



## Avaliação de isolados nativos de *Trichoderma* e efeito inibitório sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Maevi Fornazari <sup>a</sup>, Gislaine Ribeiro Gomes <sup>a</sup>, Alan Douglas Vieira Telles <sup>a</sup>, Lurdes Mundstock <sup>a</sup>, Henrique von Hertwig Bittencourt <sup>a</sup>, Gilmar Franzener <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil<sup>1</sup>

\* Autor correspondente (gfranzener@hotmail.com)

### INFO

#### Keywords

white mold  
soil fungi  
biological control  
microbiota

#### Palavras-chaves

mofo-branco  
fungos de solo  
controle biológico  
microbiota

### ABSTRACT

#### *Evaluation of native isolates of *Trichoderma* and inhibitory effect on *Sclerotinia sclerotiorum**

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is the causal agent of white mold, a disease of great importance in many species of cultivated plants. It is a pathogen that is difficult to control and forms resistance structures (sclerotia), capable of remaining in the area for many years. Seeking more sustainable methods of controlling this disease, biological control stands out, such as, for example, with the antagonistic fungus *Trichoderma*. The present work aimed to evaluate the presence and inhibitory effect of *Trichoderma* isolates native to the region of Laranjeiras do Sul/PR, on *Sclerotinia Sclerotiorum*. Different bioassays were carried out to evaluate the effect of the isolates on *S. sclerotiorum* in vitro and also the protective effect in vivo on lettuce plants. Three *Trichoderma* isolates were identified that promoted significant inhibition of the mycelial growth of *S. sclerotiorum*, as well as the formation of sclerotia in vitro. The isolates also promoted a reduction in the severity of white mold on lettuce plants. The results obtained demonstrate the natural occurrence of *Trichoderma* isolates in Laranjeiras do Sul with significant effect on the control of *S. sclerotiorum*.

### RESUMO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é agente causal do mofo-branco, uma doença de grande importância em muitas espécies de plantas cultivadas. É um patógeno de difícil controle, e que forma estruturas de resistência (escleródios), capazes de permanecer na área por muitos anos. Buscando métodos mais sustentáveis de controle dessa doença, destaca-se o controle biológico, como, por exemplo, com o fungo antagonista *Trichoderma*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a presença e o efeito inibitório de isolados de *Trichoderma* nativos da região de Laranjeiras do Sul/PR, sobre *Sclerotinia Sclerotiorum*. Foram realizados diferentes bioensaios para avaliação do efeito dos isolados sobre *S. sclerotiorum* in vitro e também no efeito protetor in vivo em plantas de alface. Foi realizada a identificação de três isolados *Trichoderma* que promoveram significativa inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, bem como na formação de escleródios in vitro. Os isolados também promoveram redução na severidade do mofo-branco em plantas de alface. Os resultados obtidos demonstram a ocorrência natural de isolados de *Trichoderma* em Laranjeiras do Sul com expressivo efeito no controle de *S. sclerotiorum*.



## INTRODUÇÃO

Os fungos fitopatogênicos de solo estão entre os mais importantes agentes que afetam plantas cultivadas (Malik et al., 2024). Dentre esses, se destaca *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, que é bastante agressivo e infecta várias partes da planta hospedeira incluindo folhas, flores, caule e frutos, causando a doença conhecida por mofo-branco (Agrios, 2005).

Um dos fatores que dificulta o controle do mofo-branco é o fato do fungo *S. sclerotiorum* formar estruturas de resistência que podem permanecer no solo por vários anos. Estas estruturas são chamadas de escleródios e são constituídas por um aglomerado de hifas (Krause-Sakate et al., 2016). Os sintomas do mofo-branco incluem a formação de micélio branco espesso sobre as partes atingidas da planta. O tecido da planta é necrosado, e então ocorre o apodrecimento e morte da planta. Quando frutos, tubérculos e raízes tuberosas são atacadas também há o apodrecimento, seguido do crescimento de um mofo branco sobre eles, associado à formação de escleródios (Han et al., 2023).

Dentre as diferentes espécies de plantas cultivadas que podem ser afetadas pelo mofo-branco está a alface (*Lactuca sativa* L.), planta da família Asteraceae, de origem asiática, considerada a hortaliça folhosa de maior comércio no Brasil, se destacando por apresentar em sua composição vitaminas, especialmente vitamina A, bem como, de sais minerais. Essa hortaliça pode ser afetada por várias doenças, sejam elas causadas por bactérias, fungos, nematoides ou vírus, sendo o mofo-branco uma das mais destrutivas (Krause-Sakate et al., 2016).

O controle do mofo-branco é difícil. Embora largamente utilizado, o controle químico pode ter eficiência limitada no controle do mofo-branco (Fipke et al., 2015), além de possíveis efeitos negativos ao ambiente e à saúde humana. Neste contexto, destaca-se a busca por métodos que visem o controle das doenças em plantas, e que ao mesmo tempo, estejam em harmonia com a natureza, e priorizem a qualidade dos alimentos, assim como, a saúde do consumidor e produtor. Um dos métodos de controle que vêm se destacando no manejo fitossanitário é o controle biológico, pelo uso de microrganismos que realizam o controle de outros organismos que afetam negativamente as plantas (Han et al., 2023).

Um dos microrganismos mais conhecidos e utilizados no controle biológico de doenças em plantas cultivadas é o *Trichoderma* (Portolan et al., 2020), gênero de fungos de vida livre e que se reproduzem assexuadamente. *Trichoderma* é fungo de solo, mas também pode ser encontrado em

madeira na sua forma sexual. Esse fungo geralmente tem abundante esporulação, com formação de conídios (Machado et al., 2012).

Espécies de *Trichoderma* podem ocorrer em ambientes distintos e atuar no controle biológico através de diferentes mecanismos de ação (Jiménez-Bremont et al., 2024; Yassin et al., 2021). Um dos mecanismos do *Trichoderma* é o hiperparasitismo, que é a relação onde o organismo hiperparasita tem a capacidade de identificar e localizar hifas vulneráveis, enrolarem-se fortemente na hifa, e a digerirem. Para Harman (2000), este fenômeno é chamado de micoparasitismo, e representa uma forma de biocontrole de extrema importância. Outro mecanismo de controle que o fungo possui é a competição, sendo a interação entre dois ou mais organismos que competem pelos fatores essenciais à sobrevivência. Há ainda a antibiose, como interação onde um organismo produz metabólitos secundários que prejudicam o outro. Constatou-se que muitas espécies de *Trichoderma* já conhecidas produzem metabólitos tóxicos capazes de impedir o desenvolvimento e a sobrevivência de fungos fitopatogênicos (Li et al., 2025). Dentre essas substâncias existem antibióticos e enzimas líticas, alguns voláteis e outras não (Lopes et al., 2012). Além disso, o fungo *Trichoderma* é capaz de inativar enzimas de patógenos (Harman, 2000).

O uso do *Trichoderma* na agricultura tem sido cada vez mais conhecido, principalmente como agente de controle de fitopatógenos e também como promotor de crescimento em plantas (Jantsch et al., 2023). De acordo com Bernardo et al. (2019), esse fungo é comercializado pelas empresas como biopesticida, promotor de crescimento, biofertilizante e até como indutor de resistência. De acordo com Júnior et al. (2018), é importante que os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados sejam nativos das regiões onde serão utilizados, desta forma garantindo maior adaptação e eficiência. Neste sentido, Fipke et al. (2015) reforça a importância da eficácia, e que, aliado a isso, o microrganismo esteja adaptado às mesmas condições ambientais do patógeno. Além disso, o antagonista escolhido deve demonstrar alta capacidade no confronto com o fitopatógeno, e ao mesmo tempo, não causar efeitos indesejáveis. Assim, o conhecimento sobre a ocorrência, atividade e mecanismos de ação de agentes de controle biológico é fundamental como estratégia ecológica para agricultura sustentável.

Esse trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência natural de isolados de *Trichoderma* em área de mata no município de Laranjeiras do Sul-PR e avaliar o efeito inibitório de isolados nativos do fungo *Trichoderma* sobre *Sclerotinia*

*sclerotiorum*, em testes *in vitro* e também em plantas de alface.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Campus Laranjeiras do Sul – PR. O patógeno *S. sclerotiorum* foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Fitopatologia. O referido patógeno foi proveniente de material sintomático de plantas de alface, obtido no município de Laranjeiras do Sul/PR, e foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar), em escuro a 26 °C.

Os isolados de *Trichoderma* foram obtidos de área de mata nativa localizada na UFFS (25°26'40"S e 52°26'24"O, altitude de 800m) através do método de captura de microrganismos eficientes (EM). Para tanto, utilizou-se 700g de arroz branco cozido sem adição de sal e óleo, que foi distribuído em bandejas de plástico. Cada bandeja foi coberta com um fragmento de gaze, para evitar o contato direto do arroz com o solo. As bandejas foram distribuídas na área de mata nativa, em quatro pontos distintos, através da metodologia de caminhamento aleatório. Todas as bandejas foram enterradas com auxílio de uma pá de bico, utilizada para cavar e retirar a serrapilheira existente no local, material este, que posteriormente foi utilizado para cobrir as bandejas. As mesmas foram retiradas da mata após 15 dias da implantação. Após esse período verificou-se a presença do *Trichoderma* spp. em todas as bandejas, visto que, o fungo é caracterizado por apresentar esporos de coloração verde, o que torna possível sua visualização a olho nu.

Em seguida os microrganismos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, devidamente autoclavado e homogeneizado. Estas foram dispostas em estufa BOD (Biological Oxygen Demand), onde permaneceram incubadas por seis dias, em escuro e temperatura controlada de 26 °C, até a primeira repicagem. Após o período de incubação foi possível selecionar três isolados de *Trichoderma* com base nas características de maior vigor de crescimento, coloração e esporulação da colônia. Os isolados foram nomeados como TH1, TH2, TH3. Para identificação foram preparadas lâminas semi-permanentes e observação de características morfológicas em microscópio óptico.

A confirmação da identificação dos isolados e indicação de espécies foi realizada por protocolo da empresa Neopropecta através da extração e sequenciamento de DNA, e análise de bioinformática da sequência ITS (ITS1-5.8S-ITS2)

obtidas com o sequenciador Minion (*reads*) e tratadas por um *pipeline* composto pelas seguintes etapas: *basecalling*, seleção de *reads* de tamanhos específicos, demultiplexação, remoção de primers, clusterização, classificação taxonômica.

Foram conduzidos diferentes experimentos para avaliar o efeito dos isolados sobre o fungo *S. sclerotiorum*. Constituíram tratamentos os isolados de *Trichoderma* e uma testemunha sem *Trichoderma*. Todos experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições.

Para melhor caracterização dos isolados foi inicialmente conduzido experimento para avaliar a taxa de crescimento micelial das colônias. Para tanto, placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA receberam no centro um disco de micélio de 7 mm de diâmetro e foram incubadas a 26°C, em escuro. Após 24h e 48h foram realizadas medições do diâmetro médio das colônias, através de duas medidas perpendiculares. O cálculo da taxa de crescimento dos fungos foi realizada aplicando a fórmula adaptada por Lilly e Barnett (1951):

$$\text{Taxa de crescimento} = (C2 - C1)/(T2 - T1)$$

Onde C1 é crescimento no tempo T1 (24 h), C2 é o crescimento no tempo T2 (48 h).

Para avaliar o efeito direto dos isolados de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* foi conduzido experimento de pareamento direto. Discos de cultura de sete mm e com sete dias, tanto do patógeno como do isolado de *Trichoderma* foram dispostos a 5 mm de distância da borda da placa de Petri em extremidades opostas (Ethur, 2006). O tratamento testemunha continha apenas o fungo *S. sclerotiorum*. A avaliação foi realizada com uma medição após 48 horas do raio da colônia de *S. sclerotiorum*, e após 14 dias foi avaliado o desenvolvimento dos fungos através de escala de Bell et al. (1982), onde as notas podem variar de 1 a 5, sendo: 1 - *Trichoderma* spp. cresce por toda a placa; 2 - *Trichoderma* spp. cresce e ocupa 2/3 da placa; 3 - *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* crescem até o meio da placa; 4 - *S. sclerotiorum* cresce e ocupa 2/3 da placa; 5 - *S. sclerotiorum* ocupa toda a placa. Também foi determinada a produção de escleródios (estruturas de resistência do patógeno) pela contagem do número em cada placa. A contagem de escleródios foi realizada aos 14 e aos 23 dias após a implantação do experimento.

Em outro experimento foi analisado o efeito de exsudatos de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* (Isaias et al., 2014). Para tanto, os isolados de

*Trichoderma* foram cultivados em frascos erlenmeyer contendo 250 mL de meio BD (batata-dextrose), mantidos sob agitação. Após sete dias de cultivo, o meio foi filtrado em papel de filtro quantitativo e em membrana 0,45 µm de diâmetro de poro, para remoção de todos fragmentos do micélio do fungo. Em seguida foi aferido o pH e adicionado 4% de ágar bacteriológico, seguida de autoclavagem a 120°C por 20 min. O meio foi vertido em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e no centro de cada placa foi adicionado um disco de 7 mm de micélio de *S. sclerotiorum*, seguida de incubação em BOD para posterior avaliação do diâmetro médio das colônias.

Para o teste visando analisar os efeitos dos compostos voláteis de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* o meio de cultura BDA foi adicionado tanto na tampa quanto na base de cada uma das placas de Petri. Um disco de micélio (7 mm) de *S. sclerotiorum* foi colocado sobre o meio no centro da tampa da placa e um disco de micélio de *Trichoderma* sobre a base da placa, e em seguida vedando as duas ao final transferindo-as para a incubadora a 26 °C, em escuro. A avaliação realizou-se 24h e 48h após a incubação. Com auxílio de uma régua milimetrada realizou-se a medição do diâmetro da colônia fúngica formada na placa. Esta avaliação teve o objetivo de analisar se apenas o efeito volátil do antagonista sobre patógeno seria suficiente para realizar o controle, considerando que ambos os fungos não estavam em contato direto. Ao final do experimento também foi realizada a contagem dos escleródios formados por *S. sclerotiorum*.

O experimento *in vivo* foi realizado em plantas de alface, cultivar Elisa. Inicialmente as mudas foram produzidas em bandejas de 200 células, contendo substrato comercial para mudas. Após 30 dias as mudas foram transplantadas para copos plásticos de 300 mL contendo substrato orgânico a base de substrato para mudas e húmus de minhoca 1:1 v/v. Após três dias foi realizada a inoculação através da incorporação de 0,5 g de inóculo (representado por grãos de arroz colonizados com *S. sclerotiorum*) em lados opostos a aproximadamente 1 cm do colo da planta. Após a inoculação do fungo, o solo foi umedecido visando proporcionar um ambiente favorável ao desenvolvimento do patógeno e da planta. Para aplicação dos tratamentos inicialmente preparou-se a suspensão de esporos através de raspagem da colônia micelial de cada um dos isolados de *Trichoderma* (TH1, TH2 e TH3) com auxílio da alça de Drigalski, seguida de filtração em gaze. A concentração do inóculo foi ajustada em  $1 \times 10^6$  esporos por mL, com auxílios e câmara de Neubauer. Na testemunha foi aplicado somente

água destilada. Em seguida foi realizada a aplicação dos tratamentos por aspersão. Em um grupo de plantas a aplicação foi realizada na parte aérea com auxílio de um borrifador, mantendo o solo protegido. Já em outro grupo de plantas a aplicação foi realizada somente sobre o solo. A severidade da doença foi avaliada aos 7, 10 e 12 dias após a inoculação com o patógeno através de uma escala de notas entre 0 e 4, onde 0 representa ausência de sintomas e 4 representa toda planta afetada pela doença.

Os resultados de severidade foram utilizados para calcular a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), por meio da fórmula adaptada por Campbell & Madden (1990):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(x_i + x_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)]$$

Onde: n é o número de avaliações, x é a proporção da doença (nota) e (ti) é o intervalo de tempo entre avaliações (dias).

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SISVAR (Ferreira, 2019). Inicialmente foi avaliado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo realizada a transformação dos dados para raiz  $x+0,5$  quando pertinente para distribuição normal. Em seguida realizou-se a análise de variância (ANOVA), com teste Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Isolamento e identificação de *Trichoderma*

A partir da metodologia utilizada para obtenção de *Trichoderma* da área de mata foi possível observar o crescimento e realizar o isolamento de três isolados distintos de *Trichoderma*, com base em características de crescimento, esporulação e coloração. A partir da análise genética da região ITS dos isolados foi confirmada a identificação a nível de gênero, mas não foi possível definir a espécie para os três isolados. Na Tabela 1 são mencionadas possíveis espécies respectivas a cada isolado. Isso se deve possivelmente às espécies dos isolados apresentarem características muito próximas nas regiões estudadas do genoma, sendo necessário ampliar o sequenciamento para permitir um resultado mais conclusivo a nível de espécie. Uma das espécies mais conhecidas e utilizadas é *T. harzianum* (Portolan et al., 2020; Jantsch et al., 2023), no entanto outras espécies também podem ser eficientes (Li et al., 2025), reforçando a importância de avançar em estudos com agentes desse gênero.

Tabela 1 - Identificação de possíveis espécies de *Trichoderma* dos isolados obtidos com base em marcadores moleculares da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2).

Isolado	Espécie
TH1	<i>T. koningiopsis</i> , <i>T. sulphureum</i> , <i>T. atroviride</i> , <i>T. dorotheopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. dorotheae</i> , <i>T. gamsii</i> , <i>T. ghanense</i> , <i>T. harzianum</i> ou <i>T. petersenii</i>
TH2	<i>T. harzianum</i> , <i>T. lentiforme</i> , <i>T. azevedoi</i> , <i>T. lixii</i> , <i>T. pollinicola</i> , <i>T. atrobrunneum</i> ou <i>T. austroindianum</i>
TH3	<i>T. sulphureum</i> , <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. atroviride</i> , <i>T. dorotheopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. dorotheae</i> , <i>T. gamsii</i> , <i>T. ghanense</i> , <i>T. harzianum</i> ou <i>T. petersenii</i>

### Taxa de crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*

Os isolados de *Trichoderma* apresentaram crescimento micelial e taxa de crescimento significativamente maiores do que *S. sclerotiorum* em meio de cultura BDA (Tabela 2). O crescimento micelial dos isolados foi superior tanto no tempo de

24 como de 48 horas. Os diferentes isolados apresentaram crescimento e taxa de crescimento semelhantes entre si, embora no tempo de 24 horas tenha se destacado o isolado TH3, com crescimento superior a TH2 (além de *S. sclerotiorum*). Na taxa de crescimento, embora não houve diferença entre os isolados, chegou a 52,9% superior a *S. sclerotiorum*, pelo isolado TH3.

Tabela 2 - Crescimento micelial e taxa de crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA.

Tratamentos	Crescimento micelial (cm)		Taxa de crescimento (mm/h)
	24 horas	48 horas	
<i>S. sclerotiorum</i>	0,03 a	4,26 a	0,17 a
TH1	1,29 bc	7,07 b	0,24 b
TH2	1,07 b	6,36 b	0,22 b
TH3	1,54 c	7,87 b	0,26 b
CV%	4,47	6,02	2,12

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados comprovam o rápido e vigoroso crescimento dos isolados de *Trichoderma*, se destacando já nas primeiras horas de crescimento, fato que já é relatado em outros trabalhos que constataram a potencialidade do antagonista quando submetido a situações que exigem disputa por espaço e nutrientes, demonstrando que um dos mecanismos do fungo é a competição (Abdullah; Ali e Suleman, 2008).

Entretanto, deve-se considerar que os isolados de *Trichoderma* utilizados no experimento eram nativos da região de Laranjeiras do Sul/PR, obtidos a partir de um método de cultivo bastante conhecido e recomendado para captura do fungo, o que corrobora com a sugestão de Brito et al. (2010) indicando que isolados armazenados por longos períodos de tempo podem perder a eficiência quando comparados com fungos obtidos de compostos orgânicos cultivados recentemente.

Neste sentido, é importante realizar o procedimento adequado para captura do fungo, priorizando coletar espécies adaptadas a região onde seu uso será empregado, tendo em vista a adaptação ao ambiente e eficácia do antagonista no controle de fitopatógenos (Lopes et al., 2012).

### Avaliação do pareamento direto de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*

Em relação ao pareamento direto foi possível observar que houve significativa inibição de *S. sclerotiorum* pelos isolados de *Trichoderma* (Tabela 3). Houve diferenças significativas entre os tratamentos para o crescimento micelial após 48 horas, bem como para a formação de escleródios após 14 dias e 23 dias (Tabela 3). Após 48 horas do pareamento, os isolados ainda não tinham promovido inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*, quando ainda não havia o contato

entre as hifas dos fungos, embora o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* no pareamento com TH3 foi inferior ao crescimento frente TH1,

demonstrando uma ação diferencial entre os isolados.

Tabela 3 - Pareamento direto de isolados de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA

Tratamentos	Crescimento 48 horas	Nota pareamento	Escleródios 14 dias	Escleródios 23 dias
Testemunha	2,64 ab	5,0 b	35,0 b	40,2 b
TH1	3,00 b	2,0 a	2,4 a	2,6 a
TH2	2,14 ab	3,2 a	0,0 a	0,0 a
TH3	1,58 a	2,0 a	1,2 a	2,2 a
CV%	13,71	11,35	35,08	31,38

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em relação a nota de pareamento obtida através da escala de Bell et al. (1982), não houve diferença significativa entre TH1, TH2 e TH3, entretanto, houve significativa diferença entre a testemunha (sem *Trichoderma*) e os tratamentos com isolados de *Trichoderma*, mostrando que o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi significativamente inibido quando na presença dos isolados TH1, TH2 e TH3. Destaque para os isolados TH1 e TH3 que apresentaram nota média de 2,0. Os resultados atestam que as cepas de *Trichoderma* são capazes de inibir o crescimento de *S. sclerotiorum*. A formação de escleródios de *S. sclerotiorum* foi inibida quando na presença TH1, TH2 e TH3, não havendo diferenças significativas entre TH1, TH2 e TH3, demonstrando ação semelhante entre os isolados, tanto aos 14 como aos 23 dias de crescimento.

É importante ressaltar que o isolado TH2 apresentou inibição total na formação de escleródios após 14 e 23 dias. Os isolados TH1 e TH3 aos 23 dias de cultivo promoveram inibição de 93,5 e 94,5% em relação a testemunha, respectivamente. Como os escleródios são estruturas de resistência que podem sobreviver por vários anos no solo, são muito importantes como fonte de inóculo do patógeno (Krause e Sakate, 2016) e a ação de *Trichoderma* inibindo a formação dessas estruturas indica outro mecanismo importante dos isolados obtidos no controle desse patógeno.

De acordo com Cubilla-Rios et al. (2019) o *Trichoderma* é um fungo inibidor potente, que através de estratégias como por exemplo a antibiose, promove a liberação de moléculas com alto e baixo peso molecular, acionando assim seu mecanismo antifúngico e impedindo o desenvolvimento do patógeno. O teste do pareamento direto é um dos comumente utilizados na avaliação da atividade antagonista de agentes de

controle biológico de fungos. No entanto, o efeito antagonista pode variar muito conforme a espécie e isolado de *Trichoderma*, ou mesmo nem apresentar efeito antagonista (Chagas Junior et al., 2018). O trabalho apresentou resultados positivos no pareamento direto, demonstrando ação antagonista. Ethur (2006) reforça que notas que abaixo de 2,5 (como as observadas por TH1 e TH3) indica antagonista eficiente, com capacidade para controle de doenças. Também outros fatores do ambiente podem influenciar o resultado do pareamento, como a temperatura. Fipke et al. (2015) relatam maior ação antagonista de *Trichoderma* na faixa de 22 a 30 °C.

#### **Avaliação de exsudatos de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum***

No experimento realizado com os exsudatos do crescimento de *Trichoderma* não houve solidificação completa do meio de cultura BDA após a adição do ágar, mesmo aumentando a concentração de ágar, o que comprometeu as avaliações do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* não sendo possível a obtenção de resultados do efeito sobre o patógeno. Isso possivelmente se deve a acidificação do meio de cultura promovido pelo crescimento dos isolados de *Trichoderma*. Após o crescimento do *Trichoderma* no meio líquido BD o pH foi aferido e estava em torno de 3,5 para os diferentes isolados, enquanto que o pH no meio sem crescimento de *Trichoderma* estava em torno de 6,0. Tem sido relatado que alguns isolados de *Trichoderma* podem liberar ácidos orgânicos, o que pode levar a acidificação do meio, e assim contribuir para a solubilização de alguns nutrientes (Machado et al., 2012) Ácidos liberados por *Trichoderma* também podem estar entre compostos ativos de efeito antagonista, como ácido palmítico e ácido acético encontrados em *T. viride* e *T. harzianum*,

respectivamente (Yassin et al., 2021). No entanto, para alguns isolados de *Trichoderma* já foi demonstrado que exsudatos promoveram efeito antifúngico pela liberação de compostos ativos no meio de cultivo (Malik et al., 2024). Esses resultados demonstram que outros fatores, como a alteração do pH, pode afetar os resultados, mas que muitas vezes não são averiguados nos experimentos.

#### Avaliação de compostos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

No experimento para avaliação de possíveis compostos voláteis de *Trichoderma*, onde os

isolados não entram em contato direto com o patógeno, observou-se inibição significativa de *S. sclerotiorum* na presença dos isolados de *Trichoderma* (Tabela 4). Esse efeito foi observado tanto nos tempos 24 e 48 horas de incubação, com exceção para o isolado TH2 que no tempo de 48 horas não diferiu da testemunha. Os isolados também promoveram inibição total na formação de escleródios de *S. sclerotiorum*. Isso atesta que os compostos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* foram capazes de inibir efetivamente o crescimento de *S. sclerotiorum* bem como a formação de estruturas de sobrevivência.

Tabela 4 - Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA em presença de compostos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	24 horas	48 horas	Escleródios formados
Testemunha	0,20 b	6,15 b	9,75 b
TH1	0,06 a	3,69 a	0,00 a
TH2	0,05 a	4,30 ab	0,00 a
TH3	0,02 a	2,98 a	0,00 a
CV%	4,48	10,68	77,74

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados demonstram que espécies de *Trichoderma* oriundas de áreas nativas apresentam expressivo efeito nas atividades de inibição de fitopatógenos em meio de cultura por meio de compostos voláteis. Considerando esses resultados juntamente com os demais pode-se observar que esses isolados podem atuar poder diferentes mecanismos de ação. Alguns trabalhos já tem relatado que determinadas espécies do fungo *Trichoderma* podem produzir metabólitos voláteis com atividade sobre fitopatógenos (Lopes et al., 2012). Além da ação sobre fitopatógenos, compostos orgânicos voláteis de determinadas espécies de *Trichoderma* também podem desempenhar diferentes funções na planta, como

promotor de crescimento, na modulação de raízes e na indução de mecanismos de defesa (Jiménez-Bremont et al., 2024).

#### Avaliação do controle *in vivo* de *Sclerotinia sclerotiorum* com isolados de *Trichoderma* spp.

No experimento em plantas de alface os resultados mais expressivos foram obtidos com aplicação na parte aérea, onde a aplicação com suspensão de esporos para os três isolados promoveu significativa redução tanto na severidade da doença como na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Tabela 5).

Tabela 5 - Severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do mofo branco em plantas de alface tratadas com isolados de *Trichoderma* e inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*

Tratamentos	Aplicação			
	Parte Aérea		Solo	
	Severidade*	AACPD	Severidade* <sup>ns</sup>	AACPD
Testemunha	3,4 b	31,0 c	1,0	14,6 b
TH1	1,4 a	18,8 b	1,8	17,8 b
TH2	1,0 a	15,4 ab	0,0	0,0 a
TH3	0,2 a	8,1 a	1,4	15,4 b
CV%	23,73	16,44	43,57	46,0

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Severidade sete dias após a inoculação. ns: não significativo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ressalta-se que os valores apresentados da severidade se referem a avaliação após sete dias dos tratamentos, enquanto que a AACPD considera toda epidemia da doença com as avaliações realizadas dos sete aos 12 dias após inoculação. Na aplicação via solo foi observada redução significativa apenas pelo isolado TH2 na AACPD. Na aplicação de parte aérea o isolado TH3 promoveu inibição de 94,1% na severidade, aos sete dias após a inoculação, e de 73,9% na AACPD. Na aplicação no solo destacou-se o isolado TH2, no qual as plantas tratadas não apresentaram sintomas. Possivelmente o efeito sobre o patógeno *in vivo* tem relação com os mecanismos da ação observados *in vitro* para os isolados.

O fungo *Trichoderma* tem se destacado em estudos de controle biológico como um dos principais agentes para controle de fitopatógenos (Portolan et al., 2020). Tem sido demonstrado que algumas espécies de *Trichoderma* apresentam eficiência comprovada no controle do mofo-branco, tanto no cultivo *in vitro*, como em sistemas de cultivo em casas de vegetação e campo, visto que, o antagonista reduz significativamente o crescimento micelial do patógeno, bem como, a formação de escleródios (Han et al., 2023).

De acordo com Rabeendran et al. (2006), a suspensão de esporos de isolados de *Trichoderma hamatum*, *T. virens* e *T. rossicum* quando incorporada em substratos de plantio, possui capacidade para controlar *S. sclerotiorum*. Além disso, o autor destaca que as espécies *T. hamatum* e *T. virens* foram capazes de reduzir a doença em 30 e 50%, o que significa que o antagonista apresenta capacidade de controle do mofo-branco. Han et al. (2023) também destacam a importância da incorporação de matéria orgânica e de promover condições adequadas para microbiota benéfica do solo, como estratégias muito importantes no manejo de *S. sclerotiorum*.

Os avanços nos conhecimentos sobre microbiota têm demonstrado cada vez mais a importância da diversidade e de determinados grupos de microrganismos em diferentes ambientes, incluindo sistemas agrícolas. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que os isolados de *Trichoderma* avaliados têm potencial para serem utilizados no controle biológico do mofo branco em plantas de alface, e possivelmente também em outras culturas devido ao significativo efeito sobre *S. sclerotiorum*. Também demonstram a importância de avançar em estudos nesse sentido de forma a permitir maior compreensão de mecanismos envolvidos e formas de utilização.

## CONCLUSÕES

Foi possível obter isolados nativos de *Trichoderma* que apresentaram inibição sobre o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto por ação direta sobre o patógeno como através de compostos voláteis e na inibição da formação de escleródios. Também apresentaram efeito protetor em plantas de alface ao mofo branco, principalmente em aplicação na parte aérea.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, pelo auxílio financeiro através do projeto PES-2022-0456.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, M.T.; Ali, N.Y.; Suleman, P. Biological control of *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection, Oxford, v. 27, p. 1354-1359, 2008.
- Agrios, G.N. Plant Pathology. New York: Academic Press. 2005. 922p.
- Bell, D. K.; Wells, H. D.; Markham, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, v.72, p.379-382, 1982.
- Bernardo, J. T.; Aguilera, J.G.; Silva, R.B.; Vian, R.; Niella, G.R.; Ulhoa, C.J.; Medeiros, I.R.E. Isolamento on farm de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. Revista Eletrônica Científica da UERGS, v. 5, n. 03, p. 263-270, 2019.
- Brito, F. S.; Miller, P. R. M.; Stadnik, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. Revista Brasileira de Agroecologia, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2010.
- Campbell, C. L.; Madden, L. V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532p.
- Chagas Junior, A.F.C.; Chagas, L.F.B.; Santos, G.R.; Martins, A.L.L.; Carvalho Filho, M.R.; Miller, L.O. Ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Agri-environmental sciences, v. 4, n. 2, p. 9-15, 2018.
- Cubilla-Ríos, A.A.; Mendoza, D.D.R.D.; Romero-Rodríguez, M.C.; Flores-Giubi, M.E.; Barúa-Chamorro, J.E. Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. Agronomía Mesoamericana, v. 30, n. 1, p.63-77, 2019. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>.
- Ethur, L. Z. Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- Ferreira, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. Revista Brasileira de Biometria, v.37, n.1, p.529-535, 2019. DOI: .

- Fipke, G.M.; De Bastos Pazini, J.; Ethur, L. Z. Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. ao *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes temperaturas. *Magistra*, v. 27, n. 1, p. 23-32, 2015.
- Han, V.C.; Michael, P.J.; Swift, B.; Bennett, S.J. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*: Modes of action of biocontrol agents, soil organic amendments, and soil microbiome manipulation. *Biological Control*, v.186(April), 105346, 2023.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105346>.
- Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum*T-22. *Plant Disease*, 84, 4: 376–393, 2000.
- Isaias, C.O.; Martins, I.; Silva, J.B.T.; Silva, J.P.; Mello, S.C.M. Ação antagonística e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.
- Jantsch, F.T.; Silva, V.N.; Mello, E.S.; Preor, A.V. Efeito de diferentes formas de aplicação de *Trichoderma* na produção de mudas de beterraba. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v.11, n.1, p.135-141, 2023.  
<https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v11n4.16981>
- Jiménez-Bremont, J.F.; González-Pérez, E.; Ortega-Amaro, M.A.; Madrigal-Ortiz, S.; Duque-Ortiz, A.; Mendoza-Mendoza, A. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma*: Small molecules with biotechnological potential. *Scientia Horticulturae*, v. 325, n.November, 2024.
- Krause-Sakate, R; Pavan, M.A.; Moura, M.F.; Kurozawa, C. Doenças da alface. In: Amorim, L. (Eds.). *Manual de Fito patologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Ceres, 2016. v. 2, p. 33-39.
- Li, X.; Liao, Q.; Zeng, S.; Wang, Y.; Liu, J. The use of *Trichoderma* species for the biocontrol of postharvest fungal decay in fruits and vegetables: Challenges and opportunities. *Postharvest Biology and Technology*, v.219, 113236, 2025.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.113236>
- Lilly, G.V.; Barnett, H. L. *Physiology of the fungi*. New York: McGraw-Hill Book, 1951. 464 p. 1951.
- Lopes, F.A.C.; Steindorf, A.F.; Geraldine, A.M.; Brandão, R.S.; Monteiro, V.N.; Lobo Júnior, M.; Coelho, A.S.G.; Ulhoa, C.J.; Silva, R.N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology, Oxford*, v. 116, n. 7, p. 815-824, 2012.
- 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*, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- Malik, M.A.; Ahmad, N.; Bhat, M.Y. 2024. The green shield: *Trichoderma*'s role in sustainable agriculture against soil-borne fungal threats. *Current Research in Microbial Sciences*, v.7, n.(November), 2024.  
<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100313>.
- Portolan, I.B., Pietrobelli, S.R., Moura, G.S., Fernandes, A.P., Bonome, L.T.S., Franzener, F. Action of *Trichoderma* 1306 in the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato crops. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.87, e0472019, p.1-7. 2020. .
- Rabeendran, N.; Jones, E. E.; Moot, D. J.; Stewart, A. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minutans* and *Trichoderma hamatum*. *Biological Control*, v. 39, n. 3, p. 352-362, 2006.
- Yassin, M.T.; Mostafa, A.A.F.; Al-Askar, A.A.; Sayed, S.R.M.; Rady, A.M. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* strains against some fusarial pathogens causing stalk rot disease of maize, in vitro. *Journal of King Saud University - Science*, v.33, n.3, 101363, 2021. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101363>