeção visual no gráfico de interação que de fato, parece sinalizar a ocorrência dela. O gráfico de resíduos padronizados, gerado pelo programa R, mostrou um razoável padrão de homoscedasticidade e normalidade. Ambas as situações são requisitos da ANOVA. Finalmente, foram realizadas comparações múltiplas de Tukey ao nível de 5% de significância.

### **5.3.5. Avaliação da severidade da podridão abacaxi em cana-de-açúcar na presença de *Trichoderma* spp.**

O segundo ensaio mencionado no item 5.3.4, descrito a seguir, foi conduzido com a variedade CTC20, suscetível ao patógeno. Comumente o plantio de cana-de-açúcar é realizado com colmos que possuem entre 3 e 5 gemas. Um fator importante sobre a quantidade de gemas é a barreira física que a região nodal representa, já que ela dificulta a progressão da infecção causada pelo patógeno à gema, devido a maior quantidade de tecido vegetal até que seja possível atingi-la. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito das linhagens de *Trichoderma* nas condições de ausência de região nodal, impedindo que ocorressem interferências desse fator fisiológico da planta,

de modo a verificar se o antagonista favoreceria a brotação das gemas, minimizando assim a ação do patógeno.

Para obtenção das suspensões de *Trichoderma* spp. e *Thielaviopsis* sp., ambos foram previamente cultivados em arroz parboilizado (200 g/saco de polietileno) umedecido (60% pv-1) e autoclavado (121 °C; 40 min). Foram adicionados doze discos de cultura de 5 mm de diâmetro de cada linhagem. Prepararam-se quatro repetições de cada linhagem de *Trichoderma* e do antagonista. Os sacos foram selados e, durante o período de incubação (13 dias), o conteúdo de cada saco foi esboroados em dias alternados para melhor crescimento e esporulação dos fungos. Para o preparo das suspensões fúngicas, cada saco recebeu 400 ml de água destilada estéril e após agitação, a parte líquida foi coletada e filtrada em gaze estéril. Todas as suspensões foram reservadas para posterior contagem de conídios. As concentrações foram ajustadas para  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^5$  para *Trichoderma* spp. e *Thielaviopsis* sp. (Wickramasinghe et al, 2015; Ajayi et al., 2016)), respectivamente, com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

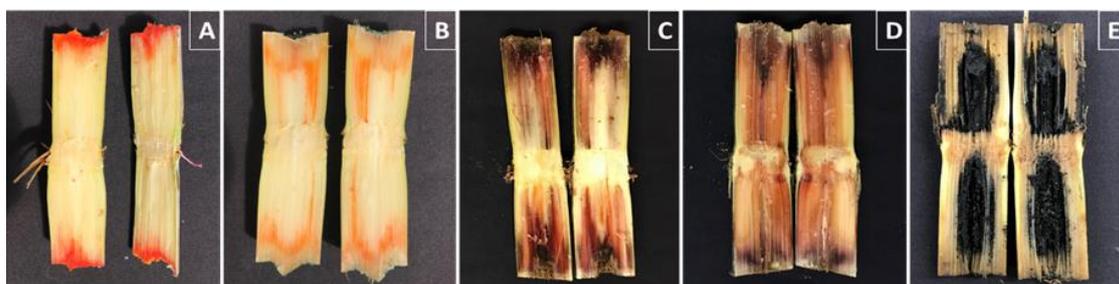
Os mini toletes de cana-de-açúcar, após serem submetidos a desinfestação superficial com álcool 70% (5 minutos), hipoclorito de sódio 1% (8 minutos) e três lavagens em água estéril (1 minuto cada), foram mantidos na câmara em temperatura ambiente, até o tratamento com o antagonista. A suspensão final de *Trichoderma* continha 1 litro, onde quatro mini toletes, que correspondem às repetições por tratamento, foram imersos por um período de 60 minutos. Para tanto, foram revolvidos a cada 15 minutos aproximadamente, evitando-se assim a decantação da suspensão fúngicas, com auxílio de um bastão de vidro. Já os tratamentos testemunha inoculada e não inoculada com o patógeno foram imersos em água destilada autoclavada. A inoculação do patógeno foi realizada após a inoculação com *Trichoderma* spp., utilizando borrifadores manuais previamente ajustados para aspergir 1 ml de suspensão (Wickramasinghe et al, 2015) nos cortes laterais dos mini toletes. Por fim, os mini toletes foram acondicionados em caixas do tipo *Gerbox* previamente esterilizadas (11 cm x 11 cm x 3,5 cm) e forradas com papel-filtro umedecido com água estéril (Figura 2). O material assim preparado foi incubado em câmara de crescimento a  $25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12 horas por 7 dias.



**Figura 2.** Esquematização do ensaio com *Gerbox*, contendo o mini tolete de uma repetição referente à testemunha após 7 dias de incubação (sem qualquer dos tratamentos).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos, sendo eles: linhagens de *Trichoderma*, cepa comercial e testemunhas (com e sem inóculo). Cada tratamento contou com quatro repetições, e o experimento foi executado em duplicata. As avaliações consistiram na observação da colonização do tecido do mini tolete da cana-de-açúcar pelo antagonista e pelo patógeno e mensuração da severidade da doença a partir de uma escala de notas variando de 1 a 5, adaptada de Sansoli-Chanquinie (2015). Essas adaptações consistiram na adição de porcentagens de tecidos afetado para que pudesse ser realizada a análise estatística, sendo assim, a estatística dos dados referentes às notas foram avaliadas com base na média de porcentagem.

As observações visuais dos sintomas da doença foram realizadas ao longo do seu desenvolvimento (Figura 3), nota 1= 0% do colmo infectado, sem sintomas, 2= 25% do colmo infectado, avermelhamento das fibras internas, 3= 50% do colmo infectado com necrose de coloração parda ocorrendo da extremidade para o centro, 4= 75% do colmo infectado apresentando necrose de coloração pardo-escuro e 5= 100% do colmo infectado com necrose por toda a extensão do tecido interno, atingindo coloração negra e exalando o odor característico de essência de abacaxi. Para análise estatística foram utilizadas as porcentagens inseridas em cada nota, e estas foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e tiveram suas médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) através do programa Sisvar 5.6 (Ferreira 2011).

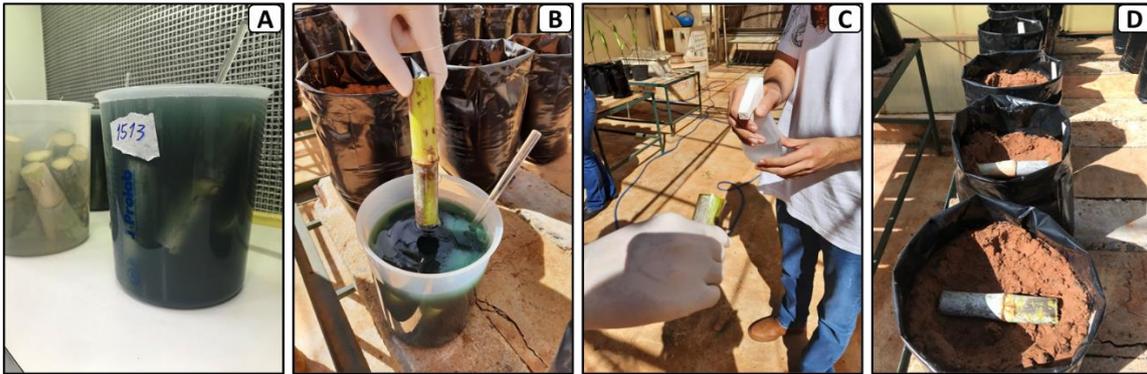


**Figura 3.** Ilustração da escala de notas empregada na avaliação da severidade da doença causada por *Thielaviopsis* sp. em mini toletes de cana-de-açúcar da variedade CTC20. Sendo **A:** referente à nota de severidade 1. **B:** referente à nota 2. **C:** referente à nota 3. **D:** referente à nota 4 e **E:** referente à nota 5.

### 5.3.6. Ação de linhagens de *Trichoderma* quanto ao controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar, em casa de vegetação,

Foi testada *in vivo* a capacidade de linhagens de *Trichoderma* em suprimir o patógeno, *Thielaviopsis* sp., em três ensaios, sendo que o primeiro ficou definido como um ensaio preliminar para observar o desenvolvimento da cultura e avaliar a eficácia da metodologia empregada. Portanto, os dados do primeiro experimento não foram aqui utilizados. Em todos os experimentos seguiu-se a janela de plantio de cana de ano-e-meio, executado entre os meses de maio a agosto. Esse período é caracterizado por temperaturas baixas, típicas do período de inverno, no qual as brotações são prejudicadas por este fator, além de assim, favorecerem a incidência de doenças.

Dessa forma, objetivou-se testar a influência do agente de biocontrole sob o desenvolvimento da planta e controle da doença-alvo em experimento desenvolvido em casa de vegetação. A cultivar utilizada, disponibilizada pela Embrapa Cerrados, foi a CTC20, suscetível ao patógeno. A metodologia seguida para o tratamento dos mini toletes foi a mesma para descrita no item 5.3.5, diferindo apenas na quantidade final de suspensão, que passou a ser 2 litros, mantendo a concentração de *Trichoderma* spp. de  $1 \times 10^8$  conídios/ml para imersão de 10 mini toletes referentes a cada tratamento com o antagonista e as testemunhas inoculada com o patógeno e sem tratamento estas foram imersas em água destilada autoclavada. O plantio foi realizado em sacos plásticos com capacidade para 5 litros, preenchidos com solo esterilizado Embrapa, sendo este, um latossolo vermelho proveniente de barranco (Figura 4).



**Figura 4.** Montagem e execução do ensaio em casa de vegetação. **A:** Mini toletes sendo imersos em suspensão de *Trichoderma* spp. na concentração de  $1 \times 10^8$  por 60 minutos. **B:** Retirada dos mini toletes da suspensão. **C:** Patógeno sendo aplicado via aspersão na concentração de  $1 \times 10^5$  em cada lado do mini tolete e **D:** Plantio em sacos com capacidade para 5 litros.

Em todas as execuções dos ensaios *in vivo* foram utilizadas quatro linhagens da Coleção (CEN281, CEN1277, CEN1513 e CEN1546) e uma cepa comercial (ESALQ-1306). Assim como no ensaio *in vitro*, foram incluídas duas testemunhas, uma inoculada apenas com o patógeno e outra sem nenhum tratamento, um mini tolete sadio.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação por um período de 48 dias, em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento (Figura 5). Para análise estatística, cada um dos plantios foi considerado um bloco. O primeiro experimento, apesar de ter desconsiderado para análise, foi mantido em casa de vegetação entre os dias 21 de junho a 08 de agosto; o segundo entre 12 de julho a 28 de agosto (considerado como primeiro ensaio) e o terceiro de 16 de agosto a 03 de outubro (considerado como segundo ensaio). Durante o período experimental, as plantas foram irrigadas conforme a necessidade.



**Figura 5.** Plantas de cana em casa de vegetação aos 45 dias após o plantio.

Ao final do ensaio, as plantas tiveram suas alturas e diâmetro do colmo mensurados, em seguida, foram retiradas dos sacos de plantio e lavadas cuidadosamente com água corrente para retirada do solo restante. Então, em laboratório, as raízes foram separadas da parte aérea e em seguida colocadas, separadamente, em sacos de papel pardo para secagem em estufa a 80° C por 48 horas, para determinação do peso seco. Já os colmos após retirada das raízes, foram cortados longitudinalmente para observação da severidade da doença e submetidos à análise qualitativa em escala de notas, conforme a escala descrita no item 5.3.5.

Os dados da altura, diâmetro do colmo, peso seco de parte aérea e peso seco de raízes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, as médias, comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) com o uso do programa R. Já os dados sobre a severidade da doença foram obtidos com base em escala de notas (Sansoli-Chanquinie 2015, adaptado) e, para análise estatística, foram utilizadas as porcentagens observadas em cada nota. Esses dados foram também submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), utilizando o programa Sisvar 5.6 (Ferreira 2011).

Foram elaborados dois modelos de ANOVA na tentativa de representar o comportamento de cada linhagem em casa de vegetação para as diferentes variáveis que foram avaliadas. Para tanto, os modelos seguiram a ideia sobre como os tratamentos influenciam nas variáveis respostas, representando melhor essa situação o modelo  $Y \sim T$ , onde Y é a variável resposta (fator) que está sendo avaliada e T o tratamento com as

linhagens de *Trichoderma*, e com isso indicar se os tratamentos explicam os resultados encontrados para cada fator avaliado. Seguidos a isso, o modelo escolhido passou um por testes de normalidade e heterocedasticidade e homoscedasticidade, os testes apresentaram variações entre a normalidade e hetero e homoscedasticidade, motivo que pode ser explicado pois, nas duas execuções realizadas todos os dados analisados apresentaram-se desbalanceados, pois não possuíam o mesmo número de repetições, que pode ter sido ocasionado pela não brotação de gemas, que é afetada pelo patógeno. Dessa forma, o procedimento de comparação múltipla entre os tratamentos foi realizado conforme o procedimento descrito por Herberich et al. (2010). Segundo os autores, o procedimento desenvolvido funciona bem em cenários biologicamente realistas de tamanhos de grupos desequilibrados ou heterogêneos, de não normalidade e heterocedasticidade.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp. pelos isolados de *Trichoderma* pelo método de pareamento de culturas

Tanto as linhagens da Coleção da Embrapa Cenargen quanto a comercial inibiram o crescimento micelial do patógeno em pelo menos 38,61%. Os resultados obtidos foram divididos em oito diferentes grupos. Os melhores resultados foram observados nos dois primeiros grupos, cujos valores ultrapassaram os 70% de inibição, com destaque para CEN281 (*T. afroharzinum*), CEN287 (*T. afroharzianum*), CEN288 (*T. rifaii*) e CEN1546(*T. afroharzianum*) (Tabela 2).

Apesar de algumas linhagens não apresentarem bons resultados aos 3DAI, estas foram capazes de se sobreporem à colônia do patógeno aos 7DAI e apresentarem esporulação ou clareamento visível na pigmentação na colônia do patógeno. Este fato foi observado, principalmente, em CEN162 (*T. asperellum*), CEN167 (*T. harzianum*), CEN201 (*T. asperellum*), CEN1070 (*Trichoderma* sp.) e CEN1075 (*Trichoderma* sp.) (Figura 5). Zonas/halos de inibição não foram observadas, devido ao crescimento acelerado do patógeno e do antagonista, fazendo com que a competição por espaço e nutrientes fosse acirrada.

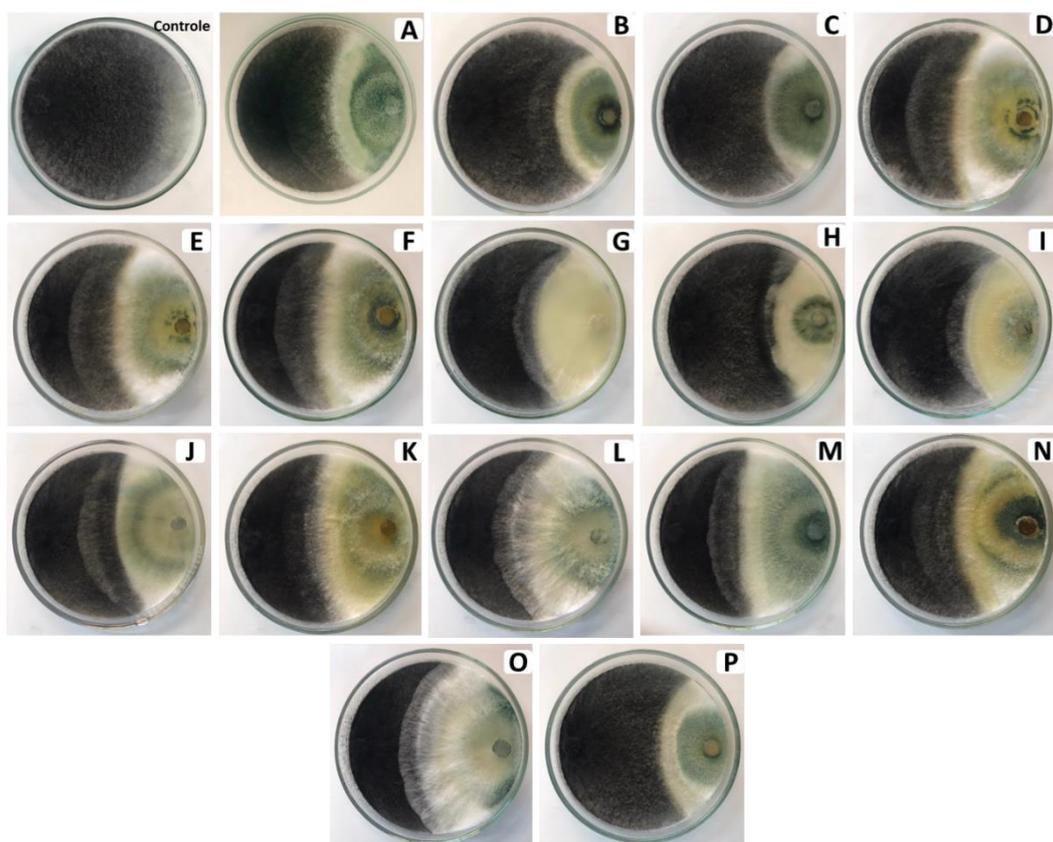
**Tabela 2.** Análise estatística da inibição do crescimento micelial médio (ICM%) aos 3 DAI de *Thielaviopsis* sp. em teste in vitro de pareamento de culturas com 15 linhagens de *Trichoderma* e uma cepa de produto comercial

<b>Linhagens</b>	<b>Espécie</b>	<b>ICM (%)</b>
CEN162	<i>T. asperelloides</i>	60,5±3,79 e*
CEN167	<i>Trichoderma</i> sp.	52,2±1,06 g
CEN201	<i>T. asperellum</i>	38,6±1,66 h
CEN281	<i>T. afroharzianum</i>	76,3±1,66 a
CEN287	<i>T. afroharzianum</i>	73,6±1,06 b
CEN288	<i>T. rifaii</i>	75,8±0,55 a
CEN511	<i>T. brevicompactum</i>	55,8±2,1 f
CEN1070	<i>Trichoderma</i> sp.	41,1±1,57 h
CEN1075	<i>Trichoderma</i> sp.	54,7±1,06 f
CEN1080	<i>Trichoderma</i> sp.	65,8±1,06 d
CEN1242	<i>T. azevedoi</i>	60,5±3,79 e
CEN1277	<i>T. asperelloides</i>	68,3±2,31 c
CEN1513	<i>T. koningiopsis</i>	66,6±2,22 d
CEN1546	<i>T. afroharzianum</i>	73,6±1,66 b
CEN1559	<i>T. asperelloides</i>	65±2,31 d
CEN219 (ESALQ-1306)	<i>T. harzianum</i>	39,7±2,4 h
<b>CV** (%)</b>		<b>3,07</b>

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott (P≤0,05).

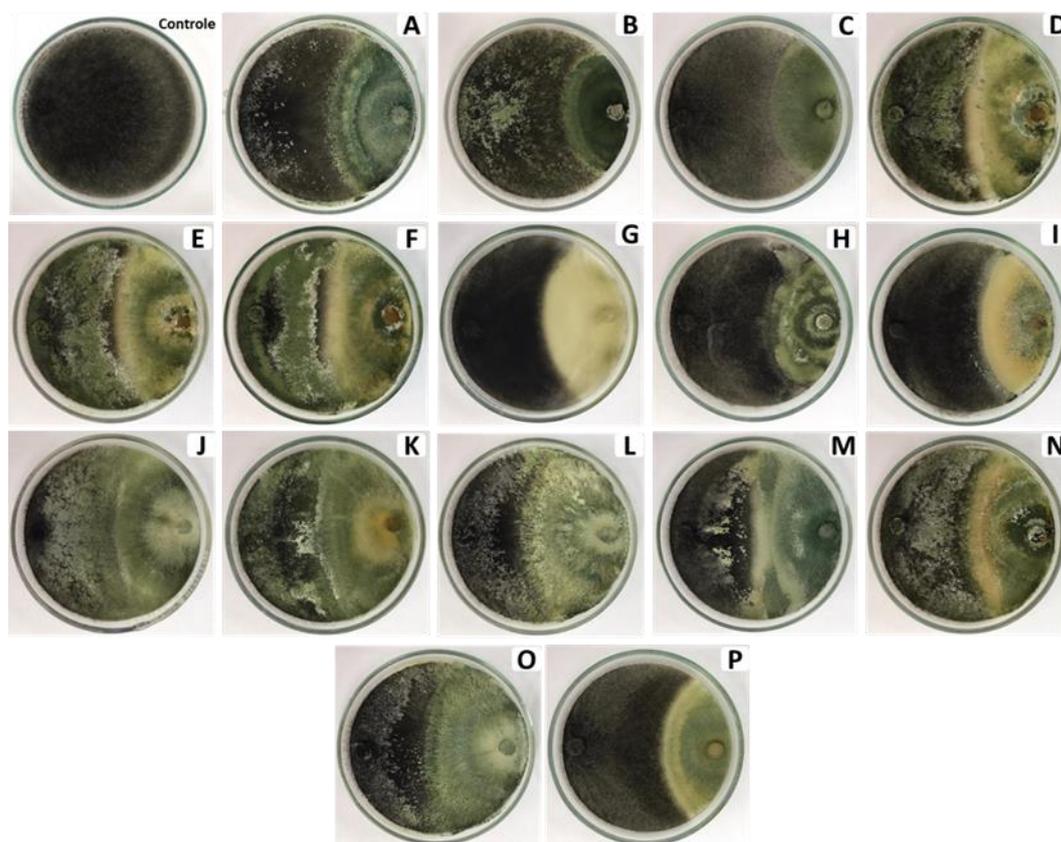
\*\*Coeficiente de Variação (%).

Em geral, os valores médios de inibição do crescimento micelial do patógeno variaram de 38,6% a 76,3% (Tabela 2, Figura 6). Todas as linhagens de *Trichoderma* foram capazes de sobrepor a colônia do patógeno. Apesar de a linhagem comercial não ter exibido uma das melhores médias de inibição do crescimento de *Thielaviopsis* sp., com base na análise visual da placa, a colônia do patógeno apresentou coloração mais clara em comparação com o controle, sugerindo, portanto, que a presença do fungo antagonista afetou o crescimento do fungo fitopatogênico.



**Figura 6.** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Thielaviopsis* sp. após três dias de incubação. **A:** CEN162. **B:** CEN167. **C:** CEN201. **D:** CEN281. **E:** CEN287. **F:** CEN288. **G:** CEN511. **H:** CEN1070. **I:** CEN1075. **J:** CEN1080. **K:** CEN1242. **L:** CEN1277. **M:** 1513. **N:** CEN1546. **O:** CEN1559 e **P:** ESALQ-1306.

Observou-se que algumas das linhagens, apesar de não apresentarem os melhores resultados em relação à média de inibição, visivelmente as colônias estão sobre o patógeno (Figura 7), como é o caso em CEN167 (*T. harzianum*), CEN1070 (*Trichoderma* sp.) e CEN1075 (*Trichoderma* sp.). Nesses casos, as colônia do antagonista aparentemente se desenvolve pelas laterais da placa e pode-se inferir que esta foi uma forma de atacar o patógeno ou tentativa de atingi-lo no ponto inicial de crescimento. No caso do CEN1080 (*Trichoderma* sp.), a colônia do antagonista apresenta o mesmo comportamento, mas é possível observar que aos sete dias do início da incubação (Figura 7J) a colônia do patógeno quase não pode ser observada. O mesmo ocorreu, principalmente, com as linhagens que apresentaram os melhores resultados de inibição do crescimento micelial, onde o patógeno foi encoberto pelo micélio do antagonista.



**Figura 7.** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Thielaviopsis* sp. após sete dias de incubação. **A:** CEN162. **B:** CEN167. **C:** CEN201. **D:** CEN281. **E:** CEN287. **F:** CEN288. **G:** CEN511. **H:** CEN1070. **I:** CEN1075. **J:** CEN1080. **K:** CEN1242. **L:** CEN1277. **M:** 1513. **N:** CEN1546. **O:** CEN1559 e **P:** ESALQ-1306.

Com base nos resultados obtidos no experimento de pareamento de culturas, foram selecionadas as oito melhores linhagens, com melhores índices de inibição do crescimento micelial do patógeno aos três dias de incubação. Levou-se em conta que essas linhagens alcançaram bons resultados aos três dias de cultivo frente a esse patógeno de crescimento rápido e agressivo, podendo-se inferir uma tendência a apresentar bons resultados também em outros experimentos em que serão avaliados outros mecanismos de ação de *Trichoderma*.

## **6.2.** Inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp. por meio da exposição aos compostos orgânicos voláteis de linhagens de *Trichoderma*

Foram utilizadas oito linhagens do antagonista, incluindo a comercial. A avaliação do crescimento micelial do patógeno em atmosfera compartilhada resultou na

inibição do crescimento do patógeno por todas as oito linhagens; as porcentagens de inibição foram de pelo menos 19% e formaram-se dois diferentes grupos estatísticos (Tabela 3). As linhagens que apresentaram melhores resultados foram CEN1277 (*T. asperelloides*) e a comercial CEN2019 (ESALQ-1306 - *T. harzianum*). Outras duas linhagens pertencentes à Coleção que apresentaram resultados superiores a 30% de inibição foram CEN281 (*T. afroharzianum*) e CEN1242 (*T. azevedoi*). Apesar de o antagonista ter sido cultivado por um período de 96 horas antes da montagem do conjunto, algumas linhagens não foram capazes de inibir totalmente a formação de micélio do patógeno, indicando como o patógeno é agressivo e de rápido crescimento (Figura 7).

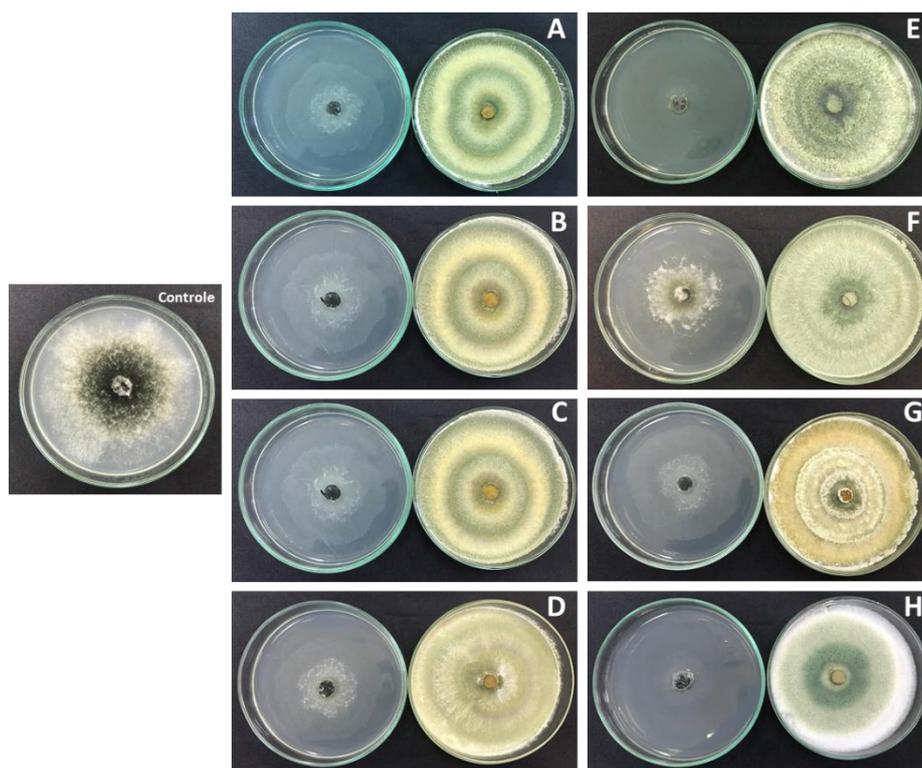
**Tabela 3.** Análise estatística da inibição do crescimento micelial médio (ICM%) de *Thielaviopsis* sp. por compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Trichoderma* spp. e linhagem comercial

<b>Linhagens</b>	<b>Espécie</b>	<b>ICM (%)</b>
CEN281	<i>T. afroharzianum</i>	32,5±16,05 b*
CEN287	<i>T. afroharzianum</i>	24,5±6,95 b
CEN288	<i>T. rifaai</i>	19,0±6,42 b
CEN1242	<i>T. azevedoi</i>	30,5±6,77 b
CEN1277	<i>T. asperelloides</i>	65,9±6,09 a
CEN1513	<i>T. koningiopsis</i>	20,5±8,81 b
CEN1546	<i>T. afroharzianum</i>	21,9±5,37 b
CEN219 (ESALQ-1306)	<i>T. harzianum</i>	62,0±10,9 a
<b>CV** (%)</b>		<b>26,04</b>

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

\*\*Coeficiente de Variação (%).

Além dos dados sobre o índice de crescimento micelial, foi possível observar que os resultados de porcentagens de ICM (%) condizem com o comportamento do patógeno quando em contato com a colônia de *Trichoderma* que já estava cultivado há 96 horas (Figura 8).



**Figura 8.** Culturas de *Thielaviopsis* sp. após três dias de exposição aos compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma* spp. **A:** CEN281. **B:** CEN287. **C:** CEN288. **D:** CEN1242. **E:** CEN1277. **F:** CEN1513. **G:** CEN1546 e **H:** ESALQ-1306.

### 6.3. Inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp. após a exposição aos filtrados de isolados *Trichoderma*

Quando crescido em meio contendo filtrados de culturas de *Trichoderma*, *Thielaviopsis*, foi inibido pela maioria das linhagens do antagonista (Tabela 4. Figura 9).

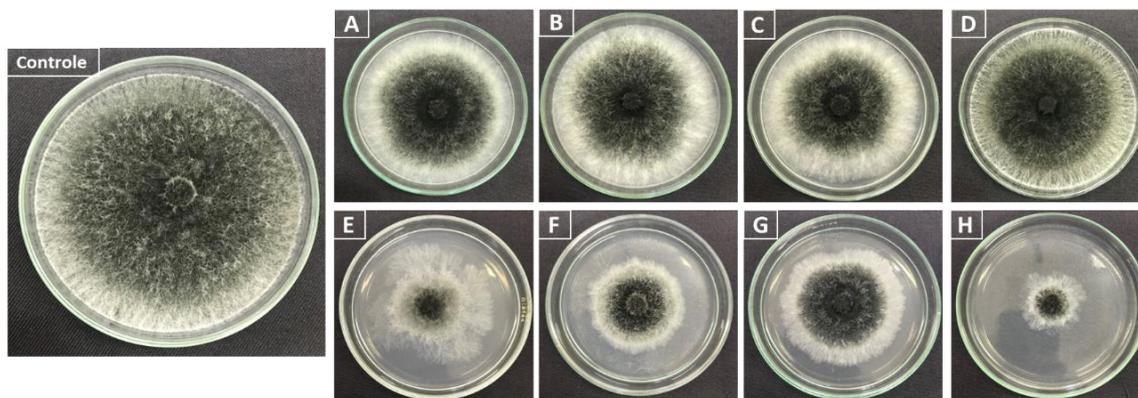
Os tratamentos com as linhagens CEN1513 (*T. koningiopsis*), CEN1546 (*T. afroharzianum*) e CEN1277 (*T. asperelloides*), foram os que apresentaram melhores resultados, com porcentagens médias de 39,1; 21,8 e 19,2%, respectivamente. A linhagem comercial foi a que apresentou mostrou-se superior, com inibição em 57,2% do crescimento micelial, dados estes obtidos na primeira execução. Haja vista que o ensaio foi repetido três vezes e alguns tratamentos apresentaram variações na inibição que podem ter sido ocasionadas por fatores externos não controlados. Apenas CEN1546 (*T. afroharzianum*) permaneceu inibindo o crescimento do patógeno nos três experimentos executados, com valores médios de inibição, variando entre 21,8% e 31,8%, conforme Tabela 4.

**Tabela 4.** Análise estatística da inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp. por filtrados termoestáveis de cultura de *Trichoderma* spp. e cepa de produto comercial

Linhasgens/Espécies	ICM (%)		
	Execução 1	Execução 2	Execução 3
CEN281 – <i>T. afroharzianum</i>	0±0 d*	36,29±2,79 a	31,94±2,33 b
CEN287 – <i>T. afroharzianum</i>	0±0 d	0±0 d	44,58±1,23 a
CEN288 – <i>T. rifaii</i>	2,2±2,56 d	29,02±5,76 b	44,72±2,29 a
CEN1242 – <i>T. azevedoi</i>	0±0 d	0±0 d	0±0 d
CEN1277 – <i>T. asperelloides</i>	19,2±7,8 c	12,77±7,85 c	0±0 d
CEN1513 – <i>T. koningiopsis</i>	39,1±4,71 b	4,72±3,28 d	0±0 d
CEN1546 – <i>T. afroharzianum</i>	21,8±2,64 c	31,85±1,78 b	24,30±2,32 c
CEN219 (ESALQ-1306) <i>T. harzianum</i>	57,2±3,27 a	0±0 d	0±0 d
<b>CV** (%)</b>	13,39	25,2	8,16

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott (P≤0,05).

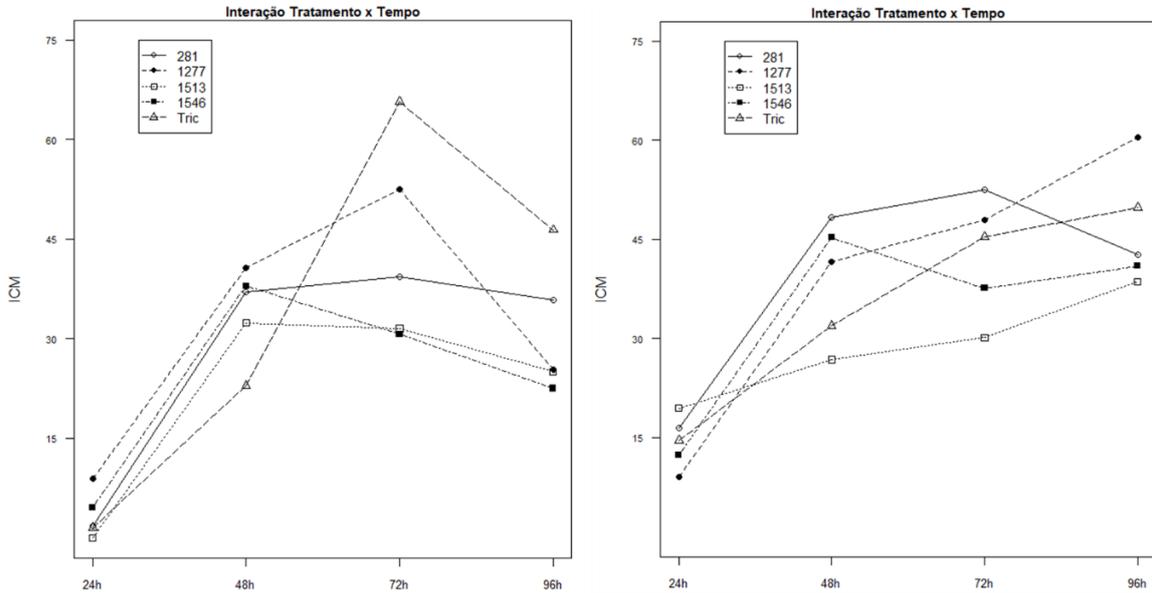
\*\*Coeficiente de Variação (%).



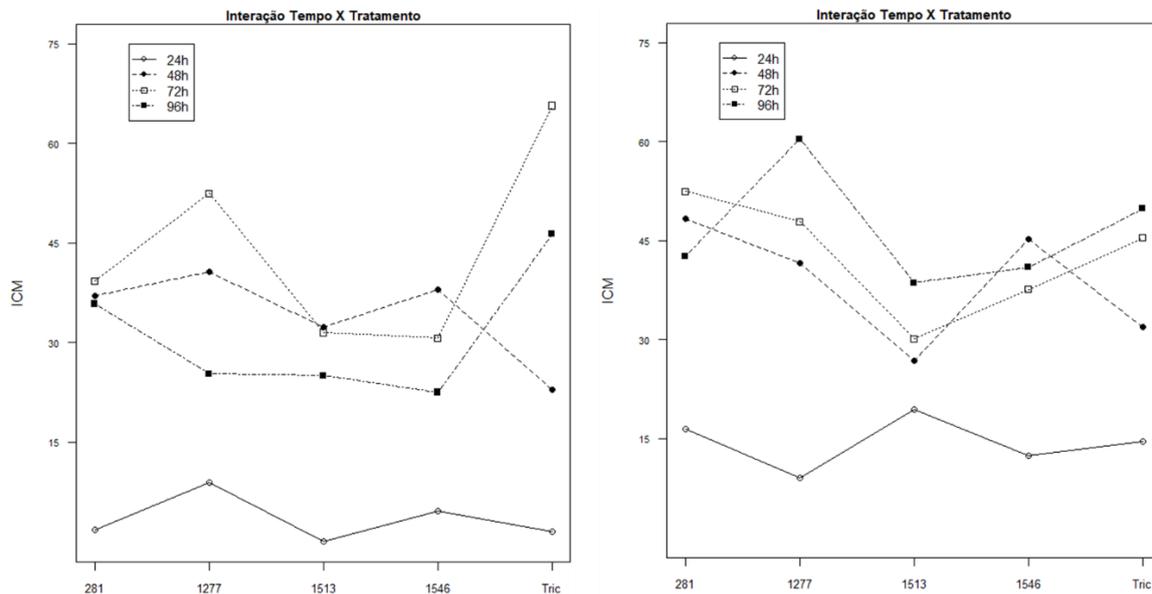
**Figura 9.** Culturas de *Thielaviopsis* sp. crescidas em meios contendo filtrados termoestáveis de *Trichoderma* spp. na primeira execução após três dias de incubação. **A:** CEN281. **B:** CEN287. **C:** CEN288. **D:** CEN1242. **E:** 1277. **F:** CEN1513. **G:** 1546 e **H:** ESALQ-1306.

#### 6.4. Exposição aos compostos orgânicos voláteis pelas linhagens de *Trichoderma* em diferentes fases de desenvolvimento

Verificou-se interação entre os fatores tratamento *versus* tempo, de acordo com as análises que se seguem, tratamento x tempo (Figura 10) e tempo x tratamento (Figura 11).



**Figura 10.** Interação tratamento versus tempo de cultivo. À esquerda execução 1; à direita execução 2.



**Figura 11.** Interação tempo de cultivo versus tratamento. À esquerda execução 1; à direita execução 2.

A interação tratamento x tempo (Figura 10, gráfico à esquerda) evidencia-se ao observar a linhagem ESALQ-1306 ('Trich') que inicialmente nos tempos 24 e 48 horas não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Já os tempos 72 e 96 horas,

parecem diferir das linhagens da Coleção da Embrapa Cenargen. Entretanto, esse resultado não se repete, como pode ser observado na figura 10, à direita, em que a linhagem que parece diferir das demais é CEN1277, no tempo 96 horas. Já na Figura 11 a interação tempo x tratamento indica que os menores índices de inibição ocorreram em 24 horas, em ambas as execuções. Para as linhagens CEN1277 e ESALQ-1306 ('Tric'), os maiores índices se apresentaram em 72 horas, aparentemente, diferindo dos demais tempos na primeira execução (Figura 11 à esquerda). Na segunda execução (Figura 11 à direita) o tempo 96 horas parece diferir dos demais apenas para a linhagem CEN1277.

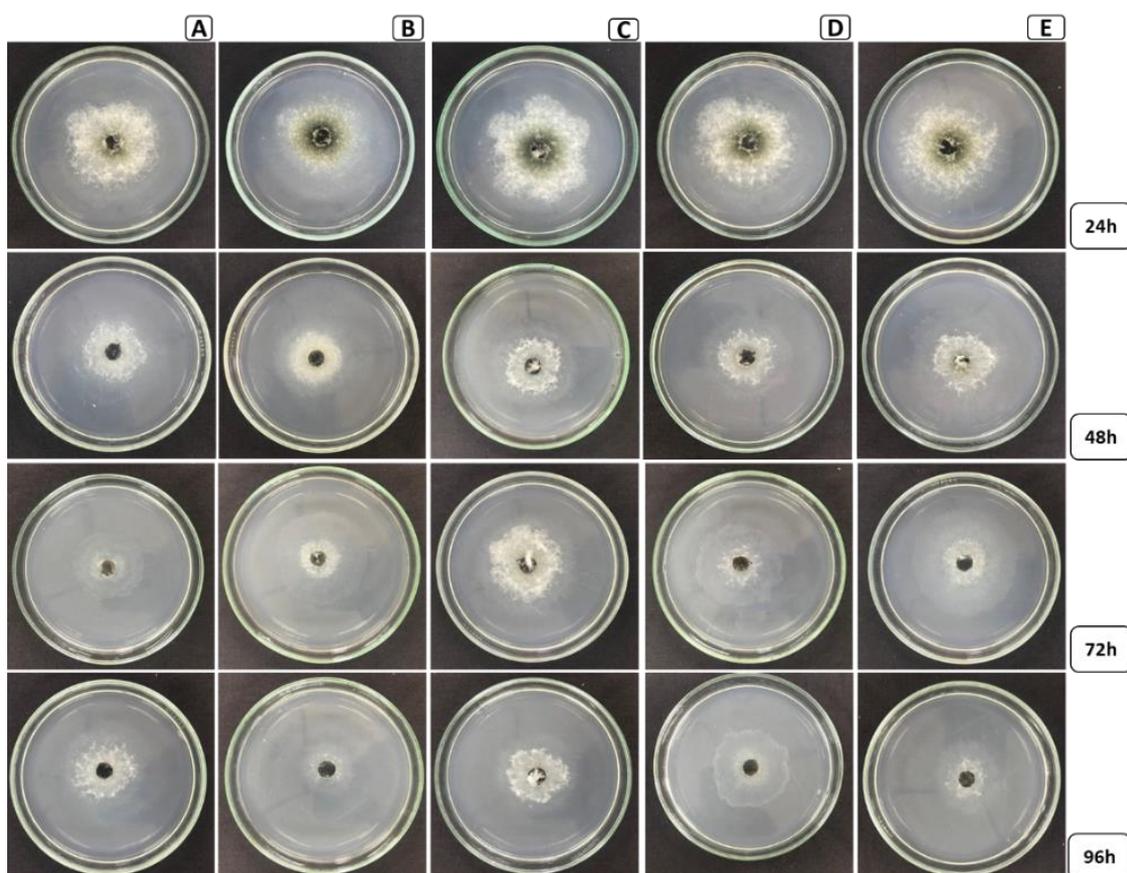
Utilizando quatro linhagens selecionadas para serem avaliadas em casa de vegetação (CEN281, CEN1277, CEN1513, CEN1546) juntamente com a comercial (ESALQ-1306), o experimento dos COVs foi executado na linha do tempo. Todas as linhagens foram capazes e inibir o crescimento do patógeno a partir do tempo de 24 horas de incubação das culturas, seguido pelos períodos de incubação de 48 horas, 72 horas e, finalmente, 96 horas. O tempo 0 (zero) hora não apresentou valores de inibição e foi excluído das análises. Estas foram feitas de duas formas: primeiro a inibição de cada tratamento nos diferentes tempos de crescimento do antagonista; segundo, a inibição em cada tempo, isoladamente, dentro dos diferentes tratamentos.

O ensaio foi realizado em duas vezes e, para alguns tratamentos não houve uma consistência de resultados quanto à inibição tanto entre tratamentos, quanto nos diferentes tempos, nas duas execuções. Isto pode ter ocorrido por se tratar de um organismo vivo e/ou por fatores externos não controlados. Na primeira execução do ensaio, o tempo de desenvolvimento das colônias para o qual se verificaram os menores valores médios de inibição (1,5 a 8,8%), em todos os tratamentos, foi o de 24 horas de crescimento do antagonista. Já no tempo 48 horas de crescimento, as linhagens CEN1513 (*T. koningiopsis*), com 32,3%, e CEN1546 (*T. afroharzianum*), com 37,9%, apresentaram melhores índices de inibição, quando comparados ao tempo 72 horas, em que ocorreu redução na inibição. As linhagens que apresentaram melhores valores médios de inibição, crescidas após 72 horas, foram CEN281 (*T. afroharzianum*), CE1277 (*T. asperelloides*) e ESALQ-1306 (*T. harzianum*), com 39,3%, 52,5% e 65,6%, respectivamente. No tempo de 96 horas todas as linhagens apresentaram redução dos percentuais de inibição, indicando que a emissão de metabólitos voláteis ocorre principalmente entre os tempos de 48 e 72 horas de crescimento do antagonista (Tabela 5. Figura 12).

**Tabela 5.** Análise estatística da inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp. por COVs produzidos em diferentes fases de desenvolvimento de *Trichoderma* spp. na primeira execução

ICM (%) – Linhagens de <i>Trichoderma</i>					
Tempo	CEN281 <i>T. afroharzianum</i>	CEN1277 <i>T. asperelloides</i>	CEN1513 <i>T. koningiopsis</i>	CEN1546 <i>T. afroharzianum</i>	CEN219 (ESALQ-1306) <i>T. harzianum</i>
24 horas	1,8±3,61 a*	8,8±12,31 a	0±0 a	4,5±7,43 a	1,5±3,05 a
48 horas	37,0±10,94 b	40,6±5,58 bc	32,3±16,07 b	37,9±4,61 b	22,9±9,47 b
72 horas	39,3±9,98 b	52,5±3,58 b	31,5±6,15 b	30,6±10,59 b	65,6±3,43 c
96 horas	35,8±4,76 b	25,2±6,22 ac	25±6,71 b	22,5±14,53 ab	46,3±5,85 c

\*Valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey (P≤0,05).



**Figura 12.** Colônias de *Thielaviopsis* sp. desenvolvidas sob exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp., na primeira execução. As figuras nas colunas, em **A:** CEN281. **B:** CEN1277. **C:** 1513. **D:** 1546 e **E:** CEN219. Nas linhas, as respectivas horas.

Já na segunda execução do ensaio ocorreram algumas alterações nas porcentagens de inibição entre tempos de crescimento e entre os tratamentos, com as linhagens de *Trichoderma* (Tabela 6). Porém, isso não descarta a capacidade do antagonista em inibir o crescimento micelial do patógeno, em se tratando de um microrganismo vivo que pode sofrer alterações nos seus mecanismos de ação, devido a modificações no meio externo não controladas. Ainda assim, é possível notar como as placas que continham o antagonista nos diferentes tempos de crescimento inibiram relativamente pouco (no caso de 24h de cultivo, conforme mostra a Figura 12), quando comparada com a placa controle que continha apenas o patógeno (Figura 14).

Ao considerar-se a interação envolvida entre os tratamentos e o tempo de cultivo, como já foi mencionado e ilustrado anteriormente (Figuras 10 e 11), o modelo de ANOVA gerado para representar os dados obtidos na segunda execução corrobora os obtidos na primeira execução, ou seja, a interação entre os tratamentos e o tempo explicam a variável resposta, o ICM. Além disso, o mesmo diagnóstico de normalidade e homoscedasticidade foi gerado para a segunda execução. Finalmente, foram realizadas comparações múltiplas de Tukey ao nível de 5% de significância.

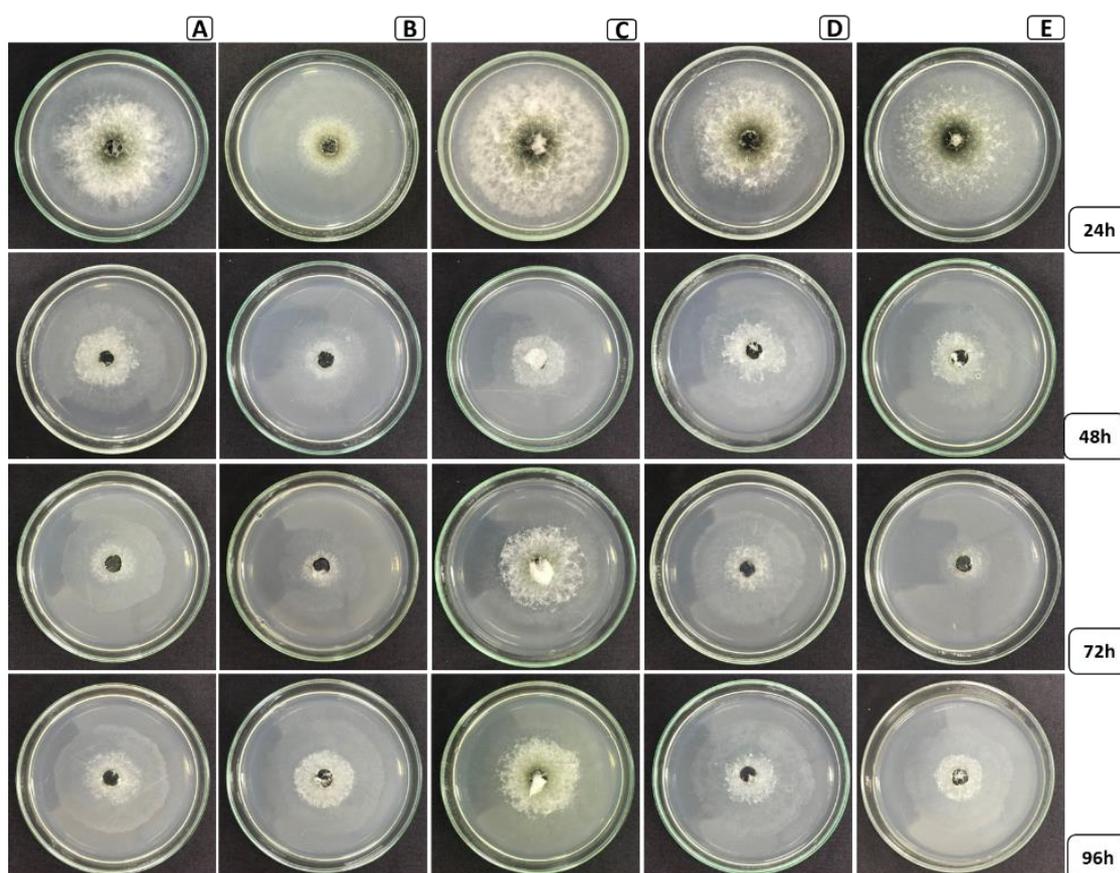
As avaliações do experimento consistiram na observação da interação, em cada sistema, entre tratamentos e tempos de cultivo. Observaram-se diferenças significativas do tempo 24 horas com relação aos demais (48, 72 e 96 horas), para as linhagens CEN281 (*T. afroharzianum*) e CEN1277 (*T. asperelloides*). No caso da linhagem CEN1513 (*T. koningiopsis*) não se detectou diferença estatística para os tempos de cultivo utilizados. O ICM não diferiu significativamente nos tempos 48, 72 e 96 horas, portanto, não houve evidência de que foram significativamente diferentes.

As Figuras 12 e 13 ilustram claramente as culturas dos patógenos em cada sistema, mostrando as colônias no tempo 72 horas menores e com mais falhas de crescimento. Em alguns tratamentos, é quase imperceptível a presença de micélio, quando comparada à Figura 14 referente ao controle. Portanto, evidencia-se que as linhagens de *Trichoderma* foram capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno e, em quase todos os casos, a esporulação das culturas do patógeno.

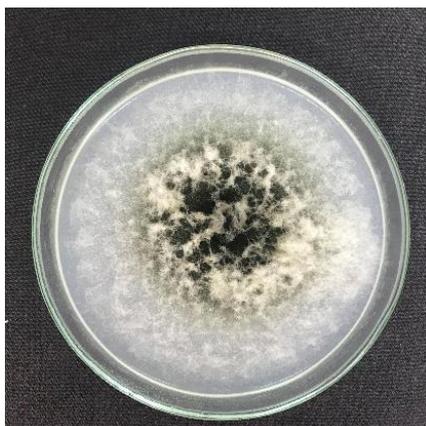
**Tabela 6.** Análise estatística da inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp. por COVs produzidos em diferentes fases de desenvolvimento de *Trichoderma* spp. na segunda execução

ICM (%) – Linhagens de <i>Trichoderma</i>					
Tempo	CEN281 <i>T. afroharzianum</i>	CEN1277 <i>T. asperelloides</i>	CEN1513 <i>T. koningiopsis</i>	CEN1546 <i>T. afroharzianum</i>	CEN219 (ESALQ-1306) <i>T. harzianum</i>
24 horas	16,3±8,96 a	9,0±8,87 a	19,4±5,49 a	12,3±5,59 a	14,5±10,64 a
48 horas	48,3±9,73 b	41,6±5,62 b	26,8±18,24 a	45,2±1,06 b	31,9±9,96 ab
72 horas	52,5±8,33 b	47,9±8,80 b	30,1±14,57 a	37,6±18,29 ab	45,4±15,89 b
96 horas	42,6±18,14 b	60,4±3,66 b	38,6±4,72 a	40,9±11,22 b	49,8±5,11 b

\*Valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 13.** Colônias de *Thielaviopsis* sp. após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. na segunda execução. As figuras nas colunas, em **A**: CEN281. **B**: CEN1277. **C**: 1513. **D**: 1546 e **E**: ESALQ-1306. Nas linhas, as respectivas horas.



**Figura 14.** Colônia de *Thielaviopsis* sp. referente à placa controle apenas com o patógeno (testemunha)

#### **6.5.** Redução da severidade da podridão abacaxi em cana-de-açúcar por *Trichoderma* spp. em laboratório

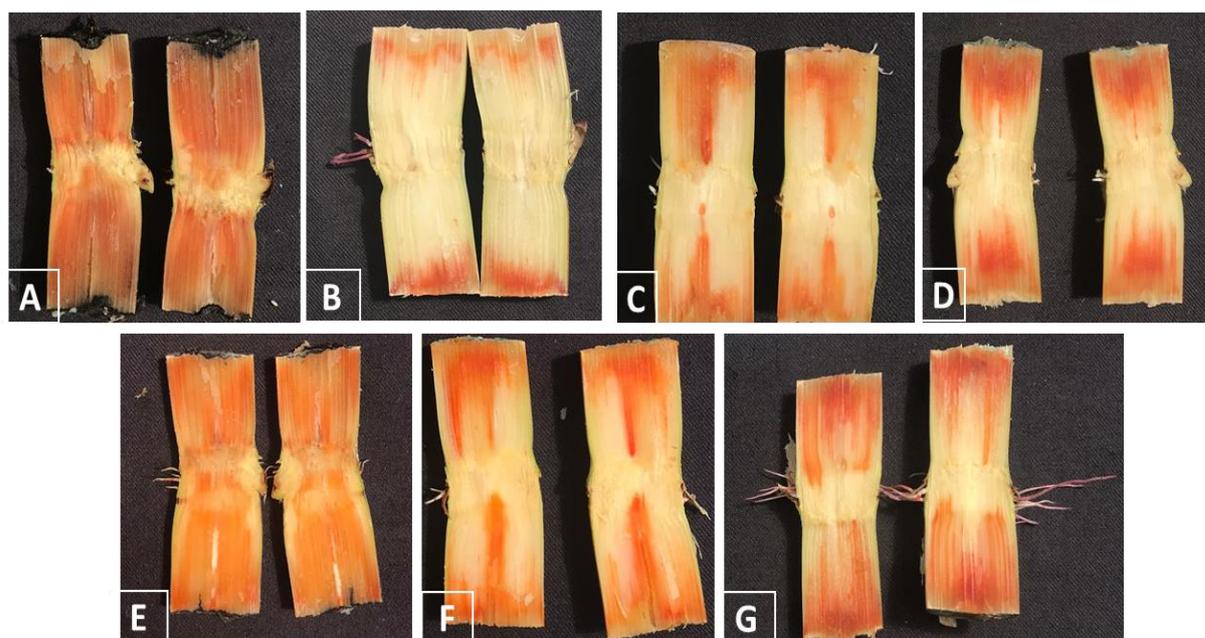
O critério de avaliação com base na escala de notas foi uma abordagem que gerou informações qualitativas e quantitativas sobre a capacidade de *Trichoderma* spp. colonizar e promover diminuição na severidade da doença, por inibir o desenvolvimento do patógeno no tecido vegetal (Figura 15). Após o período de sete dias de incubação, os mini toletes inoculados com o antagonista e com o fitopatógeno apresentaram diferentes níveis de expressão de sintomas da podridão abacaxi.

As médias das notas atribuídas para cada tratamento são apresentadas na Tabela 7. Observa-se que os tratamentos CEN281, CEN1513 e CEN1546 não diferiram estatisticamente entre si e foram os que apresentaram maiores valores médios de severidade da doença, diferindo apenas da testemunha com inoculada com o patógeno e não tratada com antagonista. Os tratamentos com as menores severidades foram CEN1277 e CEN219, com 31,25 e 43,75%, respectivamente. Nenhum dos tratamentos com o antagonista se alocou no mesmo grupo estatístico que a testemunha inoculada. Portanto, todas as linhagens de *Trichoderma* utilizadas neste trabalho foram capazes de suprimir, em algum grau, o desenvolvimento do patógeno no material de plantio, embora em nenhum dos casos tenham se igualado à testemunha sem inóculo (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise estatística das médias dos níveis de severidade de sintomas causados pelo *Thielaviopsis* sp. nos mini toletes de cana-de-açúcar, acondicionados em caixas *Gerbox* aos 7DAI.

Linagem	Espécie	Média de severidade (%)
CEN281	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	62,50 c*
CEN1277	<i>Trichoderma asperelloides</i>	31,25 b
CEN1513	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	68,75 c
CEN1546	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	56,25 c
CEN219 (ESALQ-1306)	<i>Trichoderma harzianum</i>	43,75 b
Testemunha (com inóculo)	<i>Thielaviopsis</i> sp.	100 d
Testemunha (sem inóculo)	-	0 a

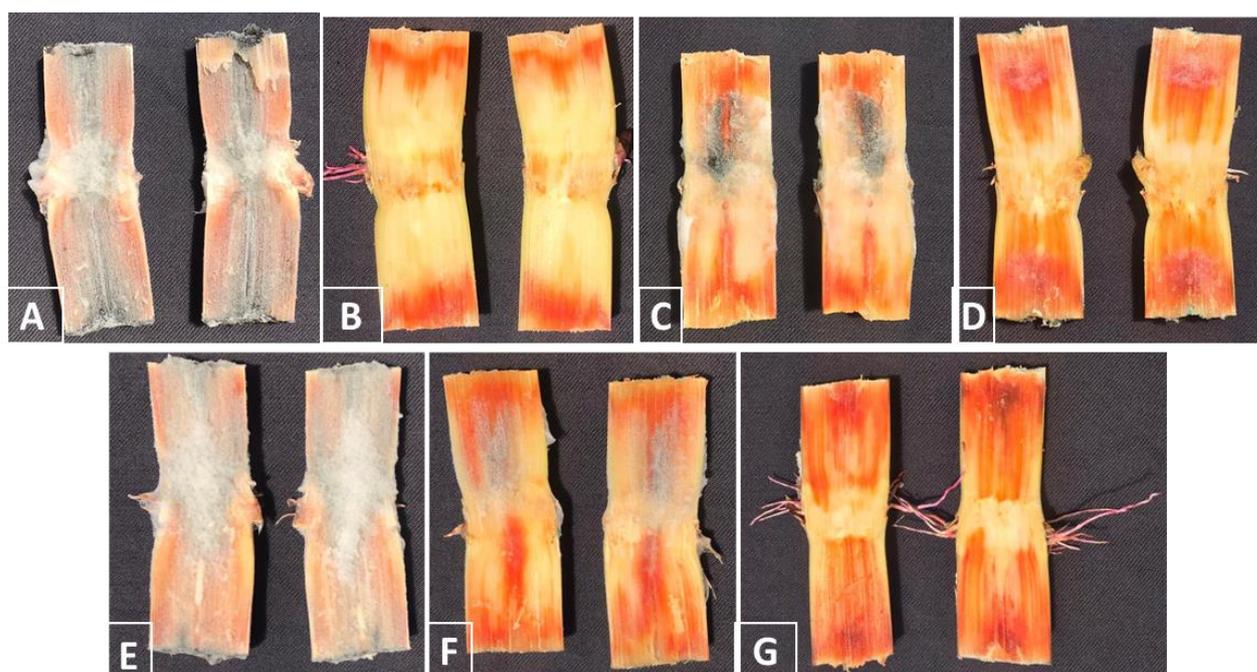
\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 15.** Sintomas da podridão abacaxi induzidos por diferentes linhagens de *Trichoderma* em mini toletes de cana de açúcar acondicionados em caixas *Gerbox* **A:** Testemunha inoculada com o patógeno. **B:** Testemunha não inoculada. **C:** CEN281. **D:** CEN1277. **E:** CEN1513. **F:** CEN1546. **G:** ESALQ-1306.

Nesse primeiro momento da avaliação, observou-se apenas a vermelhidão das fibras vasculares do colmo, indicando o ataque do patógeno responsável pela doença. Não se notou a presença de micélio e esporulação do patógeno (Figura 15). A observação dos

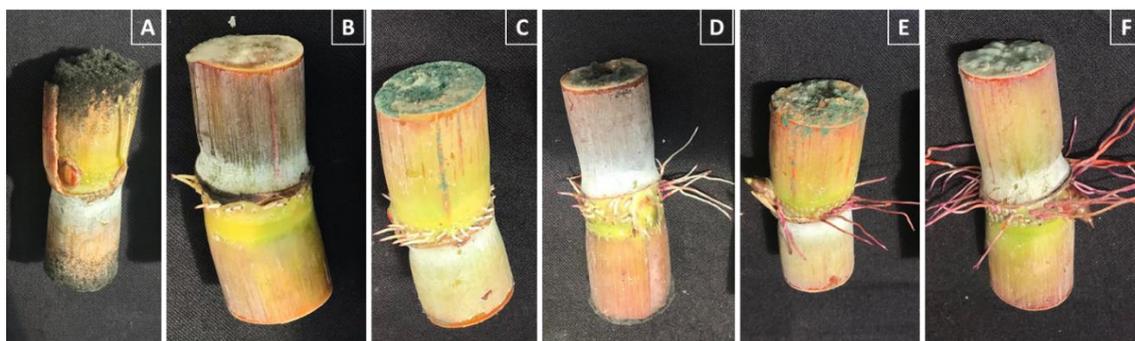
sintomas realizou-se mediante corte longitudinal dos mini toletes. Estes, mantidos nas caixas *Gerbox* por mais 24 horas, nas mesmas condições anteriores exibiram esporulação do patógeno como mostram os tratamentos testemunha inoculada, CEN281, CEN1513 e CEN1546 (Figura 16). Não se observou qualquer vestígio do fungo na testemunha não inoculada, apesar de ser possível observar uma maior vermelhidão das extremidades. Vale destacar que essa vermelhidão nem sempre se refere à presença do patógeno, mas sim da presença de fitoalexina, substância liberada pelo material propagativo. Qualquer corte ou ferimento promove essa coloração, exatamente o que ocorreu quando os mini toletes foram cortados longitudinalmente para observação dos sintomas da podridão. Os tratamentos que apresentaram comportamento semelhante à testemunha não inoculada foram CEN1277 (*T. asperelloides*) e CEN219 (*T. harzianum*). Embora seja visível a formação de micélios do patógeno nas extremidades do material propagativo, tratado com essas duas linhagens, o micélio é escasso e situado em ponto distante da gema.



**Figura 16.** Vista parcial dos sintomas observados no ensaio realizado e inibição da podridão abacaxi após 24 horas da primeira avaliação. **A:** Testemunha inoculada. **B:** Testemunha não inoculada. **C:** CEN281. **D:** CEN1277. **E:** CEN1513. **F:** CEN1546 e **G:** ESALQ-1306.

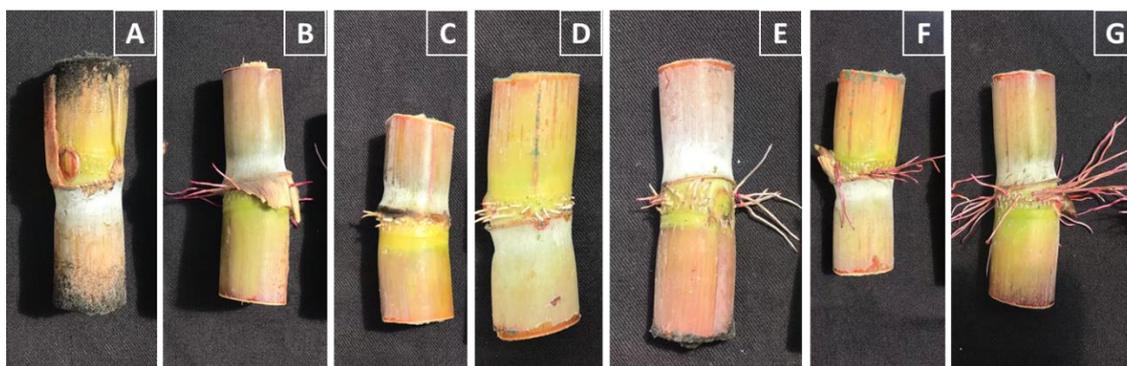
Identificou-se a diferença entre os tratamentos, pelo teste Scott-Knott de comparação de médias, ao nível de 5% de probabilidade. O melhor resultado foi obtido com a linhagem CEN1277 (*T. asperelloides*), cujo valor médio de severidade da podridão

abacaxi foi de 31,25%. Além disso, observou-se a esporulação profusa dessa linhagem de *Trichoderma* nas extremidades e na superfície dos mini toletes tratados (Figura 17). Ainda com relação a esporulação do patógeno, esta foi abundante na testemunha inoculada e não tratada com *Trichoderma*, como também bastante evidenciada nos mini toletes tratados com CEN281. As colônias desenvolvidas pela linhagem CEN1277 nas extremidades dos mini toletes apresentaram micélio em abundância e a coloração tipicamente esverdeada, devido a conidiação intensa, não possibilitando a visualização de estruturas do patógeno, na maioria dos tratamentos. Além disso, quando o mini tolete foi cortado para avaliação qualitativa, a presença de sinais do patógeno foi observada em menor quantidade principalmente em comparação com a testemunha inoculada



**Figura 17.** Mini toletes de cana-de-açúcar exibindo micélio e esporulação do antagonista e do patógeno nas extremidades, sendo **A:** Testemunha inoculada. **B:** CEN281. **C:** CEN1277. **D:** CEN1513. **E:** CEN1546. **F:** ESALQ-1306.

O terceiro grupo acomodou a linhagem CEN1546 e a comercial CEN219, ambas com valores médios de severidade de 56,25% da podridão abacaxi. A linhagem CEN1546 se destacou quanto à capacidade de induzir a formação de raízes de brotação, nas condições em que foram conduzidos os experimentos. Também o tratamento com a linhagem CEN1513, embora atingindo 68,75% de severidade da doença, promoveu o desenvolvimento de raízes. Já a linhagem CEN281 alocada no mesmo grupo em termos de severidade de doença (62,5%) não foi capaz de induzir o enraizamento dos mini toletes. Não obstante, atribui-se a maior capacidade de promover o desenvolvimento, tanto de raízes como de brotação, à linhagem CEN219 (Figura 18).



**Figura 18.** Mini toletes de cana-de-açúcar evidenciando a presença de raízes em cada um dos tratamentos: **A:** Testemunha inoculada com o patógeno; **B:** Testemunha sem tratamento com antagonista nem com o patógeno; **C:** CEN281. **D:** CEN1277. **E:** CEN1513. **F:** CEN1546. **G:** ESALQ-1306.

#### 6.6. Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por *Trichoderma* spp. em casa de vegetação

A análise de variância ANOVA dos dois ensaios mostraram a ocorrência de efeito significativo entre os tratamentos para algumas das variáveis avaliadas, variáveis respostas [(Tabelas 8 e 9 – primeiro ensaio) (Tabelas 11 e 12 – segundo ensaio)], sendo elas: altura (cm), massa seca de parte aérea (g), massa seca de raízes (g) e diâmetro do colmo (mm). Também foram avaliadas a severidade da doença nos dois ensaios com base na escala de notas (Tabelas 10 e 13).

Foram realizados três plantios de cana-de-açúcar, entretanto, apenas o segundo e o terceiro serão considerados, pois o primeiro plantio foi um ensaio preliminar para verificar o desenvolvimento da planta e quais seriam as melhores variáveis para serem analisadas, além de verificar a eficácia da metodologia empregada em casa de vegetação. Dessa forma, os itens que se seguem em 6.6.1 é referente ao segundo plantio, sendo considerado como o primeiro ensaio e o item 6.6.2 é referente ao terceiro plantio, sendo então considerado como segundo ensaio.

##### 6.6.1. Primeiro ensaio: Inverno (julho a agosto de 2022)

Em casa de vegetação, o primeiro ensaio não apresentou diferença significativa para a variável altura entre os tratamentos com o antagonista e a testemunha não inoculada

(T6) e inoculada (T7); a diferença foi visível apenas entre as testemunhas, conferindo, portanto, que a variável resposta não pôde ser explicada pelo tratamento com as linhagens de *Trichoderma* (Figuras 18A e 19; Tabela 8). Com relação à variável massa seca de parte aérea também houve o desbalanceamento dos dados devido às repetições (Tabela 9. Figura 18B), mas houve diferenças significativas entre os tratamentos T5 (CEN219) e a testemunha inoculada. Esse tratamento apresentou média de peso seco de parte aérea de 3,37 g, estando no mesmo grupo estatístico que a testemunha não inoculada com o patógeno T6 (3,56 g), ambos diferiram dos tratamentos T1 (0,97 g) e da testemunha inoculada T7 (0,85 g). Já os tratamentos T2, T3 e T4, não apresentaram evidências de que são diferentes dos demais tratamentos e testemunhas.

Visualmente, a imagem composta pelas plantas de cada tratamento indica que não há diferença entre os tratamentos, apenas quando se compara o T6 com T7, sendo visível a discrepância com relação à altura das plantas (Figura 19A e 19B). A variável diâmetro do colmo (Tabela 8. Figura 18D), assim como as demais, apresentou desbalanceamento nas repetições. O tratamento T7 apresentou média estatística superior (8,12 mm) aos tratamentos com o antagonista em T1, T2 e T3; já em T4 (7,84 mm) não houve evidência de que são diferentes entre si, além de alocarem-se em um grupo estatístico que não diferiu do T5 e T6. Um dos principais motivos pelo qual a testemunha inoculada (T7) apresentou melhores médias para essa variável foi a quantidade e estado físico das duas únicas plantas remanescentes (grandes e vigorosas).

Os dados da variável massa seca de raízes compuseram um dos resultados mais significativos (Tabela 9, Figura 18C), já que o agente de biocontrole apresenta maior eficácia quando se trata de promoção de crescimento de raízes. É notório, portanto, ao analisar a variável massa seca de raízes o tratamento T2 (1,11 g) como o melhor tratamento com uma linhagem da Coleção, não diferiu estatisticamente sua média do resultado obtido com o T5 (2,46 g) que é um produto comercial já registrado e indicado para controle a doença. Já o T1 (0,31 g) permanece com seus resultados que demonstram ser uma linhagem ineficaz no controle da doença, assim como a testemunha inoculada (T7 – 0,3 g) e estão ambos no mesmo grupo estatístico. Já os demais tratamentos, T3 e T4 (ambos com 1,1 g) estão no mesmo grupo, sem apresentar evidência na diferença estatística entre as médias dos tratamentos T2, T1 e T7. As imagens provenientes do primeiro ensaio com relação a massa fresca das raízes, que serviram como critério da avaliação visual (Figura 20), confirmam que, visualmente, todas as linhagens de

antagonistas da Coleção foram capazes de promover o desenvolvimento de raízes quando comparadas a testemunha inoculada.

Pela análise qualitativa acerca da escala de notas de severidade proposta por Sansoli-Chanquinie (2015, adaptada) descrita no item 5.3.5, infere-se que os tratamentos T2 e T5 foram os que apresentaram menor severidade da doença, juntamente com a testemunha não inoculada. Os demais tratamentos não apresentaram diferença da testemunha inoculada T7, segundo o teste Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 10).

**Tabela 8.** Efeito de linhagens de *Trichoderma* (concentração  $1 \times 10^8$  conídios/ml) contra *Thielaviopsis* sp. (concentração  $1 \times 10^5$  conídios/ml), sobre as variáveis avaliadas em casa de vegetação no primeiro ensaio.

Tratamento	Código/Espécie	Repet.	Altura (cm)	Massa seca parte aérea (g)	Diâmetro do colmo (mm)
T1	CEN281 – <i>T. afroharzianum</i>	3	36,7±13,57 ab*	0,9±0,38 a	5,9±0,54 a
T2	CEN1277 – <i>T. asperelloides</i>	9	47,9±13,91 ab	1,7±1 ab	7,4±1,94 ab
T3	CEN1513 – <i>T. koningiopsis</i>	5	44,2±9,92 ab	1,8±1,3 ab	7,4±1,44 ab
T4	CEN1546 – <i>T. afroharzianum</i>	5	50,9±17,13 ab	1,9±1,49 ab	7,8±1,7ac
T5	CEN219 (ESALQ-1306) – <i>T. harzianum</i>	10	58,3±19,39 ab	3,3±1,08 b	9,5±2,29 bc
T6**	-	9	62,4±12,36 b	3,5±1,77 b	10,4±1,58 c
T7***	-	2	32,9±7,64 a	0,8±0,35 a	8,1±1,31 ac

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey ( $T \leq 0,05$ ).

\*\* Testemunha não inoculada

\*\*\* Testemunha inoculada

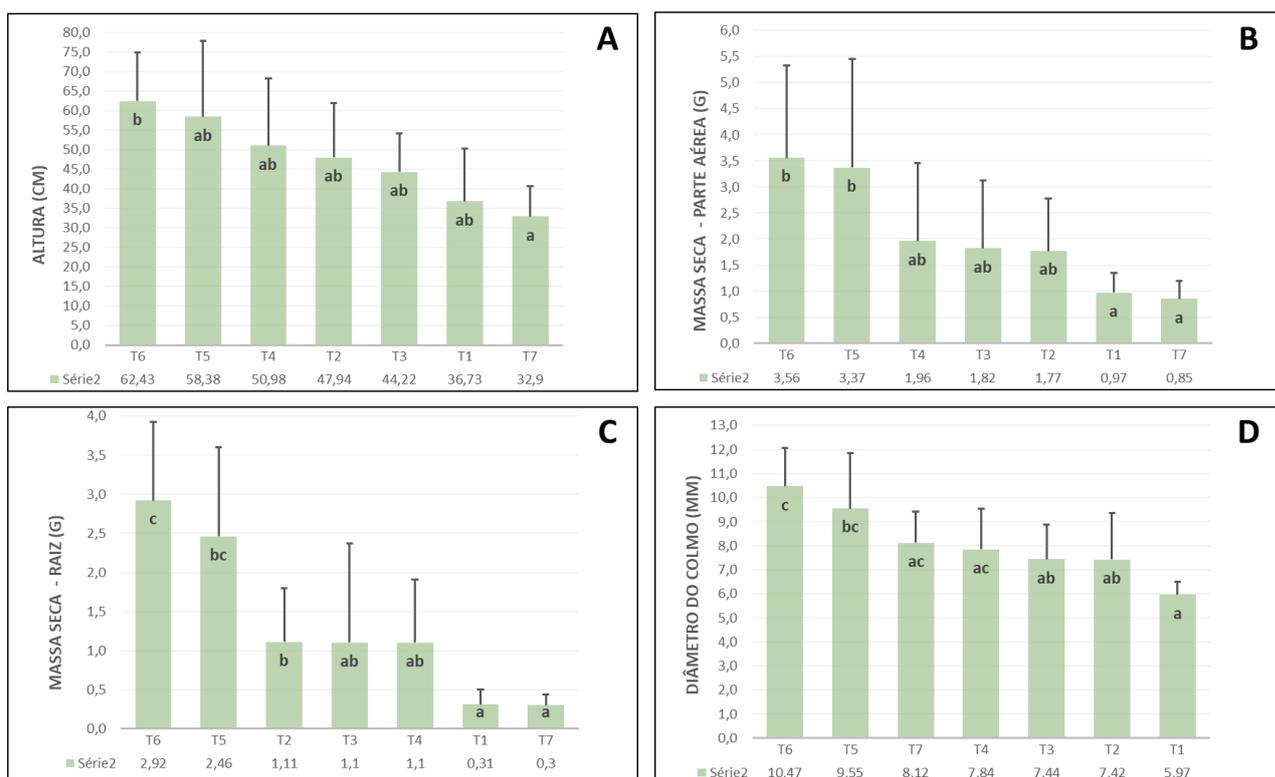
**Tabela 9.** Efeito de linhagens de *Trichoderma* (concentração  $1 \times 10^8$  conídios/ml) contra *Thielaviopsis* sp. (concentração  $1 \times 10^5$  conídios/ml) sobre a variável massa seca de raízes (g) no primeiro ensaio

Tratamento	Código/Espécie	Repetições	Massa seca raízes (g)
T1	CEN281 – <i>T. afroharzianum</i>	7	0,31±0,14 a*
T2	CEN1277 – <i>T. asperelloides</i>	9	1,11±0,69 b
T3	CEN1513 – <i>T. koningiopsis</i>	10	1,1±1,27 ab
T4	CEN1546 – <i>T. afroharzianum</i>	9	1,1±0,81 ab
T5	CEN219 (ESALQ-1306) – <i>T. harzianum</i>	10	2,46±1,14 bc
T6**	-	9	2,92±1 c
T7***	-	6	0,3±0,14 a

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey ( $T \leq 0,05$ ).

\*\* Testemunha não inoculada

\*\*\* Testemunha inoculada



**Figura 19.** Análise estatística do efeito de tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. em mini toletes de cana, na presença de *Thielaviopsis* sp., agente causal da podridão abacaxi no primeiro ensaio, onde, **A:** altura das plantas (cm). **B:** massa seca de parte aérea (g). **C:** massa seca de raízes (g) e **D:** diâmetro do colmo (mm).



**Figura 20.** Efeito de tratamentos com as linhagens de *Trichoderma*, na podridão abacaxi em plantas de cana referentes ao primeiro ensaio onde, **A:** testemunha inoculada. **B:** testemunha não inoculada. **C:** CEN281. **D:** CEN1277. **E:** CEN1513. **F:** CEN1546 e **G:** ESALQ-1306.



**Figura 21.** Efeito de tratamentos com as linhagens de *Trichoderma*, em raízes de mini toletes de cana inoculados com *Thielaviopsis* sp. referentes ao primeiro ensaio onde, **A:** testemunha inoculada. **B:** testemunha não inoculada. **C:** CEN281. **D:** CEN1277. **E:** CEN1513. **F:** CEN1546 e **G:** ESALQ-1306.

**Tabela 10.** Médias dos níveis de severidade de sintomas causados por *Thielaviopsis* sp. em mini- toletes de cana-de-açúcar, resposta aos tratamentos e cultivo em casa de vegetação, no primeiro ensaio

Tratamento	Espécie	Média de severidade (%)
T1 (CEN281)	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	92,5 c*
T2 (CEN1277)	<i>Trichoderma asperelloides</i>	77,5 b
T3 (CEN1513)	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100 c
T4 (CEN1546)	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	100 c
T5 (CEN219 - ESALQ-1306)	<i>Trichoderma harzianum</i>	82,5 b
T6 (testemunha sem inóculo)	-	17,5 a
T7 (testemunha com inóculo)	<i>Thielaviopsis</i> sp.	100 c

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $T \leq 0,05$ ).



**Figura 22.** Efeito de tratamentos com as linhagens de *Trichoderma* na severidade da podridão abacaxi, de *Thielaviopsis* sp. referentes ao primeiro ensaio onde, **A:** testemunha

inoculada. **B:** testemunha não inoculada. **C:** CEN281. **D:** CEN1277. **E:** CEN1513. **F:** CEN1546 e **G:** ESALQ-1306.

#### **6.6.2.** Segundo ensaio: Inverno/primavera (agosto a outubro de 2022)

No segundo ensaio (Tabela 11, Figura 22 e 23), diferentemente do primeiro, houve diferença significativa entre os tratamentos quando avaliada a variável altura, nesse caso, T2 com 78,2 cm (linhagem da coleção), T5 com 84,8 cm (linhagem comercial) e T6 89,2 cm (testemunha não inoculada) ficaram no mesmo grupo de médias, com os maiores valores. Já T1 (CEN281) e T7 testemunha inoculada, ficaram no grupo de menor média, com 54,8 e 47,8 cm, respectivamente. Os tratamentos, T3 e T4, não diferiram estatisticamente dos demais. Para massa seca de parte aérea, as diferenças ficaram evidentes entre os tratamentos com o antagonista T5 (6,4 g) e T1 (3,0 g). Já as demais diferenças ficaram evidentes entre os tratamentos com o antagonista e as testemunhas, inoculada e não inoculada. A variável resposta referente ao diâmetro do colmo demonstrou diferença estatística novamente entre os tratamentos T5 (12,36 mm) e T1 (9,23 mm), além de T5 (12,26 mm) e T4 (10,03 mm), os demais tratamentos não foram diferentes entre si.

Pela análise da variável massa seca de raízes (Tabela 12. Figura 22C), a diferença significativa entre os tratamentos com o antagonista foram em T5 (2,26 g) e T1 (0,81 g) e entre os tratamentos T5 (2,26 g) e T3 (0,79 g). A partir da observação das imagens do segundo ensaio (Figura 24), é notável que todos os tratamentos com as linhagens de *Trichoderma* promoveram o desenvolvimento de raízes quando comparadas a testemunha inoculada. A imagem foi utilizada como critério de avaliação qualitativa já que é observada a massa seca fresca de raízes, e visualmente algumas imagens corroboram as análises estatísticas.

Com base na análise qualitativa utilizando a escala de notas de severidade proposta por Sansoli-Chanquinie (2015, adaptada) foi possível observar que os tratamentos T2 e T5 foram os que apresentaram menor severidade da doença, logo após a testemunha não inoculada (Tabela 13). Além disso, a observação dos sintomas de severidade corrobora ao que foi observado na análise estatística (Figura 25).

**Tabela 11.** Efeito de linhagens de *Trichoderma* (concentração  $1 \times 10^8$  conídios/ml) contra *Thielaviopsis* sp. (concentração  $1 \times 10^5$  conídios/ml) sobre as variáveis avaliadas em casa de vegetação no segundo ensaio.

Tratamento	Código/Espécie	Repet.	Altura (cm)	Massa seca parte aérea (g)	Diâmetro do colmo (mm)
T1	CEN281 – <i>T. afroharzianum</i>	8	54,8±12,92 a*	3,0±1,55 ab	9,2±1,97 a
T2	CEN1277 – <i>T. asperelloides</i>	8	78,2±12,67 b	5,6±2,04 bc	10,6±1,98 ab
T3	CEN1513 – <i>T. koningiopsis</i>	7	56,5±27,23 ab	3,2±3,25 ac	9,5±2,39 ab
T4	CEN1546 – <i>T. afroharzianum</i>	9	71,0±13,99 ab	4,2±1,74 abd	10,0±1,55 a
T5	CEN219 (ESALQ-1306) – <i>T. harzianum</i>	9	84,8±14,4 b	6,4±2,02 cd	12,3±1,27 bc
T6**	-	9	89,2±12,18 b	7,6±1,78 c	14,3±1,62 c
T7***	-	7	47,8±20,63 a	1,7±1,41 a	9,2±2,1 a

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey ( $T \leq 0,05$ ).

\*\* Testemunha não inoculada

\*\*\* Testemunha inoculada

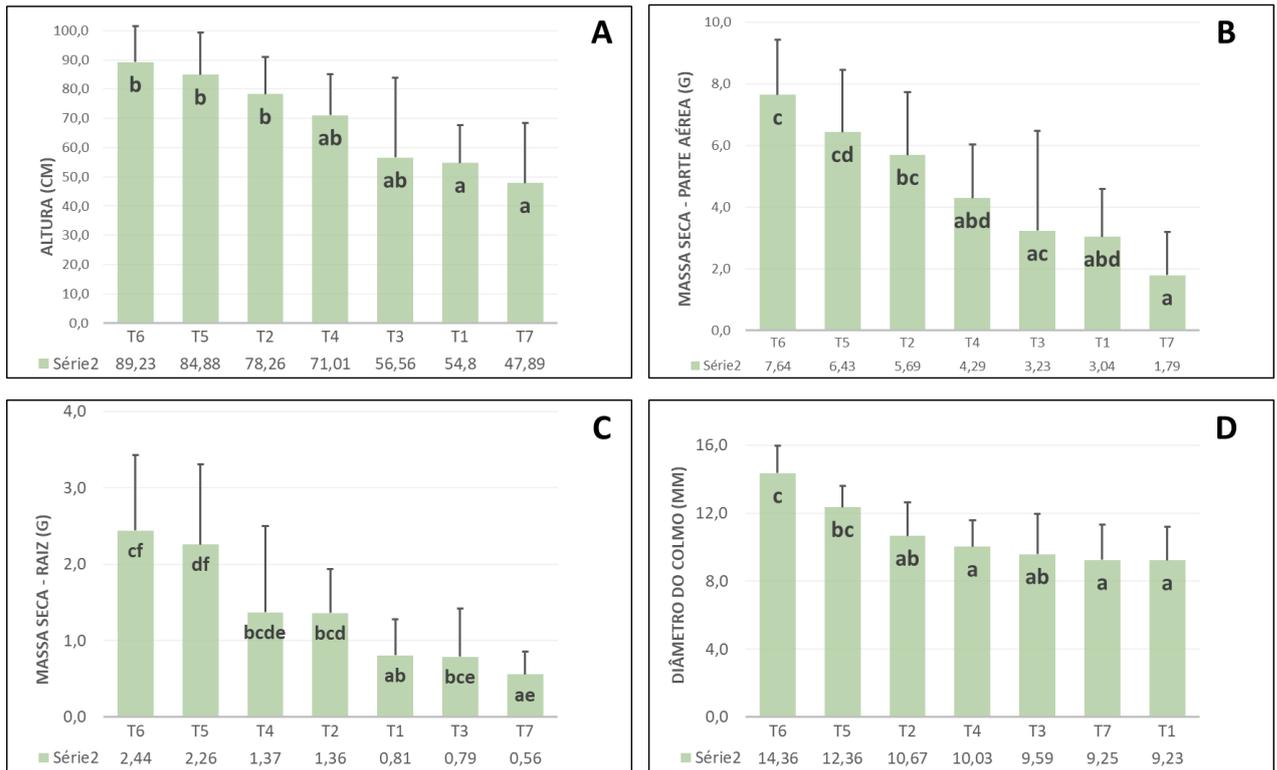
**Tabela 12.** Efeito de linhagens de *Trichoderma* (concentração  $1 \times 10^8$  conídios/ml) contra *Thielaviopsis* sp. (concentração  $1 \times 10^5$  conídios/ml) sobre a variável massa seca de raízes (g) no segundo ensaio.

Tratamento	Código/Espécie	Repetições	Massa seca raízes (g)
T1	CEN281 – <i>T. afroharzianum</i>	10	0,81±0,47 ab
T2	CEN1277 – <i>T. asperelloides</i>	9	1,36±0,58 bcd
T3	CEN1513 – <i>T. koningiopsis</i>	10	0,79±0,63 bce
T4	CEN1546 – <i>T. afroharzianum</i>	10	1,37±1,13 bcde
T5	CEN219 (ESALQ-1306) – <i>T. harzianum</i>	9	2,26±1,05 df
T6**	-	10	2,44±0,99 cf
T7***	-	8	0,56±0,3 ae

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey ( $T \leq 0,05$ ).

\*\* Testemunha não inoculada

\*\*\* Testemunha inoculada



**Figura 23.** Análise estatística do efeito de tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. em mini toletes de cana, na presença de *Thielaviopsis* sp., agente causal da podridão abacaxi no segundo ensaio onde, **A:** altura das plantas (cm). **B:** massa seca de parte aérea (g). **C:** massa seca de raízes (g) e **D:** diâmetro do colmo (mm).



**Figura 24.** Efeito de tratamentos com as linhagens de *Trichoderma*, na podridão abacaxi em plantas de cana referentes ao segundo ensaio onde, **A:** testemunha inoculada. **B:** testemunha não inoculada. **C:** CEN281. **D:** CEN1277. **E:** CEN1513. **F:** CEN1546 e **G:** ESALQ-1306.



**Figura 25.** Efeito de tratamentos com as linhagens de *Trichoderma*, em raízes de mini toletes de cana inoculados com *Thielaviopsis* sp. referentes ao segundo ensaio onde, **A:** testemunha inoculada. **B:** testemunha não inoculada. **C:** CEN281. **D:** CEN1277. **E:** CEN1513. **F:** CEN1546 e **G:** ESALQ-1306.

**Tabela 13.** Médias dos níveis de severidade de sintomas causados por *Thielaviopsis* sp. nos mini toletes de cana-de-açúcar retirados da casa de vegetação no segundo ensaio

Tratamento	Espécie	Média de severidade (%)
T1 (CEN281)	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	95 d*
T2 (CEN1277)	<i>Trichoderma asperelloides</i>	40 b
T3 (CEN1513)	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	85 d
T4 (CEN1546)	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	95 d
T5 (CEN219 - ESALQ-1306)	<i>Trichoderma harzianum</i>	70 c
T6 (testemunha sem inóculo)	-	10 a
T7 (testemunha com inóculo)	<i>Thielaviopsis</i> sp.	95 d

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $T \leq 0,05$ ).



**Figura 26.** Efeito de tratamentos com as linhagens de *Trichoderma* na severidade da podridão abacaxi, de *Thielaviopsis* sp. referentes ao segundo ensaio onde, **A:** testemunha

inoculada. **B:** testemunha não inoculada. **C:** CEN281. **D:** CEN1277. **E:** CEN1513. **F:** CEN1546 e **G:** ESALQ-1306.

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo, quinze linhagens de *Trichoderma* mantidas na Coleção de Agentes de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram testados quanto à inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp., utilizando a metodologia de pareamento de culturas. Após criteriosa avaliação dos resultados do experimento de cultura pareada, foram selecionadas oito linhagens que foram utilizadas na metodologia de exposição aos compostos orgânicos voláteis (COVs) e aos filtrados brutos termooestáveis de *Trichoderma* spp. Com base nos ensaios prévios em laboratório, foi executado um teste de COVs em diferentes fases de desenvolvimento, utilizando as linhagens escolhidas para serem testadas em casa de vegetação, além do ensaio para redução da severidade da doença e por fim, os ensaios em casa de vegetação. Em todos os experimentos foram utilizadas uma linhagem comercial indicada para o controle da podridão abacaxi (*Thielaviopsis* sp). Além disso, todos os ensaios realizados possuíam, como objetivo único, encontrar uma linhagem que fosse capaz de atingir um resultado pelo menos semelhante ao produto comercial registrado para o controle da doença, a fim de possibilitar o desenvolvimento e disponibilização de um novo produto a base de *Trichoderma*.

### 7.1. Pareamento de culturas

As linhagens que apresentaram melhores resultados no pareamento alcançaram valores maiores que 70% de inibição, com destaque para CEN281 (*Trichoderma afroharzianum*) com 76,3% e CEN288 (*Trichoderma rifaii*) com 75,8% pertencentes ao grupo de maior média e CEN287 e CEN1546 (*Trichoderma afroharzianum*) ambos com 73,6% pertencentes ao segundo grupo de maior média. Os dados obtidos corroboram com o estudo realizado por Sánchez et al (2007) em que foram selecionados seis isolados do gênero de *Trichoderma* e observaram resultado semelhante ao que foi observado nesse estudo, em relação a sobreposição do antagonista no patógeno que com apenas três dias de incubação já era possível visualizar invasão e esporulação sobre *T. paradoxa* pelo fungo antagonista. De forma análoga, Talukder e colaboradores (2007) realizaram testes *in vitro* com a espécie *Trichoderma harzianum* para controle da podridão abacaxi em cana-de-açúcar comparando seu efeito com o fungicida Bavistin (0,1%) e, observaram que ocorria a inibição do crescimento radial após 12, 24 e 48 horas do patógeno pelo

antagonista, segundo eles, o patógeno interrompia seu crescimento quando estabelecia contato com o antagonista, sugerindo então que, os fungos antagonistas produzem enzimas líticas que degradam a parede celular de fungos fitopatogênicos.

Ainda sobre este método, em trabalho realizado por Rahman et al (2009), utilizando a fase teleomórfica (sexuada) do fungo fitopatogênico, *Ceratocystis paradoxa*, e mensurou-se a inibição micelial pelo método de cultura pareada de duas formas diferentes. O método I consistiu no posicionamento dos discos de micélio do antagonista e do patógeno na margem da placa de Petri; no método II os discos foram posicionados a 2 cm da bordadura das placas. Em ambos os métodos foi possível observar inibição de *C. Paradoxa*, e os resultados obtidos demonstraram a inibição do crescimento do patógeno entre 40,47 a 63,80% (Método 1) e variaram de 58,12 a 80,82% (Método 2). Entre as espécies analisadas incluíram-se *Trichoderma virens*, *T. pseudokoningii* e *T. harzianum*. Kannangara et al. (2017) realizaram o método de cultura pareada utilizando a fase teleomórfica do patógeno, *Ceratocystis paradoxa*, utilizando dez linhagens, sendo elas, *T. harzianum*, *T. polysporum* e *T. viridae*, todas foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno variando de 43,38% a 69,12% com sete dias de incubação. Utilizando outra espécie do fungo fitopatogênico à romãzeira, *Ceratocystis fimbriata*, causador da murcha da romã, para tal estudo foram utilizadas espécies nativas de *Trichoderma* spp. para seu controle por meio das mesmas metodologias do presente estudo, no primeiro experimento foram utilizadas trinta e três espécies de *Trichoderma* nativas. Com 11 dessas espécies foi observada inibição do crescimento micelial do patógeno entre 78,63 a 93,10%. Já no segundo experimento foram utilizadas apenas onze espécies com os melhores resultados no pareamento, foram identificadas como *Trichoderma harzianum*, *T. virens*, *T. viride* e *T. hamatum*, os resultados de inibição micelial variaram de 50 a 78,84%, sugerindo a capacidade do antagonista em controlar ou reduzir a incidência da doença (Shruthi et al., 2019).

Em estudo realizado por Wijesinghe et al (2010) ao observarem culturas de *Trichoderma asperellum* e *Thielaviopsis* sp, em confronto com uso de microscópio ótico, o enrolamento de *Trichoderma* nas hifas do patógeno, ilustrando a capacidade micoparasítica contra fungos fitopatogênicos (Hirpara et al., 2017).

Esta mesma equipe utilizando 20 isolados da Coleção de Agentes de Biocontrole da Embrapa em cultivo pareado contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*, apenas um isolado apresentou inibição de grau 1 para os dois patógenos, com base na escala de notas de Bell et al. (1982), de acordo com relato de Isaias et al. (2014).

A mesma escala de notas foi utilizada por Carvalho et al. (2011) para avaliar seis linhagens de *T. harzianum latu sensu* quanto à habilidade antagonista contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em cultivo pareado. Foi atribuída a nota 1 a todas as linhagens, cuja inibição variou entre 36,25% e 41,25% aos sete dias de incubação.

Por Auler et al (2013) conduziu ensaios *in vitro* para avaliação do antagonismo de 23 isolados, até então identificados como *Trichoderma harzianum*, para verificar o potencial antagônico contra *Sclerotium rolfsii*, por meio de cultivo pareado sob três diferentes temperaturas, 22, 25 e 28°C. Os autores observaram que alguns isolados da mesma espécie *latu sensu* foram capazes de inibir em até 100% o crescimento micelial de *S. rolfsii*, ao passo que outros não apresentaram potencial de inibição, principalmente nas temperaturas de 25 e 28°C. Com base nesse achado, os autores sugerem que mesmo utilizando isolados geneticamente próximas, pode haver variações nos mecanismos de controle biológico. Trabalho conduzido por Botelho (2022), no qual incluíram algumas das linhagens utilizadas no presente estudo tendo os patógenos *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* como alvos, todas as linhagens foram capazes de inibir o crescimento micelial dos patógenos em culturas pareadas. Nesse trabalho, destacaram-se as linhagens CEN1242 (*T. azevedoi*), CEN1513 (*T. koningiopsis*), CEN1546 (*T. afroharzianum*) e CEN1559 (*T. asperelloides*), com os maiores valores médios de porcentagem de inibição do crescimento micelial (acima de 60%). Além do mais, todas as linhagens avançaram sobre as colônias do patógeno e esporularam profusamente. Esse fato foi observado principalmente com CEN1277 e CEN1559. Vale ressaltar que, também no presente estudo, a maioria das linhagens utilizadas foram capazes de avançarem sobre as colônias do patógeno, provavelmente exercendo habilidade micoparasítica, fato a ser verificado mediante estudos de microscopia. Os resultados aqui corroboram estudos desenvolvidos com diferentes patógenos alvos, indicando que a atividade dessas linhagens de *Trichoderma* estariam ocorrendo por diferentes mecanismos, como antibiose mediante a produção de metabólitos voláteis e não voláteis e hiperparasitismo, conforme mencionado por Carvalho et al(2011). Esses dois mecanismos podem estar intimamente envolvidos na possibilidade de ataque direto ao patógeno por *Trichoderma* e isso inclui: produção de enzimas degradadoras da parede celular dos fungos fitopatogênicos; alteração na permeabilidade de membranas; enrolamento ou, por vezes, o mero contato entre hifas e, finalmente, penetração e colonização das estruturas do patógeno pelo agente de biocontrole (Hirpara et al., 2017; Wongolom et al., 2019).

### 7.1.1. Testes de produção de compostos orgânicos voláteis bioativos

Os compostos orgânicos voláteis são produzidos durante a fase de crescimento micelial e esporulação do agente de biocontrole e estes compostos estão entre os mais importantes para o desenvolvimento de produtos comerciais (Vinale et al., 2008). Com relação aos (COVs) emitidos por *Trichoderma* frente ao patógeno alvo deste estudo, observou-se que o isolado CEN1277 (*T. asperelloides*) apresentou o maior índice de inibição (65,9%). Em estudo semelhante, Eziashi et al (2006) testou quatro espécies de *Trichoderma* (*T. viride*, *T. polysporum*, *T. hamatum* e *T. aureoviride*), frente ao *Ceratocystis paradoxa* (fase perfeita), tendo relatado índices de inibição do crescimento micelial de 81%, 79%, 70%. Uma espécie (*T. aureoviride*) não revelou habilidade para inibir o crescimento micelial do fungo. Silva et al. (2020) observou inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* pela linhagem CEN1241 (*T. azevedoi*), pela produção de COVs, esporulação e germinação, além de alterarem a estrutura das hifas do patógeno.

Embora não tenha sido realizada, neste trabalho, uma análise química para identificar os COVs presentes na atmosfera compartilhada durante a exposição aos voláteis liberados pelas linhagens de *Trichoderma*, diversos estudos mostram a habilidade desses fungos para produzir um número de substâncias químicas que contribuem para a inibição do desenvolvimento de colônias/ supressão do crescimento fitopatogênicos (Kottb et al., 2015; Lee et al., 2016; Chen et al., 2016; González-Pérez et al., 2018). ). A espécie *T. asperellum* talvez seja uma das mais reportadas como produtora de metabólitos das diferentes classes químicas já identificadas (Rabuske 2021). Algumas dessas classes de compostos são hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, aromáticos, terpenos, sesquiterpenos, pironas e outros, emitidas pelo agente antagonista, todos ativos contra *Fusarium graminearum*, por exemplo. Tais compostos podem estar envolvidos diretamente no controle biológico ou atuando em favor da planta, como indutores da defesa sistêmica, como reguladores de crescimento (fitohormônios), ou na disponibilidade de nutrientes do solo para as plantas, principalmente sobre os cátions Ca (cálcio), Mg (magnésio), K (potássio) e sobre o ânion fosfatado. Dessa forma, busca-se o conhecimento sobre esses compostos já que é sabido que mais um mecanismo está envolvido no controle dos patógenos, ou seja, a antibiose, a emissão de voláteis e não voláteis (descrito a seguir) atuam em sinergismo.

### 7.1.2. Testes para detecção de compostos termoestáveis bioativos em filtrados de cultura

Com relação aos dados obtidos da produção de compostos orgânicos não voláteis termoestáveis, foi possível observar que as linhagens estudadas apresentaram inconstância de resultados durante as três execuções, impossibilitando, assim, uma conclusão sobre a atividade antagonista das linhagens contra o patógeno *Thielaviopsis* sp. Apesar disso, a única linhagem que apresentou resultados de inibição nas três execuções foi CEN1546 (*T. afroharzianum*), apesar de não serem valores iguais em porcentagem de inibição, ainda assim, sugere a capacidade desenvolvida por esse isolado de liberar substâncias tóxicas ao patógeno que são formadas durante a fermentação líquida e que estão viáveis mesmo após a autoclavagem, e além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos ou atuando conjuntamente.

Diferenças encontradas nos experimentos podem ser explicadas ao se considerar que se trata de organismo vivo, sensível a variações nas condições externas mesmo pequenas. Estudos realizados por outros membros da equipe de pesquisa, utilizando filtrados de culturas, vem demonstrando a capacidade dos isolados testados no presente trabalho, para inibir outros patógenos de importância agrícola (Mello et al., 2007; Isaias et al., 2014; Guimarães et al., 2016; Marques et al., 2018). Em 2006, Eziashi e colaboradores observaram, pelo método de filtrados brutos de quatro espécies de *Trichoderma*, dentre elas, *T. viride*, *T. polysporum*, *T. hamatum* e *T. aureoviride*, valores médios de inibição de 74%, 71%, 64% e 0%, respectivamente, para controle de *Ceratocystis paradoxa*.

Com relação ao antagonismo contra *Thielaviopsis paradoxa*, pode-se destacar o trabalho conduzido por Wijesinghe et al. (2011), utilizando *Trichoderma asperellum* contra *Thielaviopsis paradoxa*. Nesse estudo foi desenvolvido um método para avaliação dos filtrados brutos da espécie antagonista, incorporando os extratos brutos ao meio BDA, à diferentes concentrações. O crescimento do patógeno foi inibido em 37.77%, quando o extrato bruto foi incorporado à razão de 25%, similar a este trabalho.

Em outro estudo semelhante, Raut e colaboradores (2014), utilizaram dois isolados de *Trichoderma* sp. (T36 e T50), para avaliarem diferentes mecanismos de ação do fungo antagonista, entre os quais, os compostos orgânicos não voláteis. Os autores obtiveram, de modo similar ao que foi obtido no presente estudo, valores médios de inibição acima de 60% à concentração de 25%, dos filtrados de cultura incorporados ao

meio, contra os alvos *Fusarium graminearum*, e *Rhizoctonia solani*. Entretanto, o alcance foi de 37,5% contra *Pythium ultimum*, contra a T36 e 0%, com a linhagem T50. A partir desses dados, os autores concluíram que o grau de eficácia dos metabólitos não voláteis liberados pelas linhagens de *Trichoderma* podem variar de acordo com a natureza, qualidade e quantidade de substâncias inibitórias secretadas no meio de cultivo.

Além disso, a autoclavagem dos filtrados pode ter afetado a eficiência antifúngica dos mesmos. Há relatos de redução em até 24% (Jayaprakashvel et al., 2010), das propriedades bioativas dos filtrados de culturas, comparada ao processo em que não ocorre a autoclavagem (Guimarães et al., 2016), contrariando Demirci e colaboradores (2011). Para estes últimos, a bioatividade dos metabólitos submetidos a autoclavagem indicaria a estabilidade dos produtos químicos em condições ambientais adversas, ideia compartilhada com Jayaprakashvel et al. (2010), ao postularem que ao se mostrarem estáveis em diferentes temperaturas, os metabólitos também podem se manter ativos em outras condições como, insolação e altas temperaturas do solo. Rajani et al. (2021), lembra que esses filtrados de culturas também podem ser esterilizados com o uso de membrana de celulose, antes da incorporação ao meio já devidamente autoclavado.

Fortuitamente, os resultados aqui obtidos poderiam ser otimizados com esse método de esterilização “a frio”, além do que poder-se-iam testar outras concentrações do filtrado para se estabelecer a melhor concentração para os ensaios. Vários trabalhos existentes na literatura abordam esse assunto, incluindo a influência de meios e condições de cultivo (Rahman et al., 2009; Wijesinghe et al., 2011; Raut et al., 2014). Portanto, ainda que os filtrados de *Trichoderma* spp. não tenham inibido o crescimento do patógeno de maneira constante no presente trabalho, não é possível afirmar que são ineficientes em promover controle através da antibiose, já que as propriedades dos metabólitos podem estar ligadas também às condições de cultivo e a concentração do filtrado adicionado ao meio, fatores que podem interferir diretamente na atividade bioativa de tais compostos. Convém ressaltar que ensaios dessa natureza, são de grande importância do ponto de vista ambiental, já que metabólitos provenientes de microrganismos são capazes de exibir comportamento semelhante a uma molécula química no controle de fitopatógenos, porém, com muito menor risco à saúde humana e ao meio ambiente.

## 7.2. Exposição de *Thielaviopsis* aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Trichoderma* spp., em diferentes fases de desenvolvimento das culturas

Foi realizado um segundo ensaio para avaliar os COVs emitidos pelas linhagens de *Trichoderma* na inibição do crescimento micelial do patógeno. Essa abordagem foi relatada na literatura uma única vez por Silva e colaboradores (2021), ao avaliar a capacidade antagônica de *Trichoderma* em diferentes tempos de desenvolvimento da culturas, na busca de subsídios para estabelecimento do sistema de atmosfera compartilhada em placa dupla com o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Essa metodologia foi adaptada para este ensaio, postulando que o crescimento rápido de *Thielaviopsis* possa ser retardado pela exposição aos COVs de *Trichoderma* quando o agente de biocontrole esteja em estágios de desenvolvimento mais propícios a emissão de grandes quantidades desses compostos.

Com base nos resultados observados, é possível afirmar que os melhores índices de inibição de crescimento do patógeno foram em 48 e 72 horas, variando conforme a espécie, algo que condiz com Larsen & Frisvad (1995) que relataram os COVs liberados diferenciam-se entre espécies, e além do mais, fatores como condições do substrato utilizado, idade da cultura e a interação com outro microrganismo pode influenciar diretamente em como e quais os metabólitos serão emitidos em uma situação de placas duplas (Hynes et al., 2007). Em diversos trabalhos são relatados quais os perfis dos químicos envolvidos nos COVs e estes compostos diferenciam-se em quantidade, classificação e quais espécies, antagonista e patógeno. Rabuske (2021), encontrou aproximadamente 30 COVs emitidos por *Trichoderma asperellum* através do experimento de atmosfera compartilhada com *Fusarium graminearum*, dentro os quais estavam hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, aromáticos, terpenos, sesquiterpenos, entre outros. Já por Stracquadanio e colaboradores (2020) identificaram em torno de 62 COVs, mas estes emitidos pelas espécies *T. asperellum* e *T. atroviride* obtidos através de filtrado de cultura liofilizados, dentre os quais estavam álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas, pirazinas, ésteres e outros. Guo et al. (2019) em ensaio realizado com fungo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* verificou que a espécie *T. hamatum* emitiu novos 19 COVs durante a interação, sendo um deles a 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP), um composto conhecido e emitido por várias espécies de *Trichoderma*, este composto é responsável por apresentar atividade fungicida contra diversos fitopatógenos que acometem culturas de interesse agrícola (Cooney et al., 2001; El-Hasan et al., 2008; Jelen

et al., 2014; Elsherbiny et al., 2020). E foi identificado demonstrando efeito nematicida para *Bursaphelenchus xylophilus* (Yang et al., 2012). Além do perfil dos COVs, um dos fatores avaliados é a capacidade em inibir o crescimento micelial de patógenos que também podem sofrer divergências na inibição de acordo com a espécie do antagonista seguindo a metodologia de atmosfera compartilhada proposta por Dennis & Webster, 1971 (Eziashi et al., 2006; Isaias et al., 2014; Guimarães et al., 2016; Shruthi et al., 2019). Dessa forma, as diferentes espécies do agente de biocontrole pode estar diretamente ligada ao perfil dos compostos químicos liberados por ele, além de qual o microrganismo envolvido na interação para que ocorra sua inibição, contudo, existe uma grande quantidade de eventos, bióticos e abióticos, ocorrendo durante o controle biológico por *Trichoderma* com base em seus diferentes mecanismos de ação (Zin & Badaluddin 2020).

As linhagens apresentaram maiores níveis e esporulação após 48 horas de crescimento e, dessa forma, com base na estatística os índices de inibição foram mais efetivos a partir desse momento. Na maioria das linhagens ocorreu um aumento expressivo na inibição do crescimento micelial do patógeno após 72 horas de crescimento do antagonista. Em estudo realizado por Jelen et al. (2014), verificou que a produção de diferentes COVs é aumentada após, aproximadamente, 96 horas de crescimento. Com base nisso, é possível indicar que é necessário que a colônia de *Trichoderma* esteja previamente crescida para obter-se melhores resultados de inibição dos patógenos. Contudo, com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se inferir que a capacidade das linhagens de *Trichoderma* em inibir o crescimento de *Thielaviopsis* sp. pode estar intimamente ligada à emissão de COVs e ao seu perfil, e, com isso, foram ser testadas como agentes de biocontrole em ensaios a campo para verificar se o comportamento das linhagens aqui testadas será semelhante comprovando a eficácia em ensaios *in vitro* e *in vivo*, e ainda mais, indicando que mais de um mecanismo de ação está envolvido no controle biológico por *Trichoderma*.

### **7.3. Redução na severidade da podridão abacaxi em cana-de-açúcar por *Trichoderma* spp.**

Como já mencionado anteriormente, diversos são os mecanismos de ação desenvolvidos por *Trichoderma* para controle de fitopatógenos, além disso, muitos estudos ilustram sua eficácia quando utilizado como um controle preventivo para alguma

doença, como é o caso do tratamento de sementes. A pré-colonização com o bioagente configura uma vantagem competitiva sobre os patógenos que atacam as sementes, já que os bioagentes são capazes colonizar as raízes, aumentar a massa radicular, manter a plantas saudáveis e, por consequência, propiciam aumento na produtividade das culturas (Carvalho et al., 2011; Haddad et al., 2017; Mukhopadhyay Kumar, 2020). Dessa forma, a metodologia empregada nesse ensaio possui a mesma ideia do tratamento preventivo por meio da imersão dos propágulos de cana-de-açúcar em suspensão de *Trichoderma*. A cultura é atualmente plantada em via mecanizada e, para evitar os prejuízos causados por algumas doenças, é realizada a aplicação de fungicidas que são, em sua maioria, em sulco de plantio (Chapola 2014; Espíndola 2017) com uso de pulverizadores em jato dirigido, como é o caso do fungicida PrioriXtra<sup>®</sup> (Syngenta 2022). Outra forma de realizar um tratamento contra doenças, nesse caso, causada por uma bactéria, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, responsável pelo raquitismo-da-soqueira, é a termoterapia, uma opção eficaz no controle desse patógeno (Dias et al., 2019).

A metodologia aplicada para o tratamento dos mini toletes de cana-de-açúcar é semelhante ao que foi realizado por Gírio et al. (2015) que tratou o material propagativo, igualmente, com bactérias diazotróficas. No presente estudo foi possível observar que alguns dos tratamentos com o agente de biocontrole promoveram uma redução na incidência da doença comparada a outros. Sobre outra ótica, autores relatam a capacidade dos fungos *Trichoderma* em colonizar as raízes de algumas plantas cultivadas que tiveram suas sementes tratadas com o antagonista (Gava & Pinto, 2016; Siddaiah et al., 2017; Xue et al., 2017). Sendo assim, podemos inferir que o mesmo ocorre com o material propagativo da cana-de-açúcar, que mostra-se visivelmente colonizado pelas linhagens de *Trichoderma* e *Thielaviopsis* sp. (Figura 17), além disso, é possível supor que, por ter colônias do antagonista crescendo sobre o tecido vegetal e por ter ficado acondicionado em Gerbox, que permaneceu por todo o período de incubação fechada, metabólitos voláteis poderiam estar envolvidos nesse sistema, promovendo, de alguma forma, o desenvolvimento de raízes, informação ilustrada nos experimentos realizados (Figura 18), em que a quantidade de raízes presentes nos tratamentos com o agente de biocontrole é maior quando comparada à testemunha não inoculada. Esse fato é confirmado por Garnica-Vegara et al. (2015) que relatou a emissão do composto 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP) que além de apresentar comportamento fungicida, também é um potencializador de crescimento de planta, como foi o caso de *Arabidopsis thaliana*. Vinale e colaboradores (2008) relataram o mesmo efeito na cultura do tomate. Outros mecanismos,

além da antibiose, podem estar envolvidos nesse sistema para reduzir o efeito negativo do patógeno, como o micoparasitismo e a indução de resistência, sendo esta, adquirida localizada induzida (Gupta et al., 2014). O desenvolvimento desse ensaio foi necessário para observar a capacidade de *Trichoderma* em realizar exatamente o que havia sido previsto, a colonização do tecido vegetal e redução da severidade da doença, com objetivo de saber se a metodologia apresentaria eficácia no controle da doença, já que também foi empregada em casa de vegetação.

#### 7.4. Ação de linhagens de *Trichoderma* em casa de vegetação, no controle de *Thielaviopsis* sp. em cana-de-açúcar

Com a crescente demanda por produtos biológicos devido a sua capacidade em aumentar a produtividade das culturas e, somado a isso, o controle de fitopatógenos, surge a possibilidade da substituição ou complemento com os defensivos químicos em diversas culturas, inclusive na cana-de-açúcar. Sendo assim, o presente estudo contribui para a elucidação da capacidade de controle da podridão abacaxi por linhagens de *Trichoderma*.

Houve um aumento significativo do peso seco de raízes nos dois ensaios (inverno e inverno/primavera), comparado com a testemunha inoculada, evidência de que o tratamento com as linhagens de *Trichoderma* contribuíram com tal resultado. Os resultados das análises (Teste Tukey) dos dois ensaios, mostraram que os tratamentos com as linhagens de *Trichoderma* foram semelhantes aos observados na testemunha não inoculada, sendo assim, é possível inferir que o agente de biocontrole proporcionou para as plantas resultados das variáveis semelhantes a uma planta sadia, esse fator ficou mais claro no segundo ensaio, onde mais plantas foram contabilizadas, mas que além do tratamento com o antagonista, fatores externos como, temperatura, influenciaram nos resultados observados e, dessa forma, confirma o que foi mencionado por Tokeshi (1980) e Raid (2012) que as plantas que forem capazes de brotar irão se desenvolver sem nenhum problema aparente. Segundo Gheller (1995) as gemas possuem em torno de 15 dias para brotar sem que o patógeno a impeça e condições normais de temperatura e umidade, já que este consegue atacar àquelas que demoram mais de 16 para brotarem, sendo assim, é possível observar a quantidade de plantas presentes nos tratamentos com *Trichoderma*, comparada a testemunha no primeiro ensaio (inverno). Entretanto, este fator não cabe ao segundo ensaio (inverno/primavera) pois é notório que mais gemas foram capazes de

brotar, inclusive no tratamento inoculado mas, que isso se deve, principalmente, às temperaturas mais altas durante o período que as plantas ficaram em casa de vegetação, já que o patógeno é favorecido por temperaturas e umidades mais baixas, que correspondiam ao que ocorreu durante o primeiro plantio (inverno) e as brotações optam por temperaturas mais altas ocorridas no segundo plantio (inverno/primavera).

Um tratamento profilático é aquele que consiste no uso de uma medida que venha e impedir a ocorrência de uma doença. Já o tratamento terapêutico tem por objetivo principal curar, ou seja, uma doença já presente, e procura-se reduzir seus efeitos negativos. Baseado nisso, Ajayi et al. (2016), realizou testes com objetivo de verificar se a aplicação de *Trichoderma koningii* apresentava melhores resultados no controle da podridão abacaxi em cana-de-açúcar pelos métodos profilático ou terapêutico em diferentes concentrações,  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^7$  conídios/ml. Ao final do seu experimento, inferiu que a melhor forma de suprimir o patógeno é através do tratamento profilático na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/ml, já que este atingiu melhores resultados referentes a germinação e redução na incidência e severidade da doença, promovendo melhor desempenho para a cultura. Corroborando com o presente trabalho, já que o método de aplicação do agente de biocontrole foi realizado antes da inoculação com o patógeno.

Talukder e colaboradores (2007) observaram que os toletes de cana-de-açúcar que receberam tratamento com *T. harzianum* atingiram 43,83; 40,50 e 39,50% de germinação, enquanto o controle, apenas com o patógeno, atingiu 24,17%. Conferindo semelhança com o presente trabalho, já que é possível observar que no primeiro ensaio (inverno) por ser caracterizado com baixas temperaturas que favorece o ataque do patógeno, este foi suprimido e a maior parte das gemas que receberam tratamento com *Trichoderma* foram contabilizadas.

Em trabalho realizado por Espíndola (2017), realizou o tratamento de toletes de cana assim como o presente estudo, método de imersão, seus tratamentos variaram em combinados e/ou isolados de agentes de biocontrole, dentre os quais estavam *T. asperellum*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus methylotrophicus*. Um dos melhores resultados para a variável massa de raízes foi obtido com o tratamento que continha apenas linhagem de *T. asperellum*, obteve um valor de 160 g, enquanto o controle inoculado com o patógeno apresentou apenas 0,68 g, o mesmo se repete para a variável massa foliar com 136 g para o tratamento com *T. asperellum* e o controle inoculado com 105 g. Em outros estudos foi observado o aumento da massa seca da parte aérea de diversas culturas, como, em plantas de pepino (Silva et al., 2011), além de soja, milho, feijão e arroz (Souza Pedro

et al., 2012; Chagas et al., 2017). Estas informações corroboram com o que foi apresentado no presente estudo, em que os tratamentos que continham as linhagens de *Trichoderma* alcançaram valores médios melhores em comparação com a testemunha inoculada nas variáveis de massa seca de parte aérea e raízes, além de altura, nos dois ensaios (inverno e inverno/primavera). Outra variável analisada pelo mesmo autor, foi a podridão interna dos colmos, em que foi realizada a medição e o dado transformado em porcentagem, entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle inoculado, diferentemente do que aconteceu no presente trabalho, já que a avaliação realizada para mensurar a severidade da doença foi feita com base em escala de notas (Sansoli-Chanquine, 2015, adaptada) sendo possível visualizar e inferir resultados mais pertinentes sobre a ação do agente de biocontrole. Apesar de não ter sido observada diferença estatística com relação a altura das plantas no primeiro ensaio (inverno), autores relatam o contrário. Por Al-Hazmi & TariqJaveed (2015) relatam o aumento do crescimento, em altura, de tomateiros com aplicação de *Trichoderma*.

Assim como realizado por Uzan (2019), foram utilizados mini toletes em todos os ensaios, estes não apresentam a região nodal, que exerce a função de proteção física contra à progressão do patógeno até a gema, com o objetivo de avaliar unicamente cada um dos mini toletes tratados com *Trichoderma* e avaliar se a brotação apresentaria maior velocidade para brotar e, com isso, proteger a futura planta do ataque do patógeno. Em estudo desenvolvido por Shanmugam e colaboradores (2016), para obtenção de mudas sadias de cana-de-açúcar, mini rebolos receberam diferentes tratamentos com químicos e agentes de biocontrole para verificar qual deles apresentava menores prejuízos na brotação das gemas em dois diferentes locais. Um dos tratamentos que apresentou resultados viáveis a custo-benefício foi o tratamento que continha uma mistura de agentes de biocontrole, *T. viride* + *Pseudomonas fluorescens*, apresentaram porcentagens de germinação de 88 e 83% nos locais que foram avaliados. Esse trabalho é um indicativo que o gênero *Trichoderma* é eficiente no tratamento de mini rebolos para formação de mudas pré-brotadas, que podem ser futuramente utilizadas nesse sistema, promovendo, inclusive maiores desempenhos da cultura à campo.

Linhagens de *Trichoderma* são cada vez mais estudadas e apresentam comprovações em diversos estudos sobre seus mecanismos de ação em favorecimento das plantas e contra diferentes patógenos de solo. Isso indica o quanto é um importante agente dentro do controle biológico. Dentre os diferentes mecanismos relatados, está como promotor de crescimento de plantas (Hyakumachi & Kubota, 2003; Cai et al., 2013;

Vinale et al., 2013; Contreras-Cornejo et al., 2015; Garnica-Vergara et al., 2015). São inúmeros os fatores que podem influenciar no crescimento das plantas, por exemplo, temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes, presença de microbiota, entre outros (Zin & Badalludin, 2020). De acordo com Yuan et al., (2016), a rizosfera é a região do solo que está concentrada ao redor das raízes das plantas onde nutrientes estão em grandes concentrações, isso ocorre devido à maior quantidade de subprodutos fotossintéticos liberados nas raízes. Com base nisso, a microbiota que está acumulada nessa região pode proporcionar benefícios, efeitos neutros ou danos ao crescimento das plantas. Existe uma interação entre as plantas e os microrganismos que habitam naquela região que promove o seu desenvolvimento e assimilação de nutrientes (Pomella & Ribeiro, 2009). Algumas *Trichoderma* spp, possuem um papel significativo como fungos promotores de crescimento de plantas e, curiosamente, as plantas são capazes de reconhecer e reagir às populações presentes na rizosfera e os metabólitos secundários por elas liberados como, auxinas, etileno e outros compostos (Contreras-Cornejo et al., 2009; Ortíz-Castro et al., 2009). Um composto liberado pela cepa SQR-T037 da espécie *T. harzianum*, denominado de harzianolide (Cai et al., 2013), resultados desse estudo mostraram que esse composto induziu o crescimento de plântulas de tomate em sistema hidropônico ou solo em diferentes concentrações, 0,1 e 1 ppm (partes por milhão). Outro composto produzido e identificado pelas espécies *T. virense* e *T. atroviride*, foi o ácido indol acético (AIA), além de outras substâncias similares a auxina, ambos hormônios que possuem papel crucial no desenvolvimento de raízes (Contreras-Cornejo et al., 2014). É notório que o desenvolvimento de raízes é um benefício promovido por *Trichoderma* spp., diversos estudos comprovam essa afirmação já que esse bioagente é capaz de produzir e/ou controlar hormônios vegetais que são responsáveis pelo melhor desenvolvimento radicular, como a auxina, ácido harziânico e harzianolide (Contreras-Cornejo et al., 2009; Cai et al., 2013; Vinale et al., 2013). Além disso, plantas inoculadas com *Trichoderma*, também podem aumentar a disponibilidade e concentração de macro e micronutrientes presentes no solo como, cobre (Cu), fósforo (P), ferro (Fe), zinco (Zn) e sódio (Na) nas proximidades da raiz que inoculada (Yedidia et al., 2001). Em outro estudo, Contreras-Cornejo et al. (2016), afirmou que ocorre um aumento da área da superfície das raízes de plantas inoculadas permitindo assim, a possibilidade de maior exploração do solo e, dessa forma, seja capaz de absorver mais nutrientes do solo, micro e macro, proporcionando às plantas maior vantagem sobre outros microrganismos ao competir por minerais presentes ou quando escassos. Segundo Harman e colaboradores

(2004), durante os estágios iniciais de interação entre *Trichoderma* e a planta, pode ser desenvolvida uma resposta de defesa da planta e, assim, esta passa a produzir metabólitos secundários que podem estimular a promoção de crescimento. Os demais trabalhos mencionados, corroboram com o que foi obtido no presente estudo, onde é perceptível que as raízes, principalmente, que foram inoculadas com *Trichoderma* spp., apresentaram maior volume comparada a testemunha inoculada, ilustrando, portanto, que esse fator pode estar associado com a produção de hormônios ou fatores de crescimento. Os resultados obtidos nesse estudo reforçam a importância da diversidade de espécies de *Trichoderma* e quais e como são os mecanismos desenvolvidos por esse microrganismo e sua interação com o meio ambiente, em sua ecologia, com as plantas, na rizosfera e no biocontrole de doenças de plantas, *in vitro* ou *in vivo*.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, buscou-se aprofundar os conhecimentos sobre formas eficientes de controle da doença podridão abacaxi, causada pelo fungo *Thielaviopsis* sp. na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Este agente causal pode acometer diversas culturas e, segundo McNew (1960) pode ser classificado no Grupo I de doenças por causar podridões de órgãos de reserva. Trata-se de um patógeno agressivo que pode levar as plantas à morte no início do seu ciclo de desenvolvimento, limitando a brotação das gemas e, em casos mais severos, necessitando a reposição de plantas perdidas. Esse replantio gera custos adicionais aos agricultores e maior demanda por medidas de manejo da cultura. O controle da doença é comumente realizado por meio do controle cultural. Especialmente a escolha da época de plantio adequada é muito importante para que a brotação das gemas ocorra rapidamente de forma a escapar da infecção pelo patógeno. A escolha de cultivares com rápida brotação, com gemas jovens, o preparo do solo para reduzir compactação e favorecer a brotação e a atenção profundidade do plantio, são outras medidas de manejo que devem ser adotadas. O controle químico é uma opção, mas não a principal, uma vez que se trata de uma doença causada por patógeno habitante do solo, sendo assim de difícil controle por esse método.

A utilização do controle biológico no manejo integrado de doenças vem ganhando destaque nos últimos anos e no cenário econômico e ecológico da agricultura atual por oferecer diversos benefícios. Vale ressaltar a importância de pesquisas para compreender melhor as interações existentes entre microrganismos-planta-patógeno, que podem influenciar no desenvolvimento das plantas e obter subsídios para que se promovam interações que forneçam o desenvolvimento sadio das plantas e atuem na redução ou controle de doenças de interesse agrônomo.

como presente estudo contém informações sobre metodologias adaptadas ao uso dos microrganismos em questão, possibilitando verificar o comportamento desses organismos nos diferentes ambientes, ou seja, buscou-se por resultados que possam de fato contribuir para o desempenho da cultura, nas condições naturais. Será importante prosseguir com esses estudos nas condições agrícolas reais e, também, aprofundar nos estudos de laboratório. A maioria dos trabalhos realizados com *Trichoderma* spp. para controle de *Thielaviopsis* spp., até o momento, consistiu em testes para avaliar o potencial de supressão do patógeno *in vitro*. Por outro lado, há aspectos importantes relacionados às interações microbianas que podem ser esclarecidos mediante estudos de laboratório,

por exemplo, a identificação dos compostos orgânicos envolvidos no controle da doença, melhorias no processo de produção dos agentes de biocontrole e otimização da produção desses compostos orgânicos.

Os resultados obtidos nesta pesquisa servem como guia para estudos futuros relacionados ao controle da podridão abacaxi com uso de *Trichoderma*. Adaptações podem ser feitas com relação a quantidade de gemas utilizadas nos plantios, já que no plantio mecanizado normalmente são utilizadas de 3 a 5 gemas. Olhando por outro ângulo, estudos mais recentes apontam para o uso de gemas individuais e estabelecimento de viveiros (MPB), com vistas à oferta de mudas sadias para a implantação de canaviais. Com relação à microbiolização de toletes e gemas para o plantio, seja em viveiros ou em condições de campo, há necessidade de ajustes da concentração de propágulos nas suspensões de *Trichoderma*, para adequá-las aos tipos de formulação passíveis de serem desenvolvidas comercialmente. Nesse aspecto, é importante um trabalho conjunto com empresas especializadas no desenvolvimento de produtos biológicos de uso agrícola.

## 9. CONCLUSÕES

- I. Dezesesseis linhagens de *Trichoderma* da Coleção de Agentes de Biocontrole da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) foram testadas contra o patógeno *Thielaviopsis* sp. (CEN1647) que, em testes de patogenicidade, induziu os sintomas da doença podridão abacaxi.
- II. Nos experimentos em que foi utilizado o método de culturas pareada, a linhagem CEN281 (*T. afroharzianum*) destacou-se das demais com 76,5% de ICM.
- III. Sob exposição aos compostos orgânicos voláteis (COVs), os maiores índices de inibição foram observados com a linhagem CEN1277 (*T. asperelloides*) com 65,9% de inibição do crescimento micelial do patógeno.
- IV. Ao se verificar a produção de compostos orgânicos não voláteis termoestáveis, CEN1546 (*T. afroharzianum*) foi a linhagem que demonstrou habilidade para inibir o desenvolvimento das colônias do patógeno nos três experimentos conduzidos.
- V. Quatro linhagens foram escolhidas para os experimentos subsequentes, juntamente com um isolado obtido a partir do produto comercial Trichodermil (ESALQ-1306) sendo este o CEN219, os demais foram CEN281 (*T. afroharzianum*), CEN1277 (*T. asperelloides*), CEN1513 (*T. koningiopsis*) e CEN1546 (*T. harzianum*).
- VI. Experimento utilizando o método de atmosfera compartilhada (COVs) em diferentes fases de desenvolvimento das colônias de *Trichoderma* spp. o pico de inibição ocorreu após 72 horas, com a maioria das linhagens, apenas o CEN1513 (*T. koningiopsis*) que apresentou pico de inibição às 48 horas.
- VII. Quanto ao potencial das linhagens de *Trichoderma* para redução da severidade da podridão abacaxi, por meio de tratamento dos mini-toletes em laboratório, destacou-se a linhagem CEN1277 (*T. asperelloides*) com resultado similar a linhagem comercial.
- VIII. Em casa de vegetação o resultado se repetiu com as mesmas linhagens, CEN1277 (*T. asperelloides*) e CEN219 (*T. harzianum* – Comercial).

## 10. REFERÊNCIAS

- ABREU, L.M. & PFENNING, L.H. O Gênero *Trichoderma* In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. *Trichoderma*: uso na agricultura. 1ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- AGROFIT. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 11 de setembro de 2021.
- AJAYI, A.M.; OLUFOLAJU, D.B.; LAJIDE, L. Pineapple disease of sugarcane: an assessment of three *Trichoderma* spp. for use as possible biocontrol agentes. International Journal of Advanced Academic Research (Sciences, Technology & Engineering), vol. 2, issue 8. 2016.
- ALHUDAIB, K.A.; EL-GANAINY, S.M.; ALMAGHASLA, M.I.; SATTA, M.N. Characterization and Control of *Thielaviopsis punccunlata* on Date Palm in Saudi Arabia. Plants, n.11, v.250. 2022.
- ÁLVAREZ, E.; GERMÁN, A.L.; LOKE, J.B.; CHACON, M.I. Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* Isolates from Oil Palms in Colombia, Ecuador, and Brazil. Journal of Phytopathology, Gottingen, v. 160, p. 690-700, 2012.
- AL-HAZMI, A. S. & TARIQJAVEED, M. Effects of diferent inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. Saudi Journal of Biological Sciences 23: 288-292. 2015.
- ARAÚJO, D.F.C. de; ARAÚJO SOBRINHO, F.L. A cultura agrícola da cana-de-açúcar no Brasil: contribuição ao estudo dos territórios rurais e suas contradições e conflitos. Revista Geopauta, vol. 4, núm. 1. pp. 162-183. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2020.
- ARAÚJO, N.D. Produção de diferentes variedades de cana-de-açúcar infestadas pela broca do colmo. Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária. João Pessoa, PB. v.12. n.5, p.25-30, dezembro, 2018. Disponível em: <https://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-12-2018/volume-12-n-5-2018/05-ce-0818-06-producao-de-diferentes-variedades-de-cana-de-acucar.pdf>. Acesso em: 07 de setembro de 2021.
- AULER, A.C.V.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfisii* nas culturas do feijoeiro e soja. Revista Agroambiente On-line, v. 7, n.3, p. 359-365. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR. 2013.

- BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7(4):249-260. 2004
- BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA. p.135-156.1991.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Ed(s). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. 1 ed. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo, p. 341. 2009.
- BETTIOL, W.; PINTO, Z.V.; SILVA, J.C.; FORNER, C.; FARIA, M.R.; PACÍFICO, M.G.; COSTA, L.S.A. Produtos comerciais à base de *Trichoderma* In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. *Trichoderma*: uso na agricultura. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- BORGES, A.F.; ALCÂNTARA NETO, F. de; MATOS, K.S.; BESERRA JÚNIOR, J.E.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.; MOREIRA, S.I.; MELO, M.P. *Thielaviopsis ethacetica* the etiological agent of sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil. *Trop. Plant Pathol.*, v.44, p.460-467. 2019.
- BOTELHO, A.S. Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com agrotóxicos e inibição de patógenos do solo por cepas comerciais e não comerciais. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília - DF. 2022.
- BOYD, H.W.; GALLI, F. Efeito do armazenamento da cana-de-açúcar sobre a “germinação” e sobre a incidência da podridão-abacaxi, causada por *Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Moreau. *Anais da ESALQ*, Piracicaba, SP. 23:229-245, 1966.
- BRANDI, F.; HECK, D.W.; FERREIRA, T.C.; BETTIOL, W. Commercial formulations of *Bacillus* spp. for sugarcane pineapple disease control and growth promotion. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.53, n.12, p.1311-1319, Dec, 2018.
- CAI, F.; YU, G.; WANG, P.; WEI, Z.; FU, L.; SHEN, Q. & CHEN, W. Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology Biochemistry* 73:106–113. 2013.
- CARNEIRO, V.A.; CASAROLI, D.; SANTOS, F.C.V. Cana-de-açúcar: Uma Abordagem Climática. *Revista Mirante*, Anápolis (GO), v.8, n.3. Dec. 2015.
- CASAGRANDE, A.A. Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar. Jaboticabal: Funep, p. 157, 1991.
- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento

- inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. Tropical Plant Pathology, vol. 36,1, 028-034. 2011.
- CARVALHO, D.D.C.; GERALDINE, A.M.; LOBO JUNIOR, M.; MELLO, S.C.M. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 50(12):1220-1224, 2015.
- CHAGAS, L. F. B.; JUNIOR, A. F. C.; SOARES, L. P. & FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. 2017. Revista de Agricultura Neotropical 4: 97-102. 2017.
- CHAPOLA, R.G.; OGASAWARA, G.A.; JANS, B.; MASSOLA JUNIOR, N.S. Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em rebolos no sulco de plantio. Ciência Rural, Santa Maria, v,44, n.2, p.197-202, fev, 2014.
- CHEN, J.L.; SUN, S.Z.; MIAO, C.P.; WU, K.; CHEN, Y.W.; XU, L.H.; GUAN, H.L.; ZHAO, L.X. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. Journal of Ginseng Research, 40: 315-324. 2016.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, DF, v. 8, n. 1, agosto 2021.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 149, 1579–1592. 2009.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; ALFARO-CUEVAS, R.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na<sup>+</sup> elimination through root exudates. Mol. Plant Microbe Interact. 27, 503–514. 2014.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; LÓPEZ-BUCIO, J.S.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; RAMOSVEGA, M.; GUEVARA-GARCÍA, Á.A.; LÓPEZ-BUCIO, J. Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* rootsystem architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. Mol. Plant-Microbe Interact. 28, 701–710. 2015.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; DEL-VAL, E.; LARSEN, J. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. FEMS Microbiol. Ecol. 92. 2016.

- COOK, M.T. A doença do abacaxi da cana-de-açúcar em Porto Rico. O Jornal de Agricultura da Universidade de Porto Rico, 17 (4), 305-309. 1933.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 539p. 1983.
- COONEY, J. M.; LAUREN, D. R.; DI MENNA, M. E. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 1, p. 522-526, 2001.
- DIAS, C.M.O. Indicadores fisiológicos, fitotécnicos e agroindustriais de variedades de cana de açúcar cultivadas sob duas condições hídricas. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal no Semiárido. Universidade Estadual de Montes Claros. 67 p. 2011.
- DIAS, V.D; CARRER FILHO, R.; CUNHA, M.G. Comparison of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* molecular detection in heat-treated sugarcane setts. Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, v. 49. 2019.
- DEMIRCI, E. et al. In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. Turkish Journal of Biology, Ankara, v. 35, p. 457-462, 2011.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotic. Transactions British Mycological Society, 57: 41-48. 1971.
- DE BEER, Z.W.; DUONG, T.A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. Studies in Mycology, New York, v. 79, p. 187-219, 2014.
- DOMINGUES, A.T. As políticas da agroindústria canavieira e o proálcool no Brasil. Revista Pegada, v. 15 n.2, p. 15-27, 2014.
- EDGERTON, C. W, Some sugar cane diseases. LSU Agricultural Experiment Station Reports. 485. 1910.
- EDGERTON, C. W. (1958) Pineapple disease. In: Sugarcane and its diseases. Louisiana State University Press: Baton Rouge. p. 103-106, 1958.
- EL-HASAN, A.; WALKER, F.; BUCHENAUER, H. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. Journal of Phytopathology, v. 156, n. 2, p. 79-87, 2008.
- ELSHARBINY, E. A. et al. *Trichoderma* volatile organic compounds as a biofumigation tool against late blight pathogen *Phytophthora infestans* in postharvest Potato tubers. Journal of agricultural and food chemistry, v. 68, n. 31, p. 8163-8171, 2020.

- ESPÍNDOLA, G.M. Promoção de crescimento na cana-de-açúcar infectada por *Ceratocystis paradoxa* com fungo e bactérias antagonistas. Monografia ao curso de Agronomia. Universidade Federal de Uberlândia, p.23. 2017.
- EZIASHI, E.I.; UMA, N.U.; ADEKUNLE, A.A.; AIREDE, C.E. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. African Journal of Biotechnology, vol. 5, pp. 703-706. 2006.
- FERREIRA, M. da C. et al. Tratamento de toletes de cana-de-açúcar para o controle da podridão-abacaxi em pulverização conjugada ao plantio mecanizado. Engenharia Agrícola. Associação Brasileira de Engenharia Agrícola, v. 28, n. 2, p. 263-273, 2008.
- Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, 35: 1039-1042. 2011.
- FERREIRA, T.C. *Bacillus* spp. como agentes de controle de *Thielaviopsis* sp. e *Fusarium verticillioides* e promotores de crescimento de cana-de-açúcar e milho. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu-SP. 2018.
- FILIPPIN, F. L. P. Cultivo da cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum* L.) no Brasil: uma revisão. Brasília: Universidade de Brasília. Tese de Conclusão de Curso. 2021.
- FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Orgs). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. Bauru, SP. Editora: Canal 6. p. 89-101. 2017.
- GARNICA-VERGARA, A.; BARRERA-ORTIZ, S.; MUÑOZ-PARRA, E.; RAYA-GONZÁLEZ, J.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; LÓPEZ-BUCIO, J. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* functioning, New Phytologist Foundation, vol. 209, issue, 4, p.1496-1512. 2015
- GAVA, C.A.T.; PINTO, J.M. Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. melonis using seed treatment with *Trichoderma* spp. and liquid compost. Biol. Control 97, 13–20. 2016.
- GHELLER, A.C.A. Técnica cultural para o controle da podridão abacaxi em cana-de-açúcar e modelo para estimativa de perdas. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.
- GÍRIO, L.A.S.; DIAS, F.L.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M.A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no

- crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.50, n.1, p.33-43. 2015.
- GOES, T.; MARRA, R.; SILVA, G.S.e. Setor sucroalcooleiro no Brasil Situação atual e perspectivas. *Revista de Política Agrícola*. Brasília. Ano XVII, n. 1, p. 39-51, abr./mai./jun. 2008.
- GONZÁLEZ-PEREZ, E.; ORTEGA-AMARO, M.A; SALAZAR-BADILLO, F.B; BAUTISTA, E.; DOUTERLUNGNE, E.; BREMONT, J.F.J. The *Arabidopsis*-*Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific Reports*, 8: 1-14. 2018.
- GUIMARÃES, G.R.; op, D.S.; GALVÃO, C.S.; MELLO, S.C.M; CARVALHO, D.D.C. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Cladosporium herbarum*. *Pesq. Agropec. Pernamb, Recife*, v. 21, n.1, p. 7-11. 2016.
- GUO, Y.; GHIRARDO, A.; WEBER, B.; SCHNUTZIER, J.P.; BENZ, J.P.; ROSENKRANZ, M. *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1-15. 2019.
- GUPTA, V. G. et al. (Ed.). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. *Microbial Pathogenesis* (129), 7-18. 2014.
- HADDAD, P.E.; LEITE, L.G.; LUCON, C.M.M.; HAKAKAVA, R. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52: 1140-1148. 2017.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. 4. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56. 2004.
- HERBERICH E, SIKORSKI J, HOTHORN T. A Robust Procedure for Comparing Multiple Means under Heteroscedasticity in Unbalanced Designs. *PLoS ONE* 5(3): e9788. 2010.
- HIRPARA, D.G.; GAJERA, H.P.; HIRPARA, H.Z.; GOLAKIYA, B.A. Antipathy of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Sacc.: evaluation of cell wall-degrading enzymatic activities and molecular diversity analysis of antagonistic. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27:22 28. 2017.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, v. 87, p. 4-10, 2003.
- HYAKUMACHI, M.; KUBOTA, M. Fungi as plant growth promoter and disease suppressor. In: Arora, D.K. (Ed.), *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Application*. Marcel Dekker, New York, pp. 101–110. 2003.

- HYNES, J.; MÜLLER, C.T.; JONES, T.H.; BODDY, L. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 43-57. 2007.
- IQBAL, U., MUKHTAR, T. Evaluation of Biocontrol Potential of Seven Indigenous *Trichoderma* Species against Charcoal Rot Causing Fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Gesunde Pflanzen*, n.72, p.195–202. 2020
- ISAIAS, C.O.; MARTINS, I.; SILVA, J.B.T; SILVA, J.P.; MELLO, S.C.M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahlia*. *Summa Phytopathologica* 40(1):34-41, 2014.
- JAYAPRAKASHVEL, M. et al. Control of sheath blight disease in rice by thermostable secondary metabolites of *Trichothecium roseum* MML003. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 126, p. 229-239, 2010.
- JELEN, H. et al. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress*, v. 13, n. 3, p. 589-600, 2014.
- KANNANGARA, S.; DHARMARATHA, R.M.G.C.S.; JAYARATHNA, D.L. Isolation, Identification and Characterization of *Trichoderma* Species as a Potential Biocontrol Agent against *Ceratocystis paradoxa*. *The Journal of Agricultural Sciences*. Vol. 2, No. 1. Pp 51-62. Jan. 2017.
- KUMAR, S. *Trichoderma*: A biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. *Int. J. Agrl. Sc. & Vet. Med.* 1(3):1-18. 2013.
- KOTTB, M.; GIGOLASHVILI, T.; GROBKINKY, D.; PIECHULLA, B. *Trichoderma* volatiles effecting Arabidopsis: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-14. 2015.
- LARSEN, T.O.; FRISVAD, J.C. Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. *Mycological Research*, 99: 1167-1174. 1995
- LEE, D.; YAP, M.; BEHRINGER, G.; HUNG, R.; BENNET, W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3: 1-14. 2016.
- MACHADO, D.F.M.; PARZIANELLO, F.R.; SILVA, A.C.F.; & ANTONIOLLI, Z.I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias* 35:274-288, 2012.
- MAGRO, F.J.; TAKAO, G.; CAMARGO, P.E.; TAKAMATSU, S.Y. *Biometria em Cana-de-açúcar*. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. LPV0684-Produção de cana-de-açúcar. Piracicaba-SP, 2011.

- MAPA. Mapa registra recorde de 95 defensivos de controle biológico em 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/Mapa-registra-recorde-de-95-defensivos-biologicos-em-2020>. Acesso em: 15 de setembro de 2021.
- MARQUES, E. MARTINS, I.; MELLO, S.C.M.de. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotrópica* 18(1). 2018.
- MATOS, T.C.de. A cultura da cana-de-açúcar e os desafios no controle das principais pragas e doenças. Monografia do trabalho de graduação. Areia: UFPB/CCA, 2022.
- MEDEIROS, C. de C.P. Diversidade genética de isolados de *Thielaviopsis* sp. em cana-de-açúcar. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015.
- MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; BRAÚNA, L. M.; PÁDUA, R. R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*. Vol.1, no. 1.Marzo, 2007.
- MELLO, S.C.M.; ECKSTEIN, B.; MARQUES, E.; CARVALHO, D.D.C. Controle de Doenças de Plantas In: FONTES, E.M.G.; VALDARES-INGLIS, M.C. Controle Biológico de Pragas da Agricultura. Brasília, DF. Embrapa, 2020.
- MELO, IS- Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, IS e Azevedo, JL (Ed.) - Controle Biológico, v.1. Jaguariúna, Embrapa, p.17–60, 1998.
- NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5543&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> Acesso em: 15 de setembro de 2021.
- MONTALVÃO, S.C.L.; MARQUES, E.; SILVA, J.B.T; SILVA, J.P.; MELLO, S.C.M. *Trichoderma* activity in seed germination, promoting seedling growth and rhizocompetence in tomato plants. *Journal of Agricultural Science*; vol. 12. no. 10, 2020.
- MUKHOPADHYAY, R.; KUMAR, D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* (30): 133. 2020.
- NASCIMENTO, S.M.C.do; NAKASONE, A.K.; OLIVEIRA NETO, C.F.de; ALVEZ, K.F.; SOBRINHO, R.S.A.; CONCEIÇÃO, S.S.; CAMPOS, K.R.A.; CARVALHO, E.A. Patogenicidade e caracterização de *Thielaviopsis ethacetica* em palma de óleo. *Summa Phytopathol, Botucatu*, v.46, n.3, p.236-241, 2020.
- NOCELLI, R.C.F.; ROTA, T.C.; SOCOLOWSKI, P.C.; MALASPINA, O. Controle de Pragas na cana-de-açúcar e Seu Impacto Sobre Organismos Voadores Não Alvos. In:

- FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Orgs). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. Bauru, SP. Editora: Canal 6. p. 89-101. 2017.
- NOVACANA. Disponível em: <https://www.novacana.com/cana-de-acucar>. Acesso em: 01 de setembro de 2021.
- ORTÍZ-CASTRO, R.; CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUES, L.; LÓPEZ-BUCIO, J. The role of microbial signals in plant Growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4: 701-712. 2009.
- PARRA, D.; MORILLO, F.; SÁNCHEZ, P.; PINEDA, J.; GUERRA, J. Presencia de *Thielaviopsis* sp. De Seynes Hohn en el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Coleoptera: Curculionidae), *Entomotropica*, Venezuela, v.18, n.1, p.49-55, 2003.
- PASCHOLATI, S.F.; SOUZA, V.H.M. de.; FILHO, J.A.C. Indução de resistência por *Trichoderma*. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. *Trichoderma*: uso na agricultura. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- PERSOON, C. H. Dispositio methodica fungorum in classes, ordines, familias et genera. In: Neues Magazin fur Botanik (Romer J. J., ed.). Ziegler und Sohne, Zurich, p. 63-128, (in German). 1974.
- PINHEIRO, C.C.C.; CARDOSO, A.F.; SANTOS, A.K.A.; LINS, P.M.P.; SILVA, G.B. Eficiência do biocontrole por *Trichoderma* sp. contra *Thielaviopsis* sp., agente etiológico da resinose do coqueiro. III Congresso Internacional das Ciências Agrárias COINTER-PDVAGRO. Apresentação: Comunicação oral. 2018.
- POMELLA, A.W.V; RIBEIRO, R.T.D. Controle Biológico com *Trichoderma* em Grandes Culturas – Uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. 1 ed. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente. 2009.
- RABUSKE, J.E. *Trichoderma asperellum* no manejo de doenças e na promoção de crescimento de plantas de Nogueira-pecã. Tese (doutorado), p. 174 – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, Rio Grande do Sul. 2021.
- RAHMAN, M. A.; BEGUM, M. F.; ALAM, M. F. Screening of *Trichoderma* Isolates as a Biological Control Agent against *Ceratocystis paradoxa* Causing Pineapple Disease of Sugarcane, *Mycobiology*, 37:4, 277-285, 2009.
- RAID, R. N. Pineapple disease of sugarcane. Florida Sugarcane Handbook. Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2009.

- RAID, R.N. Pineapple disease of sugarcane. Flórida: University of Florida, pg:2, 2012.
- RAJANI, P.; RAJASEKARAN, C.; VASANTHAKUMARI, M.M.; SHANNON, B.O.; RAVIKANTH, G.; SHAANKER, U. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 242:126595. 2021.
- RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*, *Mycological Papers*, v. 116, p. 47-56, 1969.
- RAUT, J.; BADEA-DONI, M.; CANLIN, M.; OANCEA, F.; VASILESCU, G.; SESAN, T.E.; JECU, L. Effect of Volatile and Non-Volatile Metabolites from *Trichoderma* spp. against Important Phytopathogens. *Revista de Chimie-Bucharest-Original Edition*. Vol. 65, No. 11. 2014.
- RODRIGUES, G.S.S.C.; ROSS, J.L.S. A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográficas, histórica e ambiental [online]. EDUFU. Uberlândia, MG. p. 269. 2020.
- ROMÃO-DUMARESQ, A.S., DE ARAÚJO, W.L., TALBOT, N.J., THORNTON, C.R. RNA Interference of Endochitinases in the Sugarcane Endophyte *Trichoderma virens* 223 Reduces Its Fitness as a Biocontrol Agent of Pineapple Disease. *PLoS ONE* 7(10): e47888. 2012.
- ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. (Ed.). A guide to sugarcane diseases. Montpellier: ISSCT, 339 p. 2000.
- SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. *Pesquisa Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*. v2 n3 set/dez. 2009.
- SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CÁRDENAS, E.; CÓRDOVA, J.; GONZÁLEZ, O.; SAMUELS, G. J. In vitro antagonismo of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia*, 163: 49-59. 2007.
- SANSOLI-CHANQUINIE, D.M. Diversidade patogênica em isolados de *Thielaviopsis* sp. provenientes de diferentes áreas produtoras de cana-de-açúcar. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2015.
- SHANMUGAN, P.S.; SANGEETHA, M.; SARAVANAN, N.A.; TAMILSELVAN, N. Management of sett rot [*Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Moreau] In Sustainable Sugarcane Initiative (SSI) Nurseries. *Na International Quarterly Journal of Life Sciences*. The Bioscan, 11(3): 1382-1383. 2016.

- SIDDAIAH, C.N.; SATYANARAYANA, N.R.; MUDILI, V.; GUPTA, V.K.; GURUNATHAN, S.; RANGAPPA, S.; HUNTRIKE, S.S.; SRIVASTAVA, R.K. Elicitation of resistance and associated defense responses in *Trichoderma hamatum* induced protection against pearl millet downy mildew pathogen. *Sci. Rep.* 7, 43991. 2017.
- STEINDORFF, A.S. Genômica estrutural e funcional de fungos do gênero *Trichoderma*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil. 2016.
- STRACQUADANIO, C.; QUILES, J.M.; MECA, G.; CACCIOLA, S.O. Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in Liquid Medium. *Journal of Fungi*, 6, 263. 2020.
- SHARMA, P. Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control. *Australian Journal of CropScience*. 5(8):1027-1038. 2011.
- SHRUTHI, T.H.; SUNKAD, G.; MALLESH, S.B.; YENJERAPPA, S.T.; MAHADEVSWAMY. Isolation and bio-efficacy screening of native *Trichoderma* species as a potential biocontrol agents against pomegranate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* Ellis and Halst. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(5): 1581-1585. 2019.
- SILVA, V.N., GUZZO, S.D.; LUCON, C.M.M.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 46(12). Dez. 2011.
- SILVA, F. P. da. O Setor Sucroalcooleiro No Brasil: Características, Perspectivas e Crise. 56º Congresso Da Sociedade Brasileira De Economia, Administração e Sociologia Rural, Campina, SP. 2018.
- SILVA, J.M.; NASCIMENTO, M.S.; CRISTO, C.C.N.; SILVA, C.E.; SILVA, C.S.; SANTOS, T.M.C. Antagonismo de *Thielaviopsis* sp. e *Fusarium oxysporum* por fungos rizosféricos associados à cactáceas no semiárido alagoano e eficiência de duas técnicas de avaliação. *Gl. Sci. Technol*, Rio Verde, v.12, n.01, p.197-206, jan/abr.2019
- SILVA, L.R., VALADARES-INGLIS, M.C., MORAES, M.C.B., MAGALHÃES, D.M., SIFUENTES, D.N., MARTINS, I. MELLO, S.C.M. Morphological and protein alterations in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary after exposure to volatile organic compounds of *Trichoderma* spp. *Biological Control*. n.147, p.1-7. 2020.
- SILVA, LR.; MUNIZ, P.H.P.C.; PEIXOTO, G.H.S.; LUCCAS, B.E.G.D.; SILVA, J.B.T.; MELLO, S.C.M. Mycelial inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. volatile organic compounds in distinct stages of development. *Pak. J. Biol. Sci.*, 24: 527-536. 2021.

- SOUZA PEDRO, E.A.; HARAKAVA, R.; LUCON, C.M.M.; GUZZO, S.D. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 47: 1589-1595. 2012.
- SYNGENTA BRASIL. Disponível em: <https://www.portalsyngenta.com.br/cultura/cana-de-acucar> Acesso em: 07 de setembro de 2021.
- SYNGENTA BRASIL. Disponível em: <https://portal.syngenta.com.br/noticias/cana-por-que-controlar-os-fungos-de-solo-e-essencial> Acesso em: 17 de outubro de 2022.
- TALUKDER, M.I.; BEGUM, F.; AZAD, M.M.K. Management of pineapple disease of sugarcane through biological means. Journal of Agriculture and Rural Development, Gazipur, v.5, n.1, p. 79-83, 2007.
- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). Manual de fitopatologia. v. 2. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1997.
- UZAN, J. Podridão abacaxi da cana-de-açúcar: reação de variedades, controle químico e diversidade patogênica. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras. 2019.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., MARRA, R., BARBETTI, M.J.; LI, H.; WOO, S.L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. Phyriological and Molecular Plant Pathology. (72): 80-86. 2008.
- VINALE, F., NIGRO, M., SIVASITHAMPARAM, K., FLEMATTI, G., GHISALBERTI, E., RUOCCO, M., VARLESE, R., MARRA, R., LANZUISE, S., EID, A., WOO, S.L., LORITO, M. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol. Letters. 347, 123–129. 2013.
- WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology, 22: 837-845. 1932.
- WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lingorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology, v. 24, p. 1153. 1934.
- WEINDLING, R. & FAWCETT, H.S. Experiments in the Control of *Rhizoctonia* Damping-off of Citrus Seedlings. Journal of Agricultural Science, 10(1):1-16, 1936.
- WIJESINGHE, C.J.; WIJERATNAM, W.R.S.; SAMARASEKARA, J.K.R.R.; WIJESUNDERA, R.L.C. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to

- control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). Biological Control. (53): 285-290. 2010.
- WIJESINGHE, C.J.; WIJERATNAM, W.R.S.; SAMARASEKARA, J.K.R.R.; WIJESUNDERA, R.L.C. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). Crop Protection. (30): 300-306. 2011.
- WISMER, C.A. Pineapple disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V. & HUGHES, C.G. Sugar-cane diseases of the world. New York, Elsevier Publishing Company. v. 1, p.222-235, 1961.
- WONGLOM, P.; DAENGSUWAN, W.; ITOD, S.; SUNPAPAO, A. Biological control of *Sclerotium* fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved. Physiological and Molecular Plant Pathology, 107:1-7. 2019.
- XUE, A.G.; GUO, W.; CHEN, Y.; SIDDIQUI, I.; MARCHAND, G.; LIU, J.; REN, C. Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* spp. on establishment and yield of spring wheat. J. Crop Protection 96, 97–102. 2017.
- YANG, Z. et al. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. Journal of Asia-Pacific Entomology, v. 15, n. 4, p. 647-650, 2012.
- YARA BRASIL. Disponível em: <https://www.yarabrasil.com.br/conteudo-agronomico/blog/producao-mundial-de-cana-de-acucar/>. Acesso em: 27 de agosto de 2021.
- YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A.K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant Soil 235, 235–242. 2001.
- YUAN, H.; ZHU, Z.; LIU, S.; GE, T.; JING, H.; LI, B.; LIU, Q.; LYNN, T.M.; WU, J.; KUZYAKOV, Y. Microbial utilization of rice root exudates: <sup>13</sup>C labeling and PLFA composition. Biol. Fert. Soils. 52, 615–627. 2016.
- ZIN, N.A.; BADALUDDIN, N.A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences, (65); 168-178. 2020.