



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA**



**JULIANA VIANA BARBOSA DE SOUZA**

**POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Trichoderma* DO BIOMA AMAZÔNICO CONTRA  
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE HORTALIÇAS EM CONDIÇÕES *IN VITRO***

**MANAUS**

**2023**

JULIANA VIANA BARBOSA DE SOUZA

**POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Trichoderma* DO BIOMA AMAZÔNICO CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE HORTALIÇAS EM CONDIÇÕES *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologias para a área agroflorestal.

Orientador: Dr. José Odair Pereira

Coorientador: Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

MANAUS

2023

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729p Souza, Juliana Viana Barbosa de  
Potencial antagonico de Trichoderma do bioma amazônico contra fungos fitopatogênicos de hortaliças em condições in vitro / Juliana Viana Barbosa de Souza. 2023  
68 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Odair Pereira  
Coorientador: Pedro de Queiroz Costa Neto  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Biocontrole. 2. Antagonismo. 3. Antracnose. 4. Alternariose. I. Pereira, José Odair. II. Universidade Federal do Amazonas III.  
Título

JULIANA VIANA BARBOSA DE SOUZA

**POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Trichoderma* DO BIOMA AMAZÔNICO CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE HORTALIÇAS EM CONDIÇÕES *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologias para a área agroflorestal.

Aprovado em 10 de outubro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Odair Pereira – Presidente/Orientador  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Dantas Gonzaga de Freitas – Membro  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Christien de Figueiredo Rondon – Membro  
Escola Superior Batista do Amazonas

Aos meus Pais Adotivos,

Esther e Zuilo Viana (*in memoriam*) pelos seus ensinamentos e todo o amor que em vida me deram, vivem dentro do meu coração e fizeram de mim a pessoa que sou hoje.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade de viver uma vida repleta de eventos extraordinários e alinhados com os propósitos eternos.

Às minhas filhas, Thaysa e Esther, que sempre me incentivaram a dar o próximo passo na minha caminhada acadêmica.

Ao meu esposo e amigo, Isaac Carneiro de Souza, pela paciência e sabedoria, não me deixando desanimar e nem desistir dessa jornada tornando as coisas mais simples. Dedico a você essa vitória!

Ao meu Orientador, Prof. Dr. José Odair Pereira. Obrigada pela confiança e por aceitar-me como orientanda.

Ao meu Coorientador e amigo, Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, que tão prontamente abriu as portas do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana - LPBOM, sob sua responsabilidade para me receber, e incentivar-me, e apoiar-me sempre que precisei. Não há como descrever a gratidão que sinto por sua dedicação e amizade.

Ao meu amigo, Kelven Wladie dos Santos Almeida Coelho, a minha imensurável gratidão, pela valiosa colaboração, paciência, disponibilidade e companheirismo em todos os momentos dessa trajetória.

Aos amigos, Ingrid e Leandro, do LPBOM, pela amizade, parceria, conhecimentos trocados e principalmente pelas risadas que tornaram a caminhada mais leve.

A todos os meus amigos e familiares, que me acompanharam, oraram e que torcem por mim. Em especial, Joiceneire Viana, Pr. Fred Junior, Pra. Michele Monteiro, Haroldo Souza, Kelly Paixão, Inaeli Paixão e Rebeca Pinheiro.

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC/UFAM e a todos os professores, que foram essenciais para a minha formação. Muito obrigada!

Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre! Amém!

Romanos 11:36 - NVI

"Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

(Cora Coralina)

## RESUMO

O controle biológico vem ganhando mais espaço a cada dia, passando a integrar os manejos de diversas cultivares, agrícolas e florestais, por todo o mundo. A produção agrícola no estado do Amazonas vem se desenvolvendo gradativamente com o passar dos anos, principalmente pela ajuda de pequenos produtores que contribuem com uma fatia significativa da produção. Um dos fatores mais desanimadores é a ocorrência de doenças nas plantas, principalmente as causadas por fungos. Um dos agentes de biocontrole de fitopatógenos mais aplicados em pesquisas no mundo são fungos do gênero *Trichoderma*, sendo largamente utilizados na agricultura, e têm exercido papel determinante na mudança do cenário de controle biológico de fitopatógenos no Brasil. Este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial de sete linhagens de *Trichoderma sp.* para controle biológico de fitopatógenos de hortaliças. Foram avaliadas as linhagens *Trichoderma aureoviride* P5B (T1), *T. brevicompactum* P16D2 (T2), *T. ceraceum* P7D (T3), *T. harzianum* P14A (T4), *T. inhamatum* P21C (T5), *T. reesei* P27B2.3 (T6) e *T. tomentosum* P14C2 (T7). O estudo foi realizado a partir da reativação dos fungos preservados pelo método Castellani e submetidos ao teste de cultura pareada, metabólitos não voláteis e termoestabilidade do extrato bruto. Para o antagonismo pela técnica de cultura pareada, os antagonistas T1, T4, T6 e T7 foram eficientes contra *Colletotrichum theobromicola*, com taxas de inibição acima de 50%. No ensaio contra *Alternaria japonica*, apenas T7 se destacou, com taxa de inibição de 64,76%. Em relação à escala de Bell, os valores obtidos variaram entre 1 e 2, confirmando que todas as linhagens apresentaram potencial para uso no biocontrole destes fitopatógenos. Para os testes de antagonismo de metabólitos não voláteis, apenas a linhagem T2 foi eficiente contra os fitopatógenos, promovendo taxas de inibição de crescimento micelial em relação à testemunha acima de 60%. No ensaio de termoestabilidade, apenas a linhagem T2 apresentou atividade, também com taxas de inibição acima de 60% contra os fitopatógenos testados. Este estudo permite concluir que todas as linhagens testadas possuem potencial para uso no controle biológico dos fitopatógenos confrontados, tendo a linhagem *T. brevicompactum* P16D2 se destacado nos três experimentos, necessitando de estudos mais aprofundados para determinação do uso em campo.

**Palavras-chave:** Biocontrole. Antagonismo. Antracnose. Alternariose.



## ABSTRACT

Biological control is gaining more space every day, becoming part of the management of various agricultural and forestry cultivars throughout the world. Agricultural production in the state of Amazonas has been developing gradually over the years, mainly with the help of small producers who contribute a significant share of production. One of the most discouraging factors is the occurrence of plant diseases, especially those caused by fungi. One of the biocontrol agents for phytopathogens most applied in research in the world are fungi of the genus *Trichoderma*, which are widely used in agriculture, and have played a determining role in changing the scenario of biological control of phytopathogens in Brazil. This study aimed to evaluate *in vitro* the potential of seven strains of *Trichoderma* sp. for biological control of vegetable phytopathogens. Were evaluating the strains *Trichoderma aureoviride* P5B (T1), *T. brevicompactum* P16D2 (T2), *T. ceraceum* P7D (T3), *T. harzianum* P14A (T4), *T. inhamatum* P21C (T5), *T. reesei* P27B2.3 (T6) and *T. tomentosum* P14C2 (T7). The study was carried from reactivation of fungi preserved by the Castellani method and subjected to paired culture testing, non-volatile metabolites and thermostability of the crude extract. For antagonism using the paired culture technique, the T1, T4, T6 and T7 antagonists were efficient against *Colletotrichum theobromicola*, with inhibition rates above 50%. In the assay against *Alternaria japonica*, only T7 stood out, with an inhibition rate of 64.76%. In relation to the Bell scale, the values obtained varied between 1 and 2, confirming that all strains showed potential for use in the biocontrol of these phytopathogens. For the antagonism tests of non-volatile metabolites, only the T2 lineage was efficient against phytopathogens, promoting mycelial growth inhibition rates in relation to the control above 60%. In the thermostability test, only the T2 lineage showed activity, also with inhibition rates above 60% against the phytopathogens tested. This study allows us to conclude that all strains tested have potential for use in the biological control of the phytopathogens confronted, with the *T. brevicompactum* P16D2 strain standing out in the three experiments, requiring further studies to determine its use in the field.

**Keywords:** Biocontrol. Antagonism. Anthracnose. Alternariosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Morfologia das linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. reativadas em meio BDA após sete dias. A – <i>T. aureoviride</i> P5B, B - <i>T. brevicompactum</i> P16D2, C - <i>T. ceraceum</i> P7D, D - <i>T. harzianum</i> P14A, E - <i>T. inhamatum</i> P21C, F - <i>T. reesei</i> P27B2.3, G - <i>T. tomentosum</i> P14C2.....	36
Figura 2 - Conidióforos (A, B, D, F, H, J, L), conídios (C, E, G, I, K, M) e clamidósporos (N) de <i>Trichoderma</i> spp. cultivados em meio BDA por cinco dias. <i>Trichoderma aureoviride</i> T1 (A, B, C, N); <i>T. ceraceum</i> T3 (D, E); <i>T. harzianum</i> T4 (F, G); <i>T. tomentosum</i> T7 (H, I); <i>T. brevicompactum</i> T2 (J, K); <i>T. reesei</i> T6 (L, M).....	36
Figura 3 - Crescimento e esporulação de <i>Trichoderma aureoviride</i> P5B (T1) durante cinco dias.....	38
Figura 4 - Crescimento e esporulação de <i>Trichoderma brevicompactum</i> P16D2 (T2) durante cinco dias .....	38
Figura 5 - Crescimento e esporulação de <i>Trichoderma ceraceum</i> P7D (T3) durante cinco dias.....	39
Figura 6 - Crescimento e esporulação de <i>Trichoderma harzianum</i> P14A (T4) durante cinco dias.....	39
Figura 7 - Crescimento e esporulação de <i>Trichoderma inhamatum</i> P21C (T5) durante cinco dias.....	40
Figura 8 - Crescimento e esporulação de <i>Trichoderma reesei</i> P27B2.3 (T6) durante cinco dias.....	40
Figura 9 - Crescimento e esporulação de <i>Trichoderma tomentosum</i> P14C2 (T7) durante cinco dias .....	41
Figura 10 - Atividade enzimática qualitativa de <i>Trichoderma</i> spp. ....	44
Figura 11 - Sintomas iniciais de infecção por <i>Alternaria japonica</i> em folhas de couve. A) Controle negativo feito com água destilada, B) e C) lesões causadas pelo fitopatógeno nas folhas .....	45
Figura 12 - Lesões causadas por <i>Alternaria japonica</i> em folhas de couve após dez dias. A) Controle negativo feito com água destilada, B) Lesões causadas pelo fitopatógeno, C) Fitopatógeno recuperado em meio BDA a partir das lesões nas folhas .....	46
Figura 13 - Atividade antagonista de <i>Trichoderma</i> spp. pela técnica da cultura pareada contra <i>Colletotrichum theobromicola</i> .....	47

Figura 14 - Atividade antagonista de <i>Trichoderma</i> spp. pela técnica da cultura pareada contra <i>Alternaria japonica</i> .....	48
Figura 15 - Atividade antagonista dos metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Colletotrichum theobromicola</i> .....	50
Figura 16 - Atividade antagonista dos metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Alternaria japonica</i> .....	50
Figura 17 - Atividade antagonista dos metabólitos não voláteis termoestáveis de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Colletotrichum theobromicola</i> .....	52
Figura 18 - Atividade antagonista dos metabólitos não voláteis termoestáveis de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Alternaria japonica</i> .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. utilizadas neste estudo .....	29
Tabela 2 - Crescimento micelial médio (em mm) e índice de crescimento micelial (IVCM) em mm por dia de linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. cultivadas em meio AFA durante cinco dias .....	41
Tabela 3 - Crescimento micelial médio (em mm) e índice de crescimento micelial (IVCM) em mm por dia de linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. cultivadas em meio BDA durante cinco dias .....	42
Tabela 4 - Crescimento micelial médio (em mm) e índice de crescimento micelial (IVCM) em mm por dia de linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. cultivadas em meio AFM durante cinco dias .....	42
Tabela 5 - Concentração de esporos por mL de linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. cultivados em diferentes meios de cultura durante cinco dias .....	43
Tabela 6 - Atividade enzimática qualitativa de linhagens de <i>Trichoderma</i> spp.....	44
Tabela 7 - Percentual (%) de inibição (média $\pm$ desvio padrão) de crescimento micelial de fitopatógenos de cebolinha e couve frente a <i>Trichoderma</i> spp. através da técnica da cultura pareada .....	48
Tabela 8 – Percentual (%) de inibição (média $\pm$ desvio padrão) de crescimento micelial de fitopatógenos de cebolinha e couve frente a <i>Trichoderma</i> spp. através da técnica de metabólitos não voláteis.....	51
Tabela 9 – Percentual (%) de inibição (média $\pm$ desvio padrão) de crescimento micelial de fitopatógenos de cebolinha e couve frente a <i>Trichoderma</i> spp. através da técnica de metabólitos não voláteis termoestáveis .....	53

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2.1. Produção agrícola no Brasil</b> .....	17
<b>2.2. Produção agrícola no Amazonas</b> .....	18
2.3.1. A cultura da cebolinha verde.....	20
2.3.2. A cultura de couve-tronchuda .....	21
<b>2.4. Fungos fitopatogênicos</b> .....	22
2.4.1. O gênero <i>Colletotrichum</i> .....	22
2.4.1.1. <i>Colletotrichum theobromicola</i> Delacroix .....	22
2.4.2. O gênero <i>Alternaria</i> .....	23
2.4.2.1. <i>Alternaria japonica</i> Yoshii.....	24
<b>2.5. Controle biológico</b> .....	24
2.5.1. Microrganismos no controle biológico de fitopatógenos.....	25
2.5.2. O gênero <i>Trichoderma</i> e seu papel no biocontrole de fitopatógenos.....	26
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	28
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>4.1. Origem das linhagens de <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	29
<b>4.2. Reativação das linhagens e confirmação da pureza</b> .....	29
<b>4.3. Avaliação do crescimento micelial e esporulação</b> .....	30
<b>4.4. Avaliação da atividade enzimática</b> .....	31
<b>4.5. Teste de patogenicidade dos fitopatógenos</b> .....	32
<b>4.6. Ensaio de antagonismo</b> .....	32
4.6.1. Antagonismo por cultura pareada .....	33
4.6.2. Antagonismo por metabólitos não voláteis .....	34
4.6.3. Antagonismo por metabólitos não voláteis termoestáveis.....	34
<b>4.7. Análise estatística</b> .....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>5.1. Viabilidade e pureza das linhagens de <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	36
<b>5.2. Crescimento e esporulação de <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	37
<b>5.3. Atividade enzimática de <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	43
<b>5.4. Teste de patogenicidade dos fitopatógenos</b> .....	45
<b>5.5. Ensaio de antagonismo</b> .....	46

5.5.1. Confronto direto pela técnica da cultura pareada .....	46
5.5.2. Antagonismo por metabólitos não voláteis .....	49
5.5.3. Antagonismo por metabólitos não voláteis termoestáveis.....	51
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O controle biológico vem ganhando mais espaço a cada dia, passando a integrar os manejos de diversas cultivares, agrícolas e florestais, por todo o mundo. O reconhecimento dos produtores quanto à melhoria da qualidade dos seus produtos e o aumento da disponibilidade de recursos de controle biológico são uns dos aspectos fundamentais para esta evolução (De Medeiros; Silva; Pascholati, 2018). Empresas especializadas em produtos biológicos e também as de agroquímicos para aplicações fitossanitárias têm investido cada vez mais em formulações biológicas no controle de pragas e doenças de plantas (Monte; Bettioli; Hermosa, 2019).

A venda de produtos como os fungicidas, por exemplo, apresenta no Brasil um crescimento contínuo, o que mostra a necessidade de combate a doenças causadas especialmente por fungos fitopatogênicos (Morandi; Bettioli, 2009). Algumas práticas agrícolas menos prejudiciais ao meio ambiente vêm sendo mais empregadas (Araújo Neto et al., 2010). Para mitigar estes efeitos negativos de doenças em plantas têm-se utilizado o controle biológico, principalmente pelos efeitos sustentáveis relacionados ao uso (Brito, 2019). Os fungos estão entre os mais importantes agentes causais de doenças em plantas (Pascholati et al., 2019).

Entre os principais fitopatógenos que causam doenças e limitam a produção de hortaliças, destacam-se *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp., *Botrytis* sp., *Botryosphaeria* sp., *Diplodia* sp., *Monilinia* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Sclerotinia* sp. Esses fitopatógenos possuem considerável potencial destrutivo podendo limitar a produtividade e a qualidade da produção (Carvalho, 2010; Maringoni; Silva Júnior, 2016; Driscoll, 2020).

O gênero *Trichoderma* habita diversas regiões, desde tropicais até temperadas. Possui alta capacidade reprodutiva, sendo capaz de degradar nutrientes com facilidade e potencializar a absorção dos mesmos pelas raízes das plantas, além de apresentar importância no biocontrole de fungos patogênicos (Amorim et al., 2016). Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* além de serem reconhecidamente biofungicidas, também podem ser classificados como biofertilizantes, bioestimulantes e potencializadores da resistência contra estresses bióticos e abióticos (De Medeiros et al., 2019).

Esses fungos são reconhecidos por seus importantes benefícios para a agricultura, como a capacidade de proteger as culturas contra doenças e aumentar o

rendimento das culturas em condições de campo (Harman et al., 2004). Desta forma, *Trichoderma* spp. é um agente de biocontrole versátil e com potencial para o desenvolvimento de produtos biológicos (Nieto-Jacobo et al., 2017).

O principal interesse econômico nesse microrganismo está no potencial de seus metabólitos secundários, que podem ser utilizados para o biocontrole de fitopatógenos, como produtor de enzimas que atuam como promotor de crescimento de plantas (Kashyap et al., 2017). Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antagônico de *Trichoderma* spp. do bioma Amazônico contra fungos fitopatogênicos de hortaliças.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção agrícola no Brasil

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo. A rica biodiversidade brasileira é fonte de recursos para o País, não apenas pelos serviços ecossistêmicos providos, mas também pelas oportunidades que representam sua conservação, uso sustentável e patrimônio genético (BRASIL, 2020).

O agronegócio tem sido reconhecido como um vetor crucial do crescimento econômico brasileiro. Em 2020, a soma de bens e serviços gerados no agronegócio chegou a R\$ 1,98 trilhão ou 27% do PIB brasileiro. Dentre os segmentos, a maior parcela é do ramo agrícola, que corresponde a 70% desse valor (R\$ 1,38 trilhão) (CNA, 2021).

A produção agrícola em 2021, cresceu 11,2% em relação ao último ano, alcançando R\$ 792,0 bilhões (CNA, 2022). A estimativa do primeiro trimestre de 2022 para a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas alcançou 258,9 milhões de toneladas, 2,3% maior que a obtida em 2021 (253,2 milhões de toneladas), correspondendo a um crescimento de 5,7 milhões de toneladas (IBGE, 2022).

Ainda de acordo com levantamentos da Conafer (2021), na outra ponta, temos uma produção de hortaliças que é altamente diversificada e segmentada, com destaque para seis espécies: batata, tomate, melancia, alface, cebola e cenoura. A produção de hortaliças além da diversificação, tem garantia maior de comercialização e consumo em diferentes regiões do País, com destaque para alface, batata, cebola, cenoura e tomate.

Na produção de hortaliças a maior concentração de cultivo é na região metropolitana de Manaus, destacando-se os municípios de Careiro da Várzea, Iranduba, Manaus, Manacapuru e Presidente Figueiredo. As culturas desse grupo com maior expressão econômica são cebolinha (4.276 beneficiários/444,95 ha), coentro (4.588 beneficiários/399,54 ha), macaxeira (6.946 beneficiários/4.458,28 ha) e melancia (4.366 beneficiários/2.980,92 ha) (IDAM,2020).

Apesar da notável produção de frutas e hortaliças no Brasil, o país enfrenta sérias perdas devido à incidência de pragas e doenças relacionadas às mudanças introduzidas na agricultura. A expansão contínua das áreas cultivadas e a intensificação das práticas agrícolas têm levado a um uso cada vez mais intenso de

defensivos agrícolas. Como resultado, o Brasil ocupa a posição de liderança no *ranking* mundial de consumo de agrotóxicos (Lara et al., 2019; FAO, 2023).

As doenças de etiologia fúngica quando não controladas adequadamente podem ser devastadoras, reduzindo drasticamente a produtividade e a qualidade da produção. Essas podem afetar folhas, pecíolos, botões florais, frutos, caules e sistema radicular, causando desfolha, queda de vigor, murchas, podridões e, em alguns casos, a morte de plantas (Töfoli; Domingues, 2018).

Dentre as doenças mais preocupantes estão aquelas de etiologia fúngica, que como consequência levam à diminuição na produção e de acordo com o grau de severidade, podem resultar até na perda total dos pomares, causando assim grandes prejuízos econômicos aos produtores (Braga Júnior et al., 2017). A produção agrícola se modernizou, mas ainda existem desafios, o mais recente enfrentado pela agricultura avançada é alcançar rendimentos mais altos de maneira ecologicamente correta. Assim, há uma necessidade imediata de encontrar soluções ecologicamente corretas, como a aplicação mais ampla de agentes de biocontrole (Waghunde et al., 2016).

## **2.2. Produção agrícola no Amazonas**

A produção agrícola no estado do Amazonas apresenta uma série de desafios e potencialidades únicas, impulsionadas pela exuberante biodiversidade da região e pela busca por uma agricultura sustentável. O Amazonas é conhecido mundialmente pela sua vasta floresta tropical e por abrigar a maior bacia hidrográfica do planeta. No entanto, a agricultura também tem espaço nesse cenário, com esforços para desenvolver uma produção agrícola que seja economicamente viável e ambientalmente responsável. Por esse motivo, o Estado possui um imensurável potencial para o desenvolvimento da bioeconomia aliada com a sustentabilidade, porém, na prática não é o que acontece, devido a existência de vários fatores que dificultam esse processo (Willerding et al., 2020).

Além disso, a produção agrícola no Amazonas é fortemente influenciada pelas práticas de agricultura familiar. Muitas comunidades regionais dependem da agricultura como principal fonte de renda, sendo responsáveis por uma produção diversificada e de pequena escala. Essa forma de agricultura tem um papel fundamental na preservação da cultura local e na manutenção da floresta, uma vez

que é geralmente realizada de maneira sustentável, integrando-se aos sistemas naturais e evitando o desmatamento indiscriminado. A produção de hortaliças no estado do Amazonas envolve agricultores familiares e produtores rurais, principalmente nos municípios da região metropolitana de Manaus (IDAM,2020).

A agricultura familiar desempenha papel crucial tanto nas economias rurais quanto na segurança alimentar global. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO (2020), mais de 90% das propriedades agrícolas no mundo são operadas por famílias, e elas são responsáveis por produzir cerca de 80% dos alimentos consumidos globalmente.

Dentre as culturas de importância econômica para a agricultura familiar no estado do Amazonas destaca-se a cebolinha verde (*Allium fistulosum* L.) e o couve-tronchuda (*Brassica oleracea* L. var. *tronchuda* Bailey). A antracnose foliar da cebolinha (*Colletotrichum* sp.) e a mancha-de-alternaria da couve-tronchuda (*Alternaria* sp.) estão entre os principais problemas desses cultivos no Estado (Vieira et al., 2019).

A tecnologia de cultivo protegido de hortaliças requer uma constante melhoria do sistema de produção, visando sempre o aumento de produtividade, manutenção da oferta e melhoria da qualidade dos produtos, redução dos custos de produção, tecnologia de menor impacto ambiental, redução do consumo de energia, água e defensivos agrícolas (Vidal et al., 2016).

### **2.3. Hortaliças**

As hortaliças são uma parte importante da alimentação humana, pois são ricas em vitaminas, minerais e fibras, além de possuírem baixo teor calórico. São plantas cultivadas facilmente, o que pode ser feito em pequenas propriedades, constituindo-se em uma fonte alternativa de renda para pequenos produtores, já que apresenta grande rentabilidade por área cultivada, o que é um fator relevante em localidades onde os tamanhos das propriedades estão cada vez menores (Brainer, 2019).

Conforme a definição da FAO (2012):

Hortaliças são plantas anuais, bianuais ou perenes cultivadas em hortas ou em campo aberto ou sob cultivo protegido e que são utilizadas quase exclusivamente como

alimento; se inclui nesse grupo, plantas classificadas como cereais ou da família das leguminosas (grãos e/ou vagens), cujos produtos são colhidos verdes (tenros ou imaturos); também se inclui nesse grupo os melões e melancias por seu comportamento hortícola no cultivo e por serem culturas temporais como as demais hortaliças. Algumas hortaliças são utilizadas unicamente como tempero ou condimento devido ao seu aroma e sabor.

A produção de hortaliças está inserida entre as atividades agrícolas mais importantes do Brasil, e é provável que não seja diferente no mundo todo relaciona-se diretamente ao “abastecimento das necessidades alimentares diárias da população”, e, dada a dimensão continental do País, “alternativas de cultivo envolvem centenas de espécies e variedades, que asseguram sabor, cor, aroma e nutrição na mesa” (Carvalho; Kist, 2016, p. 6).

### 2.3.1. A cultura da cebolinha verde

Dentre as espécies de hortaliças folhosas, a cebolinha, também conhecida como cebola chinesa, cebolinha verde, cebolinho, pertence à família Alliaceae, composta por cerca de 300 gêneros e mais de 3.000 espécies distribuídas de maneira cosmopolita em todo o mundo (Maestrovirtuale, 2022). A cebolinha verde é uma planta herbácea perene, possui folhas verde-escuras, fistulosas e cilíndricas com comprimento que varia de 25 e 35 cm, suas raízes são do tipo bulbos de coloração branca, bastante rústica sendo pouco exigente em solo e clima, além disso, adapta-se a uma ampla faixa de temperaturas (Almeida, 2006; Filgueira, 2008; Agrovel, 2015).

Originária do continente Asiático, a cebolinha verde é um dos ingredientes mais utilizados para atenuar a culinária brasileira, constituindo um sabor sutil e característico, é bastante apreciada como condimento, sendo na Região Norte, comercializada com outras hortaliças, como o coentro (*Coriandrum sativum* L.) e a chicória (*Eryngium foetidum* L.), esse trio é denominado de cheiro verde, nome que pode variar dependendo da região do país, muito utilizada em larga escala na culinária como condimento, agregando aroma e sabor a variadas refeições como saladas, caldos, sopas, carnes e omelete (EMBRAPA, 2018).

É utilizada como um dos principais temperos para a elaboração de pratos à base de peixes, principalmente caldeiradas, um dos pratos mais consumidos pelos amazonenses (Clement et al., 2001; Heredia et al., 2003). No mês de novembro há um festival no Amazonas, denominado "Festival do Cheiro Verde", comandado pelas comunidades do Paraná do Limão, o evento apresenta pratos preparados com cebolinha e coentro, reunindo diversos amazonenses, que afirmam que o cheiro deste condimento combina especialmente com pratos típicos amazônicos (Kaneko, 2006).

Ademais das suas qualidades culinárias, a cebolinha verde possui propriedades nutricionais notáveis, pois representa uma fonte significativa de vitaminas A, B9 e C, juntamente com minerais como ferro, cobre e manganês. Além disso, é rico em ácido fólico, triptofano, isoleucina, leucina e lisina, conforme relatado em (Costa Júnior, 2022). A cebolinha destaca-se também com propriedades medicinais, uma vez que é rica em antioxidantes que previnem doenças causadas pelos radicais livres, problemas inflamatórios e autoimunes, regulam o sistema imunológico, além de atuarem na prevenção de alguns tipos de câncer (Leite, 2020).

### 2.3.2. A cultura de couve-tronchuda

A couve-tronchuda é uma hortaliça arbustiva, anual, herbácea, com caule vertical, que sempre emite em seu ápice novas folhas. Estas se exibem grandes, arredondadas, com superfície lisa ou onduladas, bordas não recortadas, coloração verde-clara a verde-escura, cobertas por fina camada de cera, em maior ou menor quantidade em função de variedades. Seu tamanho varia conforme as variedades ou híbridos, vigor das plantas, condições climáticas, fertilidade do solo e sanidade de plantas (Aphortesp, 2016).

A família Brassicaceae é composta por várias espécies vegetais de destaque dentro da olericultura brasileira, como brócolis (*B. oleracea* var. *italica* L.), couve-chinesa (*B. pekinnensis* L.), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis* L.), couve-tronchuda e repolho (*B. oleracea* var. *capitata* L.) (Filgueira, 2000).

É uma das principais espécies cultivadas na agricultura orgânica, por ser rico em vitamina C, A, fibras, antioxidantes e minerais como potássio, cálcio e ferro, ajudam a prevenir e tratar doenças como anemia, câncer e pressão alta (Zanin, 2023).

## 2.4. Fungos fitopatogênicos

### 2.4.1. O gênero *Colletotrichum*

*Colletotrichum* é um gênero de fungos fitopatogênicos que merece atenção especial, não só por sua importância para o agronegócio, mas também por apresentar uma grande variação morfológica, o que reflete a ampla variabilidade genética que ocorre entre e dentro das espécies deste gênero (Da Silva et al., 2020).

Apontado como um dos principais patógenos causadores de doenças em plantas, o *Colletotrichum* é um gênero de fungo polífago e cosmopolita e, dada a sua diversidade de estratégias de vida, possui alta complexidade taxonômica (Carboni, 2018). Infectando diversas culturas de importância econômica como cereais, leguminosas, plantas ornamentais, hortaliças e árvores frutíferas (Cannon et al., 2012).

O gênero *Colletotrichum* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, sub-filo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, sub-classe Hypocreomycetidae, ordem Glomerellales e família Glomerellaceae (MYCOBANK DATABASE, 2017). Possui micélio septado, conídios hialinos e unicelulares, reprodução assexuada por meio dos conídios que são produzidos apicalmente em conidióforos do tipo acérvulos e apressórios que são estruturas de infecção que possibilitam a penetração do fungo no hospedeiro (Putzke; Putzke, 2002).

#### 2.4.1.1. *Colletotrichum theobromicola* Delacroix

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são considerados entre os principais patógenos de plantas devido a sua ampla distribuição geográfica, e extensão variedade de hospedeiros e alto número de espécies fitopatogênicas. *Colletotrichum theobromicola* Delacroix pertence ao filo Ascomycota e à família Glomerellaceae da ordem Glomerellales e classe Sordariomycetes, esta espécie é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, em uma ampla gama de hospedeiros (GENBANK, 2019).

Segundo Weir et al. (2012), seu ciclo de vida inclui estágios reprodutivos assexuados e sexuais, as espécies deste gênero, *C. theobromicola* causa a doença conhecida como antracnose em diversas culturas com importância em muitos países.

A doença pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, infectando folhas, brotos, flores e frutos, e reduz até 70% da produção agrícola (Junqueira, 2014).

#### 2.4.2. O gênero *Alternaria*

O gênero *Alternaria*, hifomicetos alternarioides, compreende um grupo de fungos biologicamente, ecologicamente e morfolologicamente rico. A taxonomia desses fungos tem sido predominantemente baseada em caracteres de conídios, que incluem forma, cor, septação e padrões de esporulação secundária e, em menor grau, na associação do hospedeiro, bioquímica e metabólitos. Alguns causam sérias doenças economicamente importantes nas culturas. Ocasionalmente, *Alternaria* spp. são detectados como endófitos ou patógenos humanos e animais (Lawrence et al., 2016).

Filogeneticamente, o gênero *Alternaria* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, sub-filo Pezizomycotina, classe Dothideomycetes, sub-classe Pleosporomycetidae, ordem Pleosporales e família Pleosporaceae (MYCOBANK DATABASE, 2017). As espécies desse gênero têm sido descritas, principalmente, baseado na morfologia e/ou especificidade do hospedeiro (Woudenberg et al., 2014).

De acordo com Töfoli e Domingues (2018), esse gênero possui conídios de tamanho variável, multicelulares, ovoides ou obclavados, em várias tonalidades de marrom, com septos longitudinais e, às vezes, oblíquos. As colônias em meio de cultura são geralmente difusas, de cinza-claro a negras, podendo apresentar halos de crescimento concêntricos e tingir o meio de cultura com pigmentos amarelo-alaranjados.

Apresentam coloração palha, parda ou ouro claro, com septos transversais e poucos ou nenhum longitudinal (Töfoli; Domingues, 2018). Os conídios são inseridos em conidióforos septados, retos ou sinuosos, que ocorrem isolados ou em grupos (Töfoli et al., 2015). As populações de *Alternaria* spp. são caracterizadas por se apresentarem morfolologicamente heterogêneas, diferindo quanto à coloração do micélio, produção de pigmentos em meio de cultura, presença ou ausência de esporulação em condições de laboratório, bem como, quanto à patogenicidade e agressividade (Töfoli; Domingues, 2015).

Fungos desse gênero sobrevivem entre um cultivo e outro em restos de cultura, em solanáceas suscetíveis ou no solo na forma de micélio, esporos ou clamidósporos. Os conídios caracterizam-se por serem altamente resistentes a baixos níveis de

umidade, podendo permanecer viáveis por até dois anos nestas condições (Töfoli; Domingues; Zanotta, 2017).

Havendo umidade e calor suficientes, os conídios germinam e infectam as plantas rapidamente, podendo o fungo penetrar diretamente pela cutícula ou através de estômatos (Töfoli; Domingues; Zanotta, 2017). Após a penetração, os sintomas da doença são evidentes de quatro a sete dias após o início da infecção. A sua disseminação ocorre principalmente pelo plantio de sementes infectadas, ação de ventos, águas de chuva e irrigação, circulação de pessoas e equipamentos agrícolas (Töfoli; Domingues; Zanotta, 2017).

#### 2.4.2.1. *Alternaria japonica* Yoshii

A *A. japonica* pertencente ao reino Fungi, ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Dothideomycetes, subclasse Pleosporomycetidae, ordem Pleosporales e família Pleosporaceae (MYCOBANK DATABASE, 2017).

A seção Japonica é composta por duas espécies (*A. japonica* e *A. nepalensis*) isolado de Brassicaceae. Os conidióforos primários são curtos a longos, simples ou às vezes ramificados, contendo um único locus conidiogênico. Os conídios são curtos para ovóide longo com septos transversais e longitudinais, constrictões no máximo septos transversais, em cadeias curtas. Um locus conidiogênico apical pode dar origem a um conidióforo secundário (Lawrence et al., 2013).

## 2.5. Controle biológico

O controle biológico ou biocontrole é um método de controle de pragas agrícolas e dos insetos transmissores de doenças a partir do uso de seus inimigos naturais, que podem ser outros insetos benéficos, predadores, parasitoides, e microrganismos, como fungos, vírus e bactérias, ou seja, é um método de controle racional e sadio, que tem como objetivo final usar esses inimigos naturais que não deixam resíduos nos alimentos e não causam danos ao meio ambiente e à saúde da população (EMBRAPA, 2019).

O biocontrole é a redução do inóculo ou das atividades determinantes da doença causadas por um patógeno, realizada por ou através de um, ou mais organismos que não o homem, ou ainda a destruição parcial ou total de patógenos



por outros organismos frequentemente encontrados na natureza (Agrios, 2005). De Medeiros et al. (2018), definem o biocontrole como qualquer interferência negativa no crescimento, infectividade, virulência, agressividades ou outros atributos de outro microrganismo pode ser considerado controle biológico.

### 2.5.1. Microrganismos no controle biológico de fitopatógenos

O controle biológico é definido como a ação de organismos que mantêm a população de outros organismos considerados pragas ou doenças, em um nível mais baixo do que ocorreria em sua ausência (Batista Filho, 2006). Ele tem sido utilizado como uma alternativa sustentável, por meio da aplicação de microrganismos antagonistas a patógenos habitantes do solo (Melo, 2020).

Para o controle de doenças, buscam-se por microrganismos de vida livre (saprofitos), ou colonizadores de superfícies vegetais e hiperparasitas (fungos que parasitam outros fungos) ou, ainda, colonizadores de tecidos internos das plantas (endofíticos). Agentes de biocontrole podem atuar por mecanismos de ação diretos (competição, parasitismo e antibiose), ou indiretos (promoção de crescimento e indução de resistência). Existem na literatura especializada, relatos de uma diversidade de microrganismos, principalmente fungos e bactérias, utilizados no controle de fungos fitopatogênicos (Pal; Gardener, 2006; Morandi; Bettiol, 2009).

O sucesso no uso de organismos antagonistas no controle de doenças está relacionado ao conhecimento da ecologia e fisiologia. É necessário saber qual é o nível de resistência suportado pelo antagonista, como é seu comportamento e crescimento em diferentes substratos, qual sua resistência à produtos químicos e como é a relação entre patógeno, hospedeiro e o ambiente em que ambos estão inseridos (solo, planta etc.) (Morandi et al., 2014).

*Trichoderma* spp. é o fungo mais estudado e utilizado como agente de controle biológico, principalmente, de fitopatógenos habitantes do solo, e, mais recentemente, como bioestimulante na promoção de crescimento de plantas e aumento de produtividade (Woo et al., 2014). Por possuir um estilo de vida versátil, é aplicável de diversas maneiras na agricultura e que são eficazes frente a distintos tipos de patógenos, em numerosos cultivos, em diferentes partes da planta e não são patogênicos aos seres humanos e a outros animais, além de agirem em condições ambientais e edáficas distintas (Monte et al., 2019). Estes são considerados únicos,

já que muitos de suas espécies possuem a capacidade de parasitar outros fungos e, uma análise genômica entre espécies desse gênero sugeriu que o micoparasitismo é uma propriedade inata desse gênero (Kubicek et al., 2019).

### 2.5.2. O gênero *Trichoderma* e seu papel no biocontrole de fitopatógenos

Os fungos do gênero *Trichoderma* pertencem ao filo Ascomycota, subdivisão Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hipocreaceae (Bonini et al., 2020). São espécies descritas como cosmopolitas, saprófitos, com reprodução assexuada que podem ser encontradas tanto em regiões de clima tropical, como em regiões de clima frio e em temperatura extremas, como em solo antártico (Macías-Rodríguez, 2020). Podendo ser encontrados mais facilmente em solos de regiões que apresentam clima temperado e tropical (Nozaki et al., 2018).

A principal característica das espécies de *Trichoderma* é que são dotadas de grande oportunismo, apresentando alta capacidade de colonizar a rizosfera das plantas e muitos substratos com diferentes características, em ambientes tão distintos como os da Antártida, Caribe, Amazônia ou Saara. A maioria das cepas de *Trichoderma* vive em climas temperados e solos ácidos. Porém, podem produzir estruturas de resistência, clamidósporos e microescleródios, e com isto são capazes de sobreviver em condições muito adversas (Monte et al., 2019).

Além disso, têm sido obtidas cepas de *Trichoderma* com potencial de biocontrole de fitopatógenos que crescem em altas temperaturas, solos salinos ou alcalinos e sob condições de baixa umidade (Monte et al., 2019). São, ainda, fungos comercializados por algumas empresas na forma de pós molháveis, grânulos dispersíveis, suspensões concentradas, óleos emulsionáveis, grãos colonizados e esporos secos (Fantinel, 2018).

A reprodução do *Trichoderma*, nas espécies onde a fase sexuada é conhecida, é caracterizada pela formação de corpos de frutificação do tipo peritécio, formados em estromas de coloração verde, amarelada, creme ou marrom, produzidos sobre o substrato colonizado. Nos peritécios são formados ascos cilíndricos contendo oito ascósporos bicelulares, que se fragmentam em 16 esporos esverdeados ou hialinos (Abreu; Pfenning, 2019).

Na fase assexuada, são formados, a partir do micélio vegetativo, conidióforos com um eixo central e ramificações laterais, que terminam em espirais divergentes de

células conidiogênicas do tipo fiálide, com formato de garrafa ou alongadas. Na ponta das fiálides são produzidos os típicos conídios unicelulares, esféricos, ovais ou alongados, de cor verde na maior parte das espécies. Os conidióforos são comumente agregados em pústulas ou 'tufos' espalhados pela colônia (Abreu; Pfenning, 2019).

Esses agentes de controle biológico amplamente estudados, são oportunistas, simbioses de plantas, fortes competidores no ambiente do solo, constituem fontes de enzimas degradadoras de parede de outros fungos, são, também, produtores de antibióticos e parasitas de fungos fitopatogênicos (Kumar et al., 2011). São reconhecidos por seus importantes benefícios para a agricultura, como a capacidade de proteger as culturas contra doenças e aumentar o rendimento das culturas em condições de campo (Harman et al., 2004).

Plantas tratadas com *Trichoderma*, além de possuírem habilidade para suprimir o crescimento de fitopatógenos, podem induzir resistência sistêmica (RSI) a doenças e/ou promover o crescimento das plantas, aumentando a germinação das sementes, ramificação e crescimento de raízes, brotação de estacas, crescimento de ramos, incremento de área foliar e aumento no rendimento das culturas (Mello et al., 2020).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Selecionar linhagens de *Trichoderma* spp. com potencial para controle biológico de fitopatógenos de cebolinha e couve.

#### 3.2. Objetivos específicos

Avaliar o crescimento, esporulação e a atividade enzimática de *Trichoderma* spp.;

Selecionar linhagens de *Trichoderma* spp. pelas técnicas da cultura pareada, metabólitos não voláteis e metabólitos não voláteis termoestáveis para biocontrole de *C. theobromicola*;

Selecionar linhagens de *Trichoderma* spp. pelas técnicas da cultura pareada, metabólitos não voláteis e metabólitos não voláteis termoestáveis para biocontrole de *A. japonica*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Origem das linhagens de *Trichoderma* spp.

Foram utilizadas sete linhagens de *Trichoderma* spp. obtidas da rizosfera da espécie *Piper marginatum* Jacq. pertencente à família Piperaceae, chamada popularmente por capeba, malvarisco, pimenta-do-mato, caapeba-cheirosa e nhandi (Tabela 1). Os experimentos foram realizados contra dois fitopatógenos, sendo eles: *C. theobromicola*, isolado de lesões de antracnose em cebolinha e *A. japonica*, provenientes de lesões em folhas de couve. Todos os fungos utilizados neste estudo foram cedidos pelo Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana – LPBOM, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM, todos os experimentos foram executados no referido laboratório.

Tabela 1 - Linhagens de *Trichoderma* spp. utilizadas neste estudo

Linhagens	Código na Coleção (LPBOM)	Código nos experimentos
<i>Trichoderma aureoviride</i>	P5B	T1
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	P16D2	T2
<i>Trichoderma ceraceum</i>	P7D	T3
<i>Trichoderma harzianum</i>	P14A	T4
<i>Trichoderma inhamatum</i>	P21C	T5
<i>Trichoderma reesei</i>	P27B2.3	T6
<i>Trichoderma tomentosum</i>	P14C2	T7

### 4.2. Reativação das linhagens e confirmação da pureza

Culturas monospóricas de todos os fungos foram reativadas primeiramente em tubos de ensaio contendo caldo glicosado 2% e incubados por sete dias a 28 °C. Após detectado crescimento, fragmentos das colônias foram transferidos para tubos de ensaio inclinados contendo meio de cultivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar pH 6,8; infusão de 200 g de batata, 20 g de dextrose e 17 g de ágar, 1000 mL de água destilada, preparado no laboratório e autoclavado, acrescido de 50 mg/L de antibiótico Cloranfenicol para inibição do crescimento de bactérias.

Logo após foram incubados por mais sete dias a 28 °C. Após o crescimento, as colônias foram repicadas para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura BDA e incubadas por mais sete dias a 28 °C.

Para avaliação micromorfológica, foi feito microcultivo utilizando-se o meio BDA pela técnica do microcultivo em lâmina (Riddell, 1950), onde blocos do respectivo meio medindo 10 x 10 mm foram disposto no centro de uma lâmina de vidro esterilizada e nas quatro paredes dos blocos foram feitas inoculações de micélio das linhagens de *Trichoderma* spp. Posteriormente, as lâminas contendo os blocos foram colocadas em placas de Petri forradas com papel filtro, umidificado com 2 mL de água destilada esterilizada.

Os blocos foram cobertos com lamínulas de vidro e as placas foram incubadas por quatro a cinco dias sob fotoperíodo de 12 h a 25 °C. Passado o período de incubação, as lamínulas foram destacadas e transferidas para novas lâminas contendo o corante azul de lactofenol, que cora as estruturas reprodutivas fúngicas sem promover o rompimento celular. As lâminas foram observadas em microscópio de luz para confirmação da esporulação e pureza das linhagens.

#### **4.3. Avaliação do crescimento micelial e esporulação**

Após o crescimento das colônias nas placas de Petri, foram preparadas suspensões de esporos retirando-se dez discos miceliais (5 mm) da área de borda das colônias e transferindo-os para tubos de ensaio contendo 10 mL da solução de ágar-ágar 0,1%. Os tubos foram agitados em agitador vórtex de bancada por um minuto.

Após isso, 5 µL foram inoculados no centro de placas de Petri (90 x 15 mm) contendo os meios AFA (ágar farinha de aveia – infusão de 60 g de farelo de aveia; 13 g de ágar; pH 6; 1000 mL de água destilada), BDA (ágar batata dextrosado) e AFM (ágar farinha de milho – infusão de 2 g de farinha de milho; ágar 15 g; pH 6; 1000 mL de água destilada). Estes meios são utilizados em estudos da morfologia de fungos do gênero *Trichoderma* por permitirem a observação de características morfológicas estáveis (Gams; Bisset, 1998). As placas foram incubadas por cinco dias em estufa BOD a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h. Foram realizadas medições perpendiculares das colônias a cada 24 h com auxílio de um paquímetro digital, ao fim do experimento

foi calculado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) por dia, utilizando a fórmula de Oliveira (1991):

$$IVCM = \sum \frac{(D - D_a)}{N}$$

Onde:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial, em mm, por dia;

D = diâmetro média atual da colônia, em mm;

Da = diâmetro médio da colônia no dia anterior, em mm;

N = número de dias.

Após a finalização do experimento, as placas foram cobertas com 10 mL de solução esterilizada de Tween 80 (0,1%) e NaCl (0,9%). Foi utilizado um pincel de cerdas macias para auxiliar no desprendimento dos esporos.

O conteúdo foi filtrado com gaze esterilizada e recolhido em béqueres, onde cerca de 1 mL dessa suspensão foi diluído em 9 mL da mesma solução citada em tubo de ensaio. Logo após, 10 µL dessa diluição foram transferidos para Câmara de Neubauer para contagem, sendo os resultados expressos em esporos/mL (Alfenas; Zauza; Mafia, 2007).

#### **4.4. Avaliação da atividade enzimática**

Foi realizado ensaio qualitativo para determinação da atividade enzimática. Discos miceliais de 5 mm das linhagens previamente cultivadas por sete dias foram inoculados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo o meio GYP (10 g de glicose; 0,1 g de extrato de levedura; 0,5 g de peptona; 16 g de ágar por litro com pH = 6,0) suplementado com substrato específico para cada enzima (Toghueo et al., 2017). As placas foram incubadas por cinco dias a 25 °C, sendo considerada positiva a formação zonas translúcidas ou claras ao redor da colônia (Hankin; Anagnostakis, 1975).

A atividade amilolítica foi avaliada em meio GYP suplementado com amido solúvel (2 g L<sup>-1</sup>), pH 6,0, e após a incubação a atividade da enzima foi revelada com solução de lugol contendo 1% de iodo e 2% de iodeto de potássio.

A atividade celulolítica foi avaliada em meio GYP suplementado com 0,5% de carboximetilcelulose, pH 6,0, onde após a incubação a atividade foi revelada com

solução aquosa de vermelho congo e posteriormente com solução de NaCl a 0,5 M por 15 minutos.

A atividade de lacase foi avaliada em meio GYP suplementado com 0,05 g/L de  $\alpha$ -naftol, pH 6,0, sendo considerada a atividade positiva com alteração de cor do meio de claro para azul.

A atividade lipolítica foi avaliada no meio ágar peptona (10 g de peptona; 5 g de NaCl; 0,1 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 16 g de ágar por litro com pH = 6,0) suplementado com 1% de Tween 20 esterilizado separadamente.

#### **4.5. Teste de patogenicidade dos fitopatógenos**

Para confirmação do potencial patogênico dos fitopatógenos a serem confrontados, foi realizado o teste de patogenicidade (Postulado de Koch) em mudas de cebolinha e couve. Os fitopatógenos avaliados foram *C. theobromicola* e *A. japonica*, também cedidos pelo laboratório LPBOM da FCA/UFAM.

Os fitopatógenos foram reativados em tubos de ensaio contendo caldo glicosado 2% e incubados por sete dias a 28 °C em estufa BOD. Após o crescimento, foram preparadas soluções de esporos cujas suspensões foram padronizadas em  $1 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  a partir de contagem em câmara de Neubauer (Alfenas; Zauza; Mafia, 2007).

Uma vez ajustadas, as suspensões de esporos dos fitopatógenos foram borrifadas sobre mudas sadias de cebolinha e couve, respectivamente *C. theobromicola* e *A. japonica*. O controle negativo consistiu apenas de água destilada estéril.

As mudas foram incubadas em câmara úmida durante 48 h ou até que fosse observado o surgimento de sintomas característicos das doenças causadas pelos fitopatógenos supracitados. Após a detecção, as mudas foram removidas da câmara úmida e ficaram em observação por sete a dez dias, onde após esse período foi realizado o reisolamento dos fitopatógenos a partir das lesões causadas por ambos nas folhas.

#### **4.6. Ensaio de antagonismo**



#### 4.6.1. Antagonismo por cultura pareada

O primeiro experimento realizado foi o teste da cultura pareada, onde ocorre o confronto direto entre o fitopatógeno e o potencial antagonista a ser avaliado, conforme metodologia de Dennis e Webster (1971). Em placas de Petri medindo (90 x 15 mm) contendo 20 mL do meio BDA, foi inoculado a 1 cm da borda um disco de micélio do fitopatógeno, as placas foram incubadas a 25 °C por 48 h, após isso na outra extremidade da placa foi inoculado um disco de micélio das linhagens de *Trichoderma* spp. com potencial antagônico a ser investigado. O controle deste experimento consistiu de placas contendo apenas o disco do fitopatógeno, sem as linhagens de *Trichoderma*.

Após a inoculação das linhagens de *Trichoderma* spp., as placas foram distribuídas ao acaso em estufa BOD e incubadas a 25 °C por até sete dias ou até que o controle crescesse sobre toda a superfície do meio de cultura. O delineamento experimental deste experimento foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Após a incubação, o tamanho em mm das colônias dos fitopatógenos foi medido com auxílio de paquímetro digital para determinação do percentual de inibição de crescimento micelial (PIC) através da fórmula de Menten et al. (1976): 
$$\text{PIC} = \frac{\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento}}{\text{Diâmetro da testemunha}} \times 100$$
 e os dados foram submetidos à análise de variância.

Em contribuição para a seleção de potenciais antagonistas, passado o período de incubação, as linhagens de *Trichoderma* spp. foram classificadas conforme escala de Bell et al. (1982) adaptada por Costa et al. (2019). Onde foram atribuídas notas para cada *Trichoderma* spp. em confronto com os fitopatógenos.

As escalas de nota variam de 1 a 5, dos quais: 1 – o potencial antagonista cresce sobre o fitopatógeno e ocupa toda a superfície da placa de Petri; 1,5 – o potencial antagonista cresce sobre 7/8 da placa; 2 – o potencial antagonista cresce sobre 2/3 da placa; 2,5 – o potencial antagonista cresce sobre 5/8 da placa; 3 – o potencial antagonista e fitopatógeno crescem até a metade da placa; 3,5 – o potencial antagonista cresce sobre 3/8 da placa; 4 – o potencial antagonista cresce sobre 1/3 da placa; 5 – o potencial antagonista não cresce na placa. Foram consideradas

potenciais antagonistas as linhagens de *Trichoderma* spp. que receberam notas iguais ou menores que 2.

#### 4.6.2. Antagonismo por metabólitos não voláteis

O efeito dos metabólitos voláteis das linhagens de *Trichoderma* spp. sobre os fitopatógenos foi avaliado conforme metodologia de Isaias et al. (2014). Para isso, as linhagens foram cultivadas em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de caldo batata-dextrose, pH 6,8. A incubação ocorreu em agitador orbital a 150 rpm, 25 °C em ausência de luz por sete dias.

O caldo fermentado obtido contendo metabólitos foi filtrado em bomba a vácuo três vezes. Primeiro com papel filtro para remoção da biomassa micelial, depois em membrana filtrante de 0,45 µm e por último com membrana filtrante de 0,22 µm para a esterilização total do extrato metabólico.

Após isso, o extrato obtido de cada potencial antagonista foi adicionado em meio BDA na proporção de 25% (v/v), que foi posteriormente vertido em placas de Petri (90 x 15 mm). Após a solidificação do meio, foi inoculado no centro de cada placa disco micelial de 5 mm de cada fitopatógeno separadamente.

O controle deste experimento consistiu de cada fitopatógeno inoculado em meio BDA isento dos filtrados dos potenciais antagonistas. As placas foram incubadas a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h por até sete dias ou até que os controles crescessem sobre toda a superfície das placas.

O delineamento deste experimento foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Ao final do experimento, foi mensurado perpendicularmente o tamanho das colônias dos fitopatógenos em mm para determinação da porcentagem de inibição (PIC) conforme descrito no experimento anterior e os dados foram submetidos à análise de variância.

#### 4.6.3. Antagonismo por metabólitos não voláteis termoestáveis

O antagonismo através da termoestabilidade dos metabólitos não voláteis foi realizado conforme metodologia de Kupper et al. (2003), com adaptações. Cerca de 25 mL do caldo fermentado bruto obtido no experimento anterior foi transferido para outro frasco Erlenmeyer contendo 75 mL de ágar batata dextrose, na proporção final

de 25% (v/v). O meio foi esterilizado por 15 min a 121 °C, sendo em seguida vertido em placas de Petri (90 x 15 mm).

Após a solidificação do meio, discos miceliais dos fitopatógenos foram inoculados no centro das placas, tendo como controle o meio BDA isento do extrato dos potenciais antagonistas. As placas foram incubadas a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h por até sete dias ou até que os controles crescessem sobre toda a superfície das placas.

O delineamento deste experimento também foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Após a incubação, foi mensurado o tamanho da colônia dos fitopatógenos em mm para determinação da porcentagem de inibição de crescimento (PIC) conforme o ensaio anterior e os dados foram submetidos à análise de variância.

#### **4.7. Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados com delineamento inteiramente casualizado. Os ensaios de antagonismo foram realizados com quatro repetições, sendo considerados oito tratamentos (sete linhagens de *Trichoderma* mais a testemunha) contra cada fitopatógeno.

Os experimentos de crescimento micelial e esporulação foram realizados com três repetições. Os dados de esporulação foram analisados em arranjo fatorial, considerando sete fungos frente três meios de cultura.

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância seguida de teste de comparação de médias com auxílio do *software* Sisvar (Ferreira, 2011). Foi aplicado o teste de Tukey e foram considerados significativos os tratamentos que apresentaram nível de significância menor ou igual a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Viabilidade e pureza das linhagens de *Trichoderma* spp.

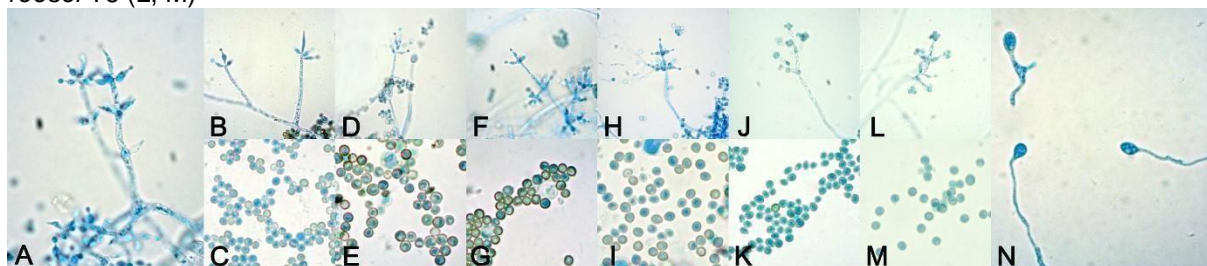
Todas as sete linhagens de *Trichoderma* avaliadas apresentaram bom crescimento, foi possível observar que as características macro (Figura 1) e microscópicas (Figura 2) das colônias foram mantidas, não sendo detectada nenhuma contaminação por bactérias, ácaros ou outros fungos.

Figura 1 - Morfologia das linhagens de *Trichoderma* spp. reativadas em meio BDA após sete dias. A – *T. aureoviride* P5B, B - *T. brevicompactum* P16D2, C - *T. ceraceum* P7D, D - *T. harzianum* P14A, E - *T. inhamatum* P21C, F - *T. reesei* P27B2.3, G - *T. tomentosum* P14C2



Fonte: A autora

Figura 2 - Conidióforos (A, B, D, F, H, J, L), conídios (C, E, G, I, K, M) e clamidósporos (N) de *Trichoderma* spp. cultivados em meio BDA por cinco dias. *Trichoderma aureoviride* T1 (A, B, C, N); *T. ceraceum* T3 (D, E); *T. harzianum* T4 (F, G); *T. tomentosum* T7 (H, I); *T. brevicompactum* T2 (J, K); *T. reesei* T6 (L, M)



Fonte: A autora

Os fungos são microrganismos que apresentam crescimento lento, podendo levar no mínimo sete dias para crescer totalmente sobre a superfície do meio de cultura em placa de Petri. Esse fato ainda pode sofrer influência de vários fatores como concentração e fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e luminosidade (Rajput et al., 2014; Ghazanfar; Raza; Raza, 2018; Moreno-Ruiz et al., 2020), que interferem significativamente na fisiologia e metabolismo desses indivíduos. As

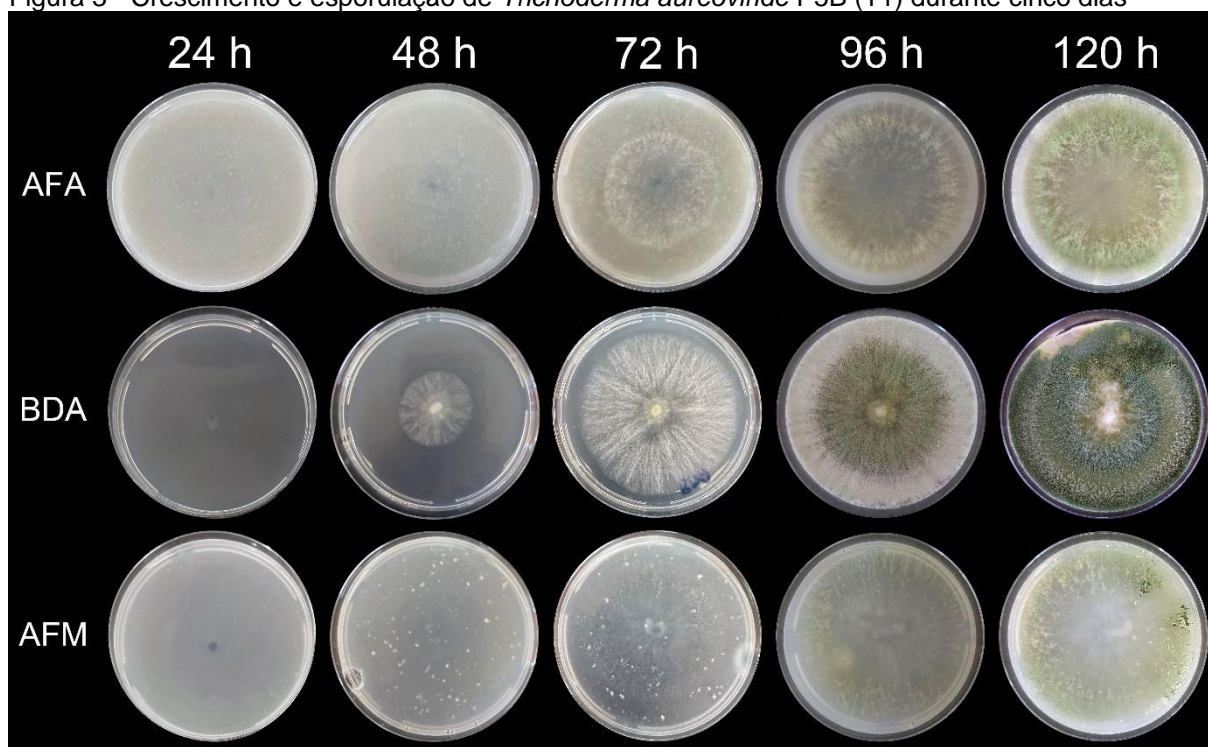
linhagens do gênero *Trichoderma* apresentam crescimento bastante acelerado em comparação com outros gêneros, fato que é satisfatório quando se deseja produzir biomoléculas ou experimentos utilizando estes indivíduos (Halifu et al., 2019; Liu et al., 2020).

As coleções de culturas microbianas são uma forma bastante eficaz de manter bancos de germoplasma ativos, pois uma vez que se isola um microrganismo, seja ele, fungo ou bactéria, e se aplica as técnicas de preservação ideais, as linhagens se mantêm viáveis por longos anos desde que se faça a manutenção regular (Sakr, 2018; Felipe et al., 2019; Ruffatto; Ziem; Maciel, 2021), o que de certa forma contribuiu significativamente com a viabilidade das linhagens de *Trichoderma* utilizadas neste estudo.

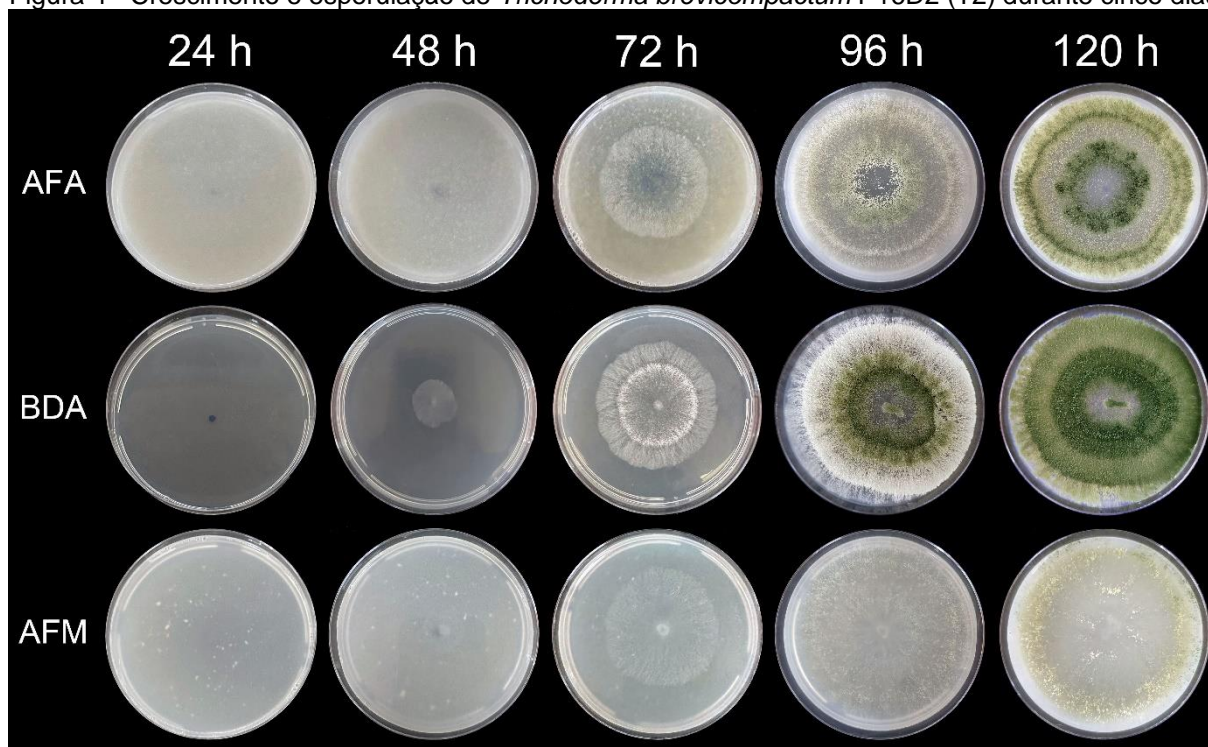
Os métodos mais comuns de preservação de fungos são os métodos de Castellani e a preservação em óleo mineral, onde fragmentos das colônias previamente cultivadas são transferidas para frascos contendo respectivamente água destilada, que é esterilizada por três dias consecutivos, ou óleo mineral. Essas técnicas são consideradas bastante eficientes, pois as culturas se mantêm viáveis e biologicamente ativas, como constatado nos estudos de Oliveira et al. (2021) e Matias et al. (2022).

## **5.2. Crescimento e esporulação de *Trichoderma* spp.**

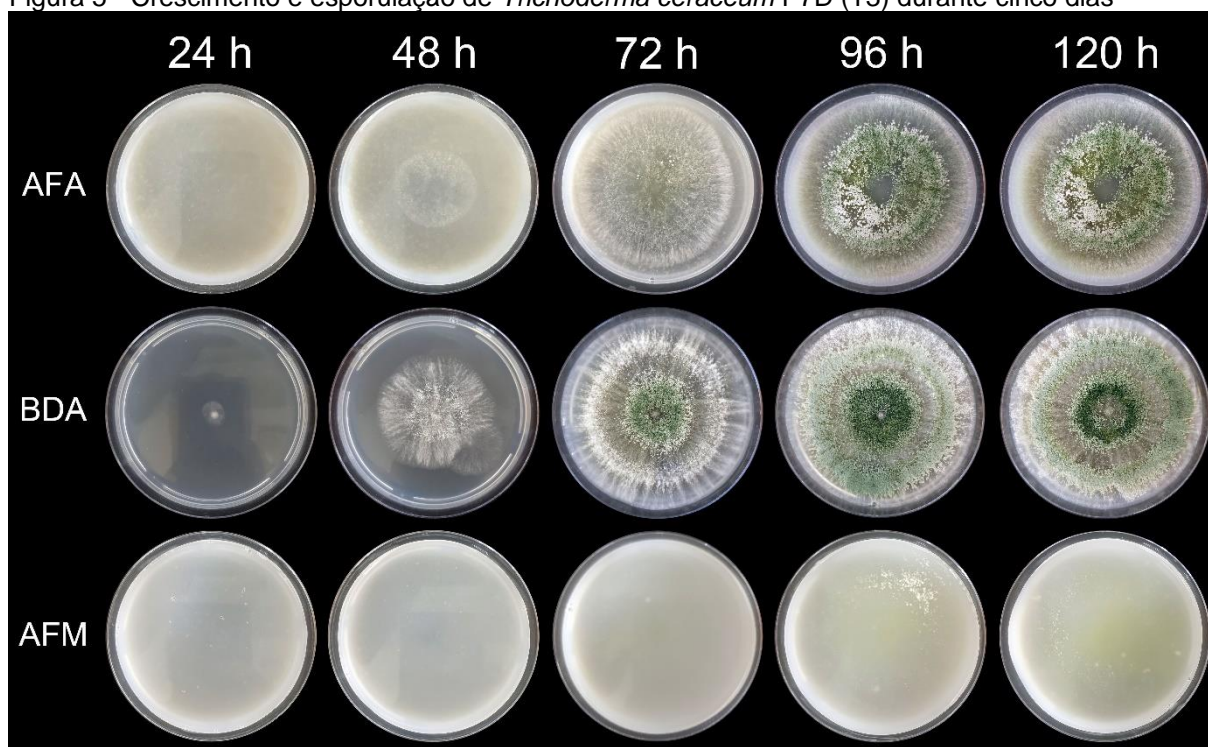
Todas as linhagens de *Trichoderma* apresentaram crescimento micelial excelente (Figuras 3 a 9). O IVCM obtido variou de 15,52 a 16,26 mm em meio AFA (Tabela 2); de 14,04 a 15,97 mm em meio BDA (Tabela 3); e entre 15,73 a 16,05 mm em meio AFM (Tabela 4). Os fungos do gênero *Trichoderma* apresentam crescimento muito acelerado, essa característica é muito bem vista pois permite, por exemplo, que indivíduos deste gênero consigam colonizar e se desenvolver rapidamente no interior das plantas, característica que os favorece em competição com potenciais fitopatógenos de importância agrícola (Oszust; Cybulska; Frac, 2020; Ali, 2021; Güçlü; Özer, 2022).

Figura 3 - Crescimento e esporulação de *Trichoderma aureoviride* P5B (T1) durante cinco dias

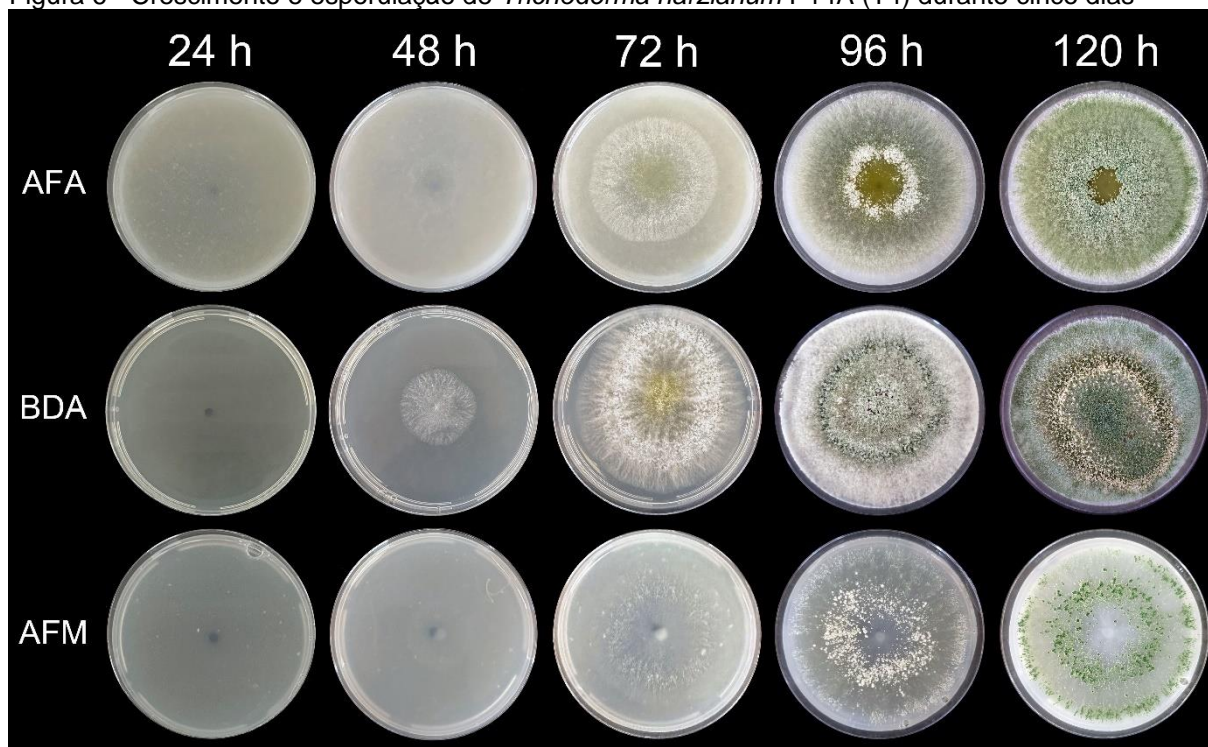
AFA – ágar farinha de aveia; BDA – ágar batata dextrose; AFM – ágar farinha de milho  
Fonte: A autora

Figura 4 - Crescimento e esporulação de *Trichoderma brevicompactum* P16D2 (T2) durante cinco dias

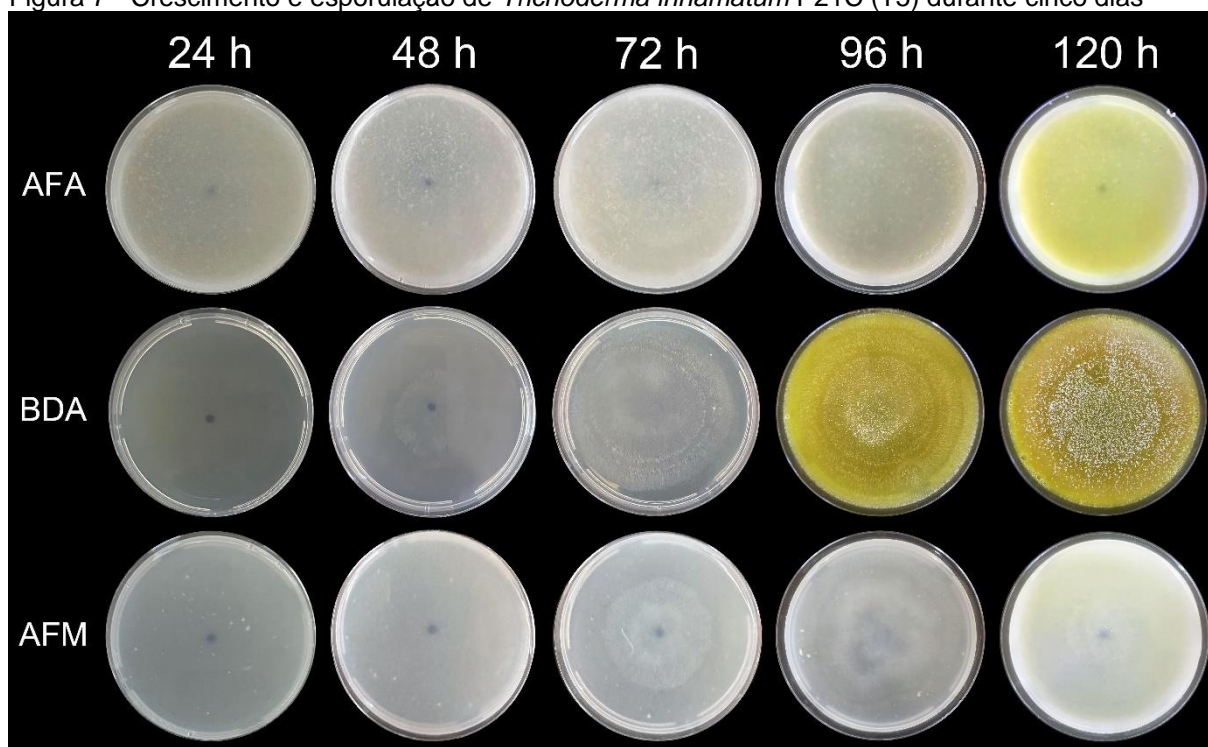
AFA – ágar farinha de aveia; BDA – ágar batata dextrose; AFM – ágar farinha de milho  
Fonte: A autora

Figura 5 - Crescimento e esporulação de *Trichoderma ceraceum* P7D (T3) durante cinco dias

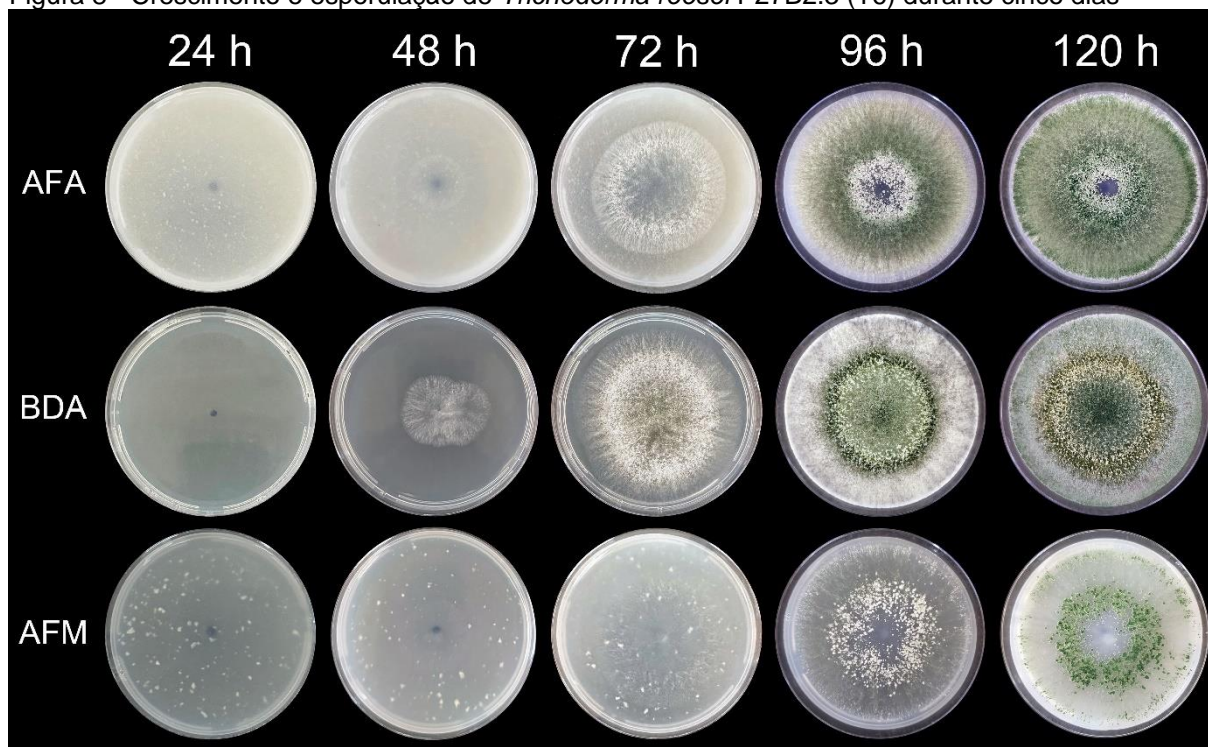
AFA – ágar farinha de aveia; BDA – ágar batata dextrose; AFM – ágar farinha de milho  
Fonte: A autora

Figura 6 - Crescimento e esporulação de *Trichoderma harzianum* P14A (T4) durante cinco dias

AFA – ágar farinha de aveia; BDA – ágar batata dextrose; AFM – ágar farinha de milho  
Fonte: A autora

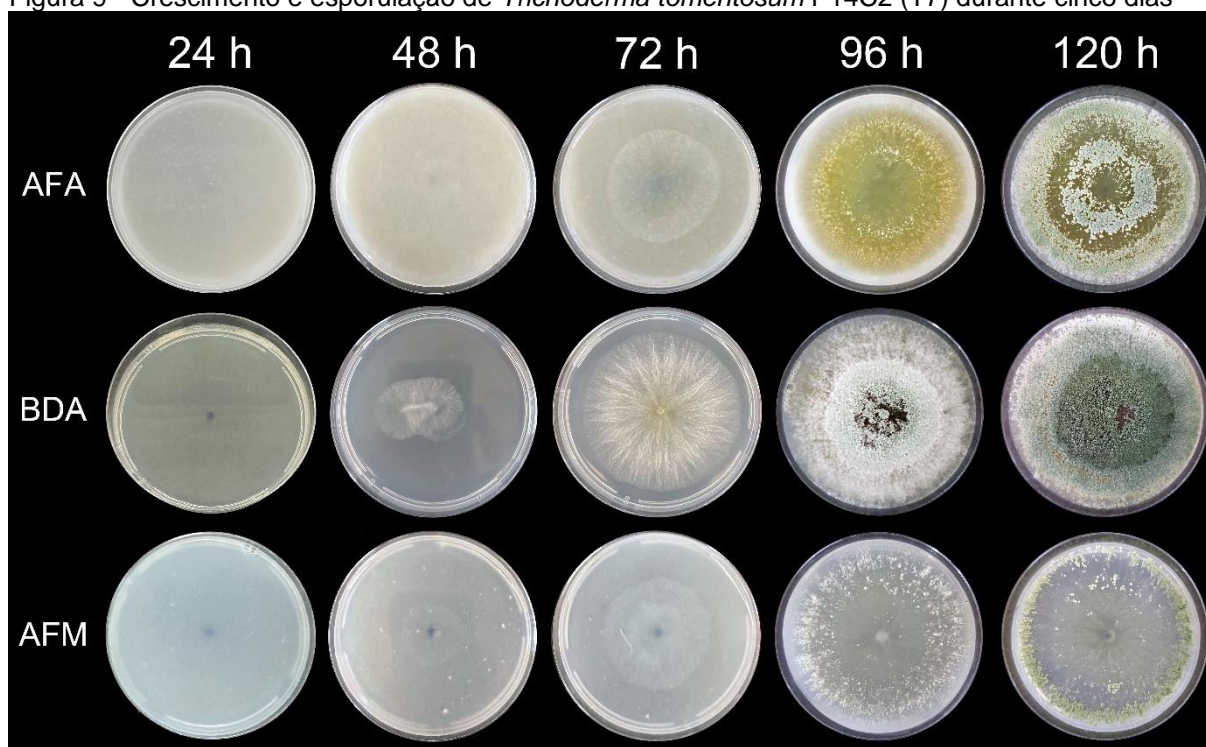
Figura 7 - Crescimento e esporulação de *Trichoderma inhamatum* P21C (T5) durante cinco dias

AFA – ágar farinha de aveia; BDA – ágar batata dextrose; AFM – ágar farinha de milho  
Fonte: A autora

Figura 8 - Crescimento e esporulação de *Trichoderma reesei* P27B2.3 (T6) durante cinco dias

AFA – ágar farinha de aveia; BDA – ágar batata dextrose; AFM – ágar farinha de milho  
Fonte: A autora



Figura 9 - Crescimento e esporulação de *Trichoderma tomentosum* P14C2 (T7) durante cinco dias

AFA – água farinha de aveia; BDA – água batata dextrose; AFM – água farinha de milho  
 Fonte: A autora

Tabela 2 - Crescimento micelial médio (em mm) e índice de crescimento micelial (IVCM) em mm por dia de linhagens de *Trichoderma* spp. cultivadas em meio AFA durante cinco dias

Linhagens	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	IVCM
<i>T. aureoviride</i> P5B	3,23	19,98	43,36	84,53	84,53	16,26 a
<i>T. brevicompactum</i> P16D2	6,91	16,99	49,10	84,53	84,53	15,52 a
<i>T. ceraceum</i> P7D	5,10	48,36	59,57	84,53	84,53	15,89 a
<i>T. harzianum</i> P14A	4,49	17,38	56,53	84,53	84,53	16,01 a
<i>T. inhamatum</i> P21C	3,95	25,93	56,59	84,53	84,53	16,12 a
<i>T. reesei</i> P27B2.3	3,62	17,84	54,83	84,53	84,53	16,18 a
<i>T. tomentosum</i> P14C2	3,21	19,29	52,47	84,53	84,53	16,26 a
<b>CV (%)</b>						<b>1,83</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). CV - Coeficiente de variação

Tabela 3 - Crescimento micelial médio (em mm) e índice de crescimento micelial (IVCM) em mm por dia de linhagens de *Trichoderma* spp. cultivadas em meio BDA durante cinco dias

<b>Linhagens</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>	<b>120 h</b>	<b>IVCM</b>
<i>T. aureoviride</i> P5B	6,72	34,14	72,80	84,53	84,53	15,56 a
<i>T. brevicompactum</i> P16D2	4,70	21,67	57,60	84,53	84,53	15,97 a
<i>T. ceraceum</i> P7D	14,33	66,37	75,10	84,53	84,53	14,04 b
<i>T. harzianum</i> P14A	5,42	35,39	77,75	84,53	84,53	15,82 a
<i>T. inhamatum</i> P21C	4,77	35,02	75,88	84,53	84,53	15,95 a
<i>T. reesei</i> P27B2.3	5,22	38,25	78,32	84,53	84,53	15,86 a
<i>T. tomentosum</i> P14C2	4,97	34,27	74,74	84,53	84,53	15,91 a
<b>CV (%)</b>						<b>1,43</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). CV - Coeficiente de variação

Tabela 4 - Crescimento micelial médio (em mm) e índice de crescimento micelial (IVCM) em mm por dia de linhagens de *Trichoderma* spp. cultivadas em meio AFM durante cinco dias

<b>Linhagens</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>	<b>120 h</b>	<b>IVCM</b>
<i>T. aureoviride</i> P5B	4,36	30,60	62,30	84,53	84,53	16,03 a
<i>T. brevicompactum</i> P16D2	5,86	20,77	58,93	84,53	84,53	15,73 b
<i>T. ceraceum</i> P7D	5,20	46,33	55,47	84,53	84,53	15,87 ab
<i>T. harzianum</i> P14A	4,38	30,05	59,86	84,53	84,53	16,03 a
<i>T. inhamatum</i> P21C	5,15	29,82	62,83	84,53	84,53	15,88 ab
<i>T. reesei</i> P27B2.3	4,71	11,20	49,49	84,53	84,53	15,96 a
<i>T. tomentosum</i> P14C2	4,27	27,87	57,68	84,53	84,53	16,05 a
<b>CV (%)</b>						<b>0,49</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). CV - Coeficiente de variação

Em relação à esporulação (Tabela 5), o meio BDA foi o mais eficiente para todas as linhagens seguido pelo meio AFA. A linhagem *T. inhamatum* apresentou esporulação apenas em BDA. O meio BDA não foi tão importante para *T. ceraceum* quanto o meio AFM, onde apresentou a maior taxa de esporulação dentre as linhagens testadas.

Tabela 5 - Concentração de esporos por mL de linhagens de *Trichoderma* spp. cultivados em diferentes meios de cultura durante cinco dias

Fungos	AFA	BDA	AFM
<i>T. aureoviride</i> P5B	1,97 x 10 <sup>7</sup> b B	2,30 x 10 <sup>8</sup> a BC	2,92 x 10 <sup>7</sup> b B
<i>T. brevicompactum</i> P16D2	2,29 x 10 <sup>8</sup> b A	4,88 x 10 <sup>8</sup> a A	6,85 x 10 <sup>7</sup> c AB
<i>T. ceraceum</i> P7D	2,32 x 10 <sup>7</sup> b B	1,15 x 10 <sup>8</sup> a D	8,33 x 10 <sup>5</sup> c C
<i>T. harzianum</i> P14A	1,24 x 10 <sup>8</sup> a A	1,71 x 10 <sup>8</sup> a BCD	5,85 x 10 <sup>7</sup> b AB
<i>T. inhamatum</i> P21C	0 b C	3,20 x 10 <sup>7</sup> a E	0 b C
<i>T. reesei</i> P27B2.3	1,46 x 10 <sup>8</sup> a A	1,55 x 10 <sup>8</sup> a CD	4,92 x 10 <sup>7</sup> b AB
<i>T. tomentosum</i> P14C2	1,54 x 10 <sup>8</sup> b A	2,76 x 10 <sup>8</sup> a B	1,03 x 10 <sup>8</sup> b A
<b>CV (%)</b>		<b>17,68</b>	

AFA – ágar farinha de aveia; BDA – ágar batata dextrose; AFM – ágar farinha de milho. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). CV - Coeficiente de variação. Os dados foram transformados em raiz quadrada para análise estatística

A esporulação é um processo reprodutivo importante na dispersão de conídios que irão dar origem a novas colônias. É comum que fungos que passem por sucessivos repiques ou passem muito tempo sem manutenção percam a capacidade de esporular, sendo necessário induzir situações de estresse para que essa capacidade seja regenerada (Senanayake et al., 2020; Jacques et al., 2021; Abuhena et al., 2022; Mattoo; Nonzom, 2022; Bala et al., 2023).

O meio BDA parece ser o mais comumente utilizado em estudos com *Trichoderma* pois é de fácil preparo e fornece todos os nutrientes necessários para o crescimento e reprodução de fungos desse gênero (Azevedo et al., 2020; Gu et al., 2020; Matas-Baca et al., 2022). A utilização de diferentes meios de cultura na micologia é uma estratégia bastante comum, mas depende diretamente da espécie com que se está trabalhando, o que pode influenciar significativamente na produção de biomassa ou esporos, como observado no estudo de Ghazanfar e Raza (2018) com *T. asperellum* e *T. harzianum*. Além disso, características como o pH, temperatura, luminosidade, radiação, dentre outros também podem influenciar nessas variáveis (Oliveira et al., 2019; Moreno-Ruiz et al., 2020; Andrés et al., 2022).

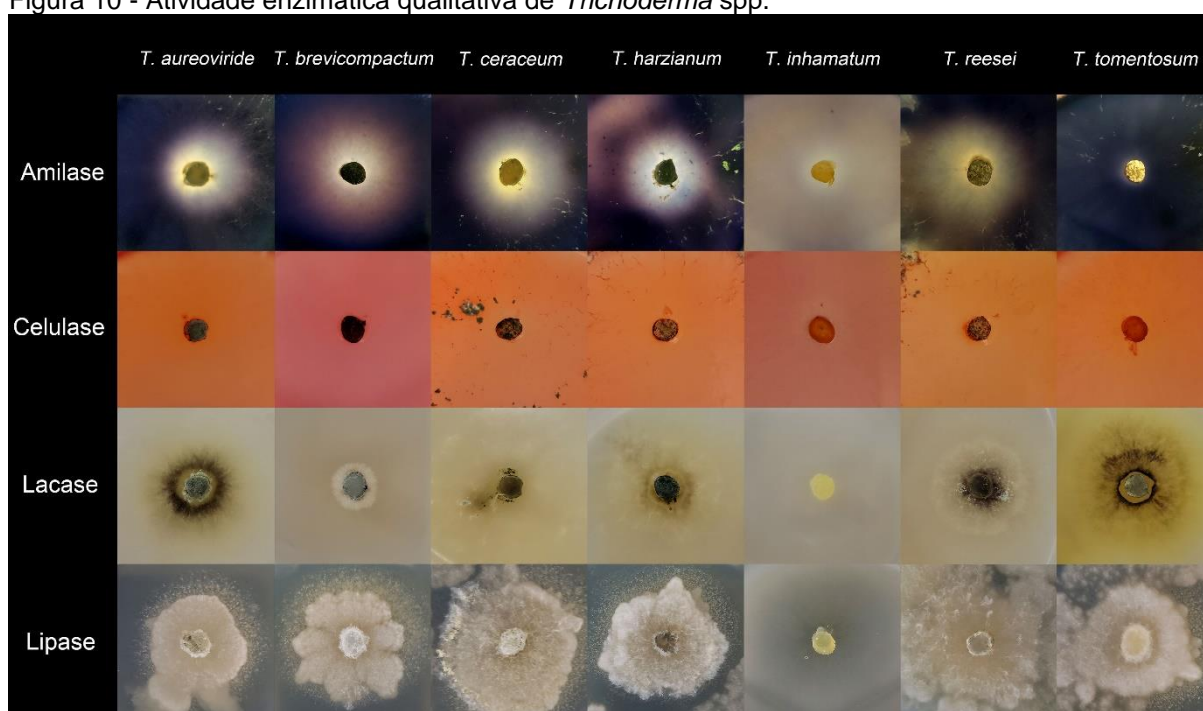
### 5.3. Atividade enzimática de *Trichoderma* spp.

No ensaio qualitativo de determinação da atividade enzimática (Figura 10; Tabela 6), foi observada atividade expressiva de amilase, onde a linhagem *T.*

*inhamatum* foi a que mais se destacou. Foi observada atividade celulolítica em quase todas as linhagens, com exceção de *T. brevicompactum* e *T. inhamatum*.

A atividade lipolítica foi observada nas linhagens com exceção de *T. inhamatum*. Nenhuma linhagem apresentou atividade para lacase. Esses resultados permitem concluir que o tempo de preservação não alterou a fisiologia dos isolados, pois mesmo após 15 anos de isolamento e preservação, a maquinaria celular está ativa, o que confirma a viabilidade dos mesmos para estudos biotecnológicos.

Figura 10 - Atividade enzimática qualitativa de *Trichoderma* spp.



Fonte: A autora

Tabela 6 - Atividade enzimática qualitativa de linhagens de *Trichoderma* spp.

Linhagens	Amilase	Celulase	Lacase	Lipase
<i>T. aureoviride</i> P5B	++	+++	-	++
<i>T. brevicompactum</i> P16D2	++	-	-	++
<i>T. ceraceum</i> P7D	++	+++	-	++
<i>T. harzianum</i> P14A	++	+++	-	++
<i>T. inhamatum</i> P21C	+++	-	-	-
<i>T. reesei</i> P27B2.3	++	+++	-	++
<i>T. tomentosum</i> P14C2	+	+++	-	++

+ atividade fraca; ++ atividade moderada; +++ atividade forte; - atividade não detectada

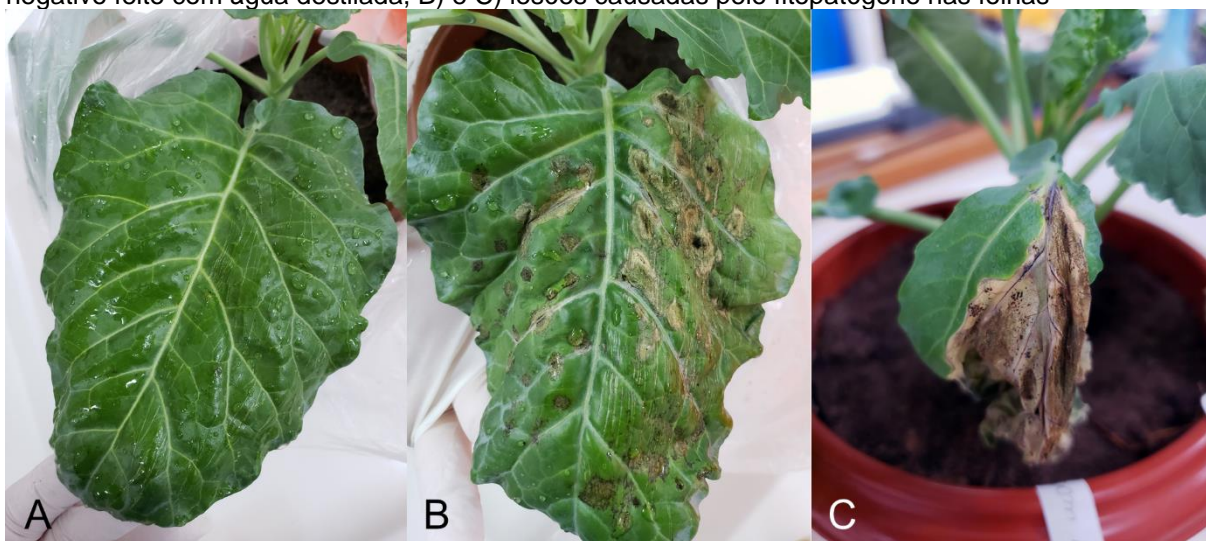
Fungos do gênero *Trichoderma* desempenham papel significativo na agricultura e biotecnologia, onde além da atividade antagonista contra fitopatógenos e promoção de crescimento vegetal, a capacidade de produção de diversas enzimas para aplicações industriais e agrícolas o destacam nesse meio (Zin; Badaluddin, 2020; Elkhateeb et al., 2021; You et al., 2022). Essas enzimas são fundamentais na decomposição da matéria orgânica bem como em processos biotecnológicos.

Entre as enzimas produzidas por este gênero, destacam-se as celulases, quitinases, proteases, amilases, lipases, xilanases, dentre outras (Rihani; Soumati, 2019; Loc et al., 2020; Abdel-Mageed et al., 2021; Sun et al., 2021; Xiang et al., 2021; Dhaver et al., 2022). Podemos notar que mesmo após o longo tempo de preservação, a atividade enzimática foi variável nas linhagens de *Trichoderma* utilizadas, o que torna a triagem enzimática um ótimo parâmetro para avaliar integridade do metabolismo de linhagens depositadas em coleções microbianas.

#### 5.4. Teste de patogenicidade dos fitopatógenos

Os sintomas de infecção por *A. japonica* em folhas de couve puderam ser observados a partir de 48 h (Figura 11), onde puderam ser notados durante o período em câmara úmida.

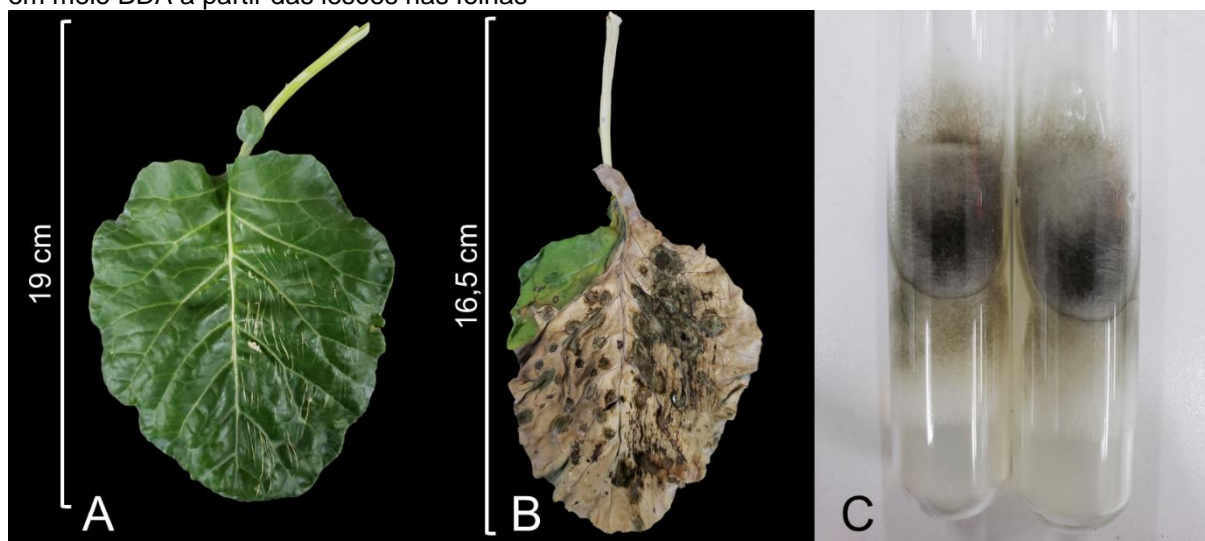
Figura 11 - Sintomas iniciais de infecção por *Alternaria japonica* em folhas de couve. A) Controle negativo feito com água destilada, B) e C) lesões causadas pelo fitopatógeno nas folhas



Fonte: A autora

À medida em que o tempo passava, os sintomas foram se agravando, onde lesões necróticas foram se desenvolvendo. Na Figura 12 podemos observar lesões nas folhas após dez dias e o fitopatógeno recuperado das lesões em meio BDA.

Figura 12 - Lesões causadas por *Alternaria japonica* em folhas de couve após dez dias. A) Controle negativo feito com água destilada, B) Lesões causadas pelo fitopatógeno, C) Fitopatógeno recuperado em meio BDA a partir das lesões nas folhas



Fonte: A autora

O fungo *C. theobromicola* não apresentou sintomas de infecção nas mudas testadas, o que pode ser justificado por possível perda do potencial patogênico.

## 5.5. Ensaio de antagonismo

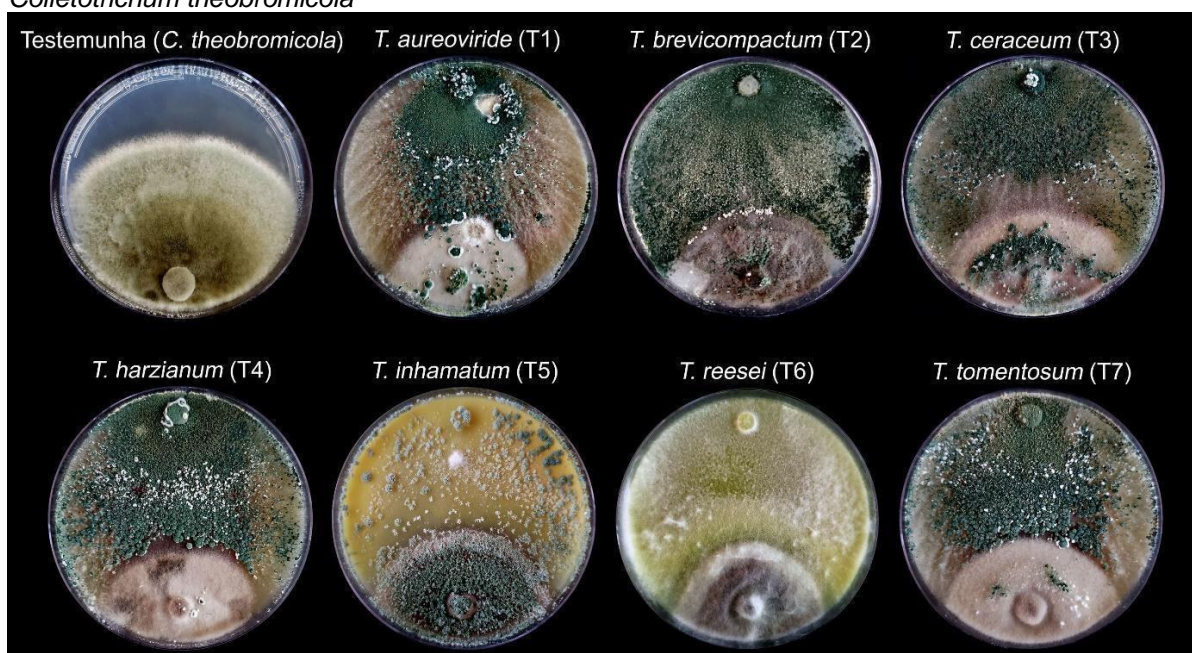
### 5.5.1. Confronto direto pela técnica da cultura pareada

Fungos do gênero *Trichoderma* são saprófitos que compõem a microflora do solo, sendo amplamente utilizados em todo mundo como agentes de controle biológico (Silva et al., 2019). O ensaio de antagonismo pela técnica da cultura pareada demonstrou que todas as linhagens possuem potencial para biocontrole dos fitopatógenos confrontados. Na Tabela 3 estão demonstradas as taxas de inibição de crescimento micelial dos fitopatógenos.

Podemos observar que quatro linhagens de *Trichoderma* (T1, T4, T6 e T7) foram eficientes contra *C. theobromicola* (Figura 13), porém, todas apresentaram

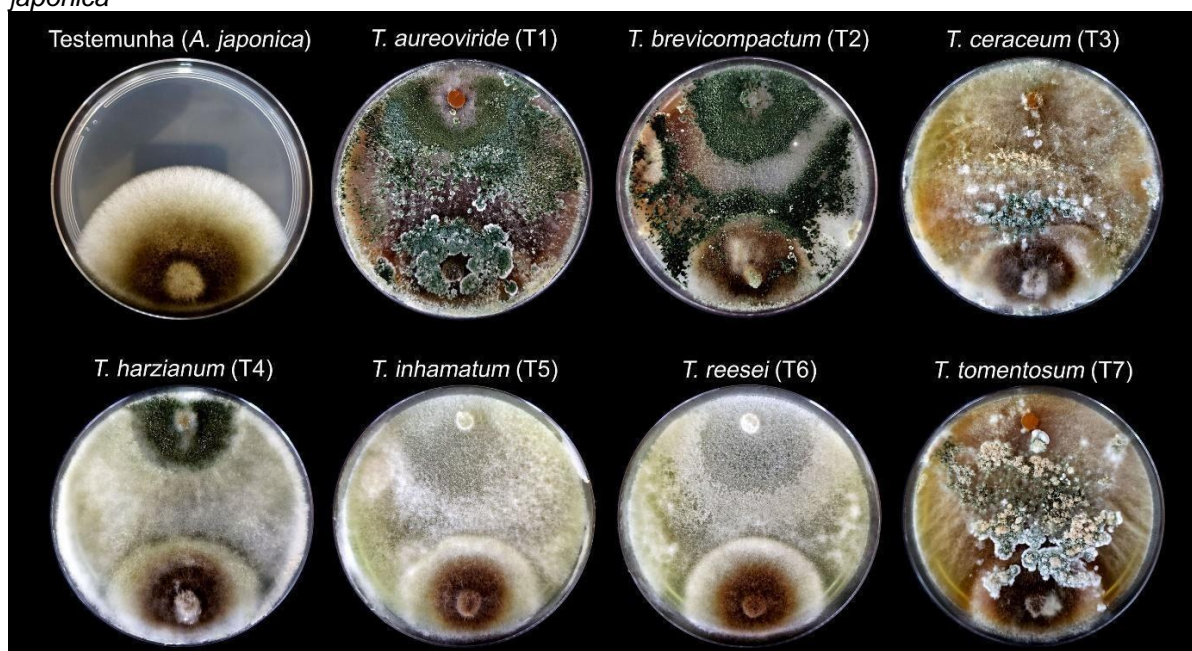
taxas de inibição acima de 50% (Tabela 7). No ensaio contra *A. japonica* (Figura 14), as linhagens *T. tomentosum* (T7) e *T. aureoviride* (T1) foram as que mais se destacaram, com taxas de inibição de 64,46 e 59,98%, respectivamente. Em relação à escala de Bell (Tabela 7), os valores obtidos variaram entre 1 e 2, o que confirma que todas as linhagens possuem potencial para serem usadas no biocontrole destes fitopatógenos.

Figura 13 - Atividade antagonista de *Trichoderma* spp. pela técnica da cultura pareada contra *Colletotrichum theobromicola*



Fonte: A autora

Figura 14 - Atividade antagonista de *Trichoderma* spp. pela técnica da cultura pareada contra *Alternaria japonica*



Fonte: A autora

Tabela 7 - Percentual (%) de inibição (média  $\pm$  desvio padrão) de crescimento micelial de fitopatógenos de cebolinha e couve frente *Trichoderma* spp. através da técnica da cultura pareada

Tratamentos	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	Bell	<i>Alternaria japonica</i>	Bell*
Testemunha	0 d	-	0 e	-
<i>T. aureoviride</i> P5B	63,39 $\pm$ 2,39 a	2	59,98 $\pm$ 1,23 ab	1
<i>T. brevicompactum</i> P16D2	57,45 $\pm$ 0,62 bc	2	56,50 $\pm$ 1,23 b	2
<i>T. ceraceum</i> P7D	55,07 $\pm$ 2,85 c	2	45,84 $\pm$ 2,50 d	2
<i>T. harzianum</i> P14A	61,04 $\pm$ 2,80 ab	2	46,49 $\pm$ 1,51 d	2
<i>T. inhamatum</i> P21C	57,25 $\pm$ 1,08 bc	2	50,41 $\pm$ 0,00 c	2
<i>T. reesei</i> P27B2.3	60,02 $\pm$ 1,76 ab	2	48,45 $\pm$ 2,50 cd	2
<i>T. tomentosum</i> P14C2	58,58 $\pm$ 1,83 bc	2	63,46 $\pm$ 2,13 a	1,5
<b>CV (%)</b>	<b>3,73</b>	-	<b>3,60</b>	-

Escala de Bell. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). CV - Coeficiente de variação

O gênero *Trichoderma* têm grande potencial para ser usado como biocontrole, pois produz enzimas que degradam as paredes celulares de outros fungos, além de substâncias antifúngicas (antibióticos), e suas diversas táticas de sobrevivência os tornam extraordinariamente competitivos no ambiente (Bononi et al., 2020).



As taxas de inibição do crescimento micelial de fitopatógenos são bastante variáveis quando se utiliza diferentes linhagens de *Trichoderma*, sendo que algumas linhagens podem exercer antagonismo sobre determinados fitopatógenos e não inibir o crescimento de outros, como observado no estudo de Chagas Junior et al. (2018) em ensaio contra *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* sp.

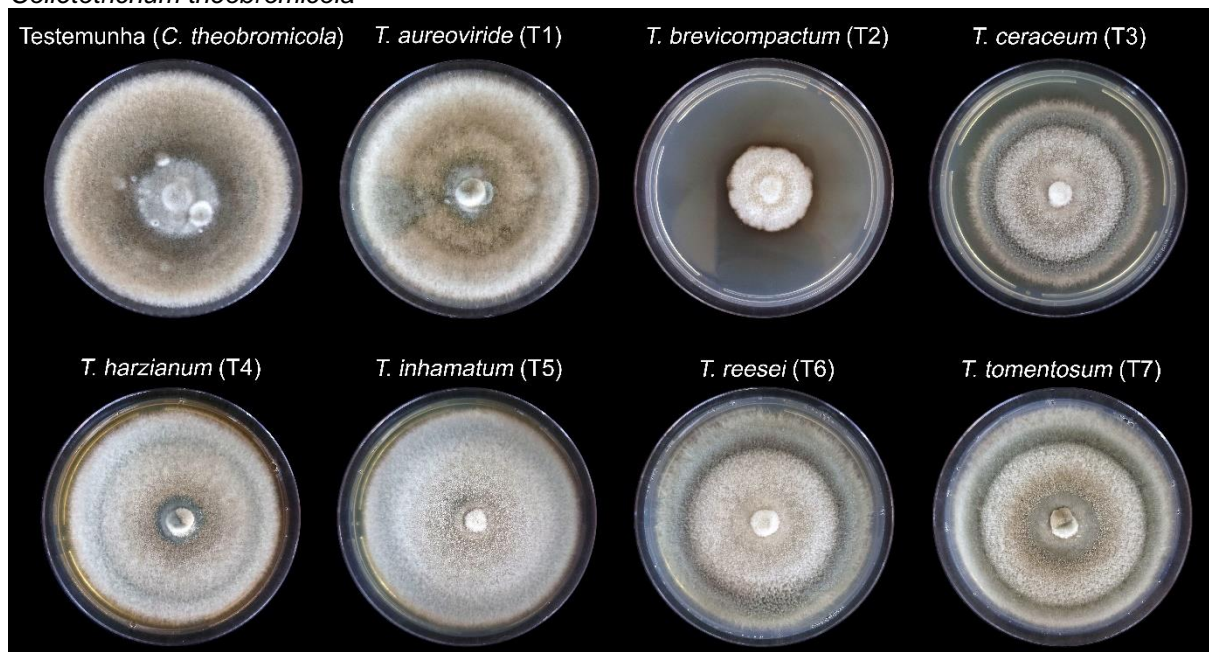
Costa et al. (2019) também obtiveram resultados promissores avaliando o antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose em *Euterpe precatoria*. Aoyagi e Doi (2021) observaram antagonismo de 100% em estudo com *T. harzianum* contra *F. oxysporum* e *B. cinerea*.

Além do antagonismo, Martínez-Martínez et al. (2020) observaram que as duas linhagens de *T. harzianum* testadas contra *F. solani*, *S. rolfsii* e *Macrophomina phaseolina* também promoveram aumentos na produção de vagens, comprimento da raiz e rendimento de grão-de-bico, o que diferiu do estudo de Azevedo et al. (2020), onde as linhagens de *Trichoderma* spp. utilizadas apresentaram efeito *antagonista in vitro* mas não controlaram *F. oxysporum* e *F. solani* e nem promoveram o crescimento do grão-de-bico em estudo *in vivo*. Esses resultados destacam a importância de estudos *in vitro*, pois são imprescindíveis para se conseguir uma linhagem com potencial para ser empregada no controle biológico de fitopatógenos.

#### 5.5.2. Antagonismo por metabólitos não voláteis

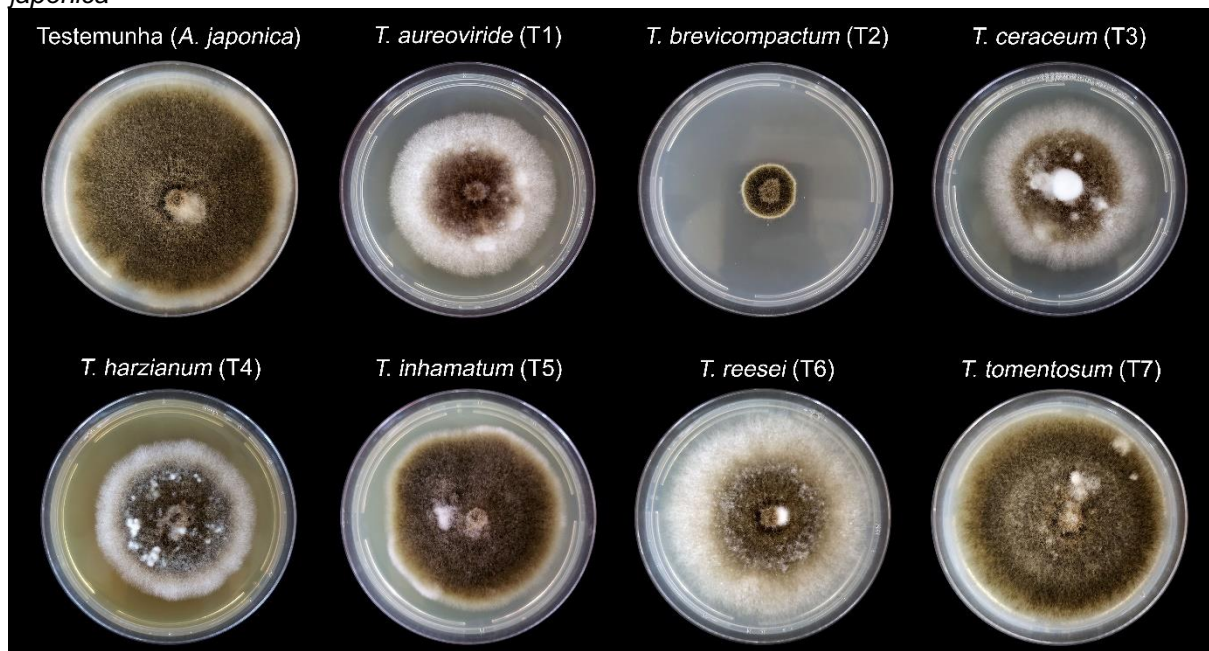
Na Tabela 8 estão dispostos os resultados do experimento de atividade antagonista de metabólitos não voláteis (Figuras 15 e 16). Apenas a linhagem *T. brevicompactum* (T2) foi eficiente contra os fitopatógenos, promovendo taxas de inibição de crescimento micelial em relação à testemunha acima de 60% (Tabela 8).

Figura 15 - Atividade antagonista dos metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum theobromicola*



Fonte: A autora

Figura 16 - Atividade antagonista dos metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. contra *Alternaria japonica*



Fonte: A autora

Tabela 8 – Percentual (%) de inibição (média ± desvio padrão) de crescimento micelial de fitopatógenos de cebolinha e couve frente *Trichoderma* spp. através da técnica de metabólitos não voláteis

Tratamentos	<i>C. theobromicola</i>	<i>A. japonica</i>
Testemunha	0 e	0 f
<i>T. aureoviride</i> P5B	1,55 ± 0,71 de	9,96 ± 0,19 e
<i>T. brevicompactum</i> P16D2	65,08 ± 0,56 a	74,2 ± 0,79 a
<i>T. ceraceum</i> P7D	4,40 ± 0,68 c	18,98 ± 0,96 c
<i>T. harzianum</i> P14A	7,29 ± 0,96 b	25,02 ± 0,59 b
<i>T. inhamatum</i> P21C	3,33 ± 0,66 c	13,46 ± 0,41 d
<i>T. reesei</i> P27B2.3	2,94 ± 0,88 cd	0,16 ± 0,17 f
<i>T. tomentosum</i> P14C2	4,32 ± 0,81 c	0,45 ± 0,60 f
<b>CV (%)</b>	<b>6,42</b>	<b>3,15</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). CV - Coeficiente de variação

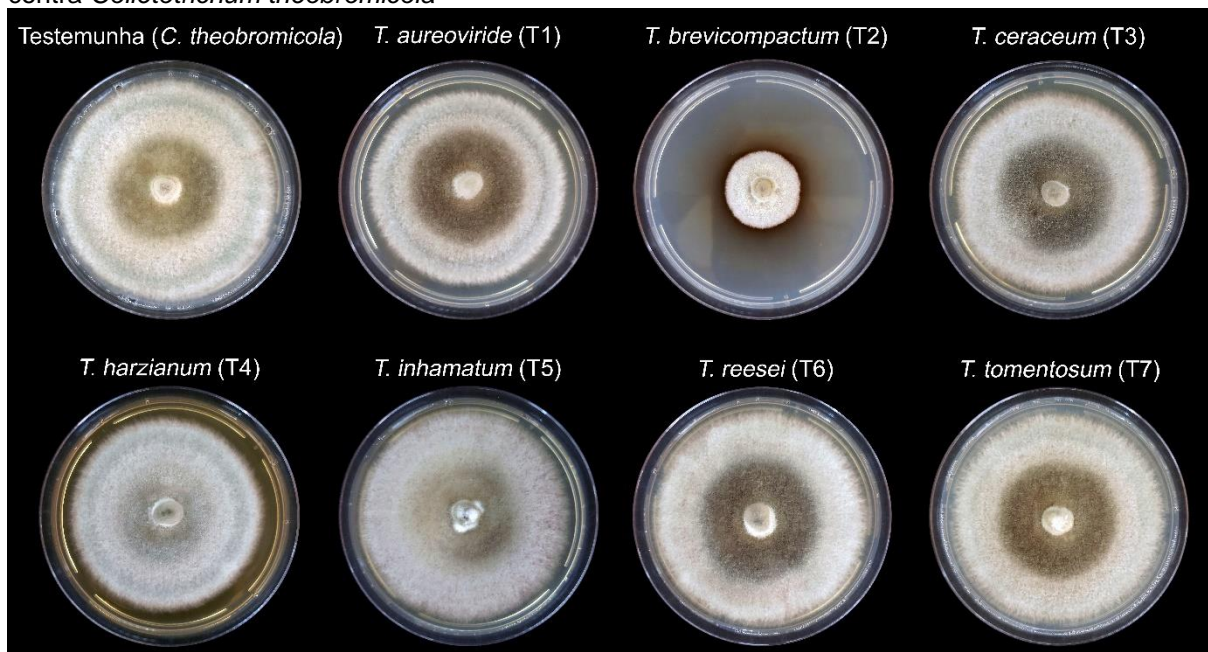
Além do confronto direto, os testes com o secretoma de linhagens de *Trichoderma* spp. têm demonstrado resultados promissores em estudos como o de Rodrigues et al. (2018) contra *Ceratocystis cacaofunesta*, onde foram obtidas altas taxas de inibição de germinação de esporos e formação de peritécios, utilizando o extrato.

Segundo Khan et al. (2020), espécies do gênero *Trichoderma* secretam uma infinidade de metabólitos secundários, que podem ser voláteis ou não, e enzimas hidrolíticas, que juntos garantem o sucesso na funcionalidade antifúngicas contra fitopatógenos, devido a ação de antibiose. Ainda de acordo com Khan et al. (2020), dentre os diferentes grupos dos metabólitos, é possível citar terpenos, pironas, gliotoxinas, gliovirina, peptaibols, proteases, entre outros, que causam degradação das membranas e proteínas da parede celular do patógeno, afetando diretamente no metabolismo, integridade e funcionalidade dos patógenos, refletindo em disfunção no crescimento micelial e esporulação.

### 5.5.3. Antagonismo por metabólitos não voláteis termoestáveis

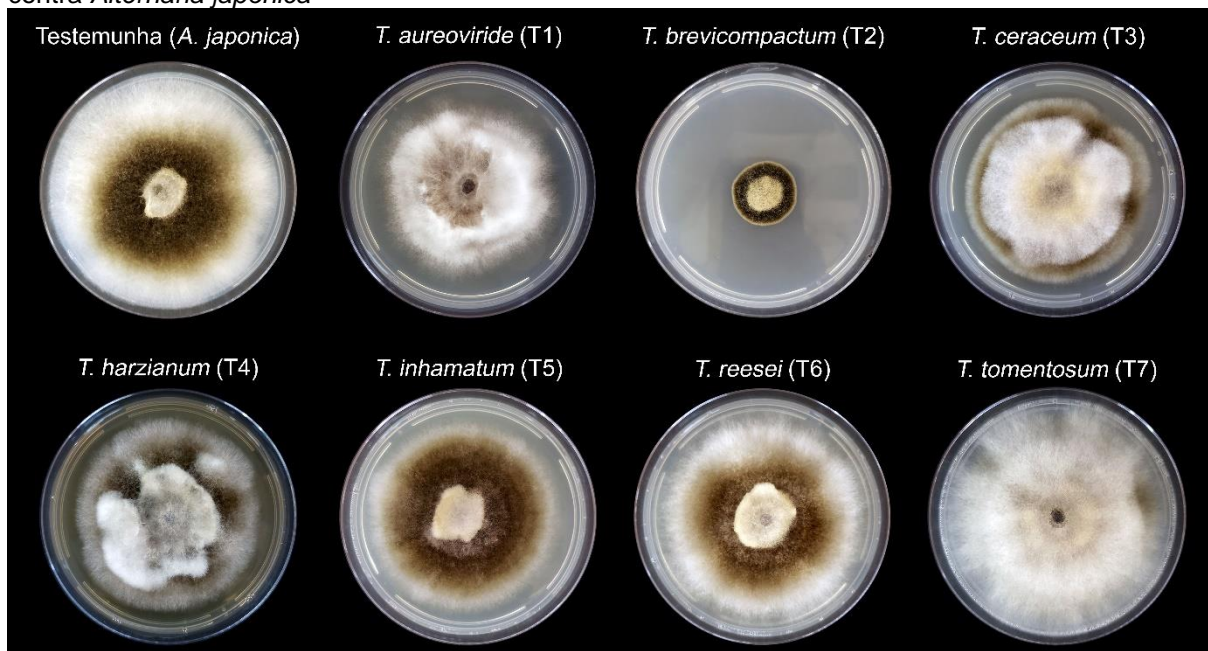
No ensaio de antagonismo através de metabólitos não voláteis termoestáveis (Figuras 17 e 18), apenas a linhagem *T. brevicompactum* (T2) apresentou atividade, também com taxas de inibição acima de 60% contra os fitopatógenos testados (Tabela 9).

Figura 17 - Atividade antagonista dos metabólitos não voláteis termoestáveis de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum theobromicola*



Fonte: A autora

Figura 18 - Atividade antagonista dos metabólitos não voláteis termoestáveis de *Trichoderma* spp. contra *Alternaria japonica*



Fonte: A autora

Tabela 9 – Percentual (%) de inibição (média  $\pm$  desvio padrão) de crescimento micelial de fitopatógenos de cebolinha e couve frente *Trichoderma* spp. através da técnica de metabólitos não voláteis termoestáveis

Tratamentos	<i>C. theobromicola</i>	<i>A. japonica</i>
Testemunha	0 d	0 f
<i>T. aureoviride</i> P5B	5,16 $\pm$ 1,61 c	5,67 $\pm$ 1,18 d
<i>T. brevicompactum</i> P16D2	65,49 $\pm$ 1,02 a	70,40 $\pm$ 0,67 a
<i>T. ceraceum</i> P7D	9,66 $\pm$ 1,28 b	14,97 $\pm$ 0,43 b
<i>T. harzianum</i> P14A	8,64 $\pm$ 1,42 b	9,92 $\pm$ 1,30 c
<i>T. inhamatum</i> P21C	2,64 $\pm$ 1,19 cd	9,26 $\pm$ 1,11 c
<i>T. reesei</i> P27B2.3	2,71 $\pm$ 2,01 cd	2,60 $\pm$ 0,76 e
<i>T. tomentosum</i> P14C2	0,76 $\pm$ 1,10 d	1,94 $\pm$ 1,27 ef
<b>CV (%)</b>	<b>11,12</b>	<b>6,59</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). CV - Coeficiente de variação

A termoestabilidade se refere à capacidade de um organismo em manter sua estrutura e atividade biológica frente a condições de temperatura elevadas. Os fungos do gênero *Trichoderma* são reconhecidos por possuir capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperaturas e por resistir em condições adversas (Singh et al., 2014; Daryaei et al., 2016; Carro-Huerta et al., 2021).

A termoestabilidade é uma característica importante, pois permite que esses fungos mantenham sua atividade biológica mesmo em condições de calor variáveis. Essa capacidade pode ser explorada em aplicações agrícolas, onde culturas de importância econômica estão expostas a condições de estresse térmico, e o uso de fungos desse gênero os torna escolhas valiosas no manejo integrado de pragas e doenças nas lavouras, especialmente em regiões de clima quente como na região Amazônica.

Porém, é importante levar em consideração que diferentes espécies de *Trichoderma* podem apresentar variabilidade na termoestabilidade e a eficácia do controle biológico pode depender da compatibilidade entre espécies de *Trichoderma* a serem utilizados frente a um fitopatógeno alvo, incluindo a compatibilidade com outros microrganismos antagonistas e também as condições ambientais de aplicação (Wong; Mead; Croft, 2002; Da Costa et al., 2021; Metz; Hausladen, 2022; Lezama et al., 2023). Portanto, ao utilizar fungos desse gênero como agentes de controle biológico, é de importância fundamental compreender as características biológicas da espécie específica para maximizar a eficiência, tanto *in vitro* quanto em campo.

## 6. CONCLUSÃO

Todas as linhagens testadas possuem potencial para uso no controle biológico dos fitopatógenos confrontados, tendo a linhagem *T. brevicompactum* P16D2 se destacado nos três experimentos, necessitando de estudos mais aprofundados para determinação do uso em campo.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDEL-MAGEED, H. M. et al. Biotechnology approach using watermelon rind for optimization of  $\alpha$ -amylase enzyme production from *Trichoderma virens* using response surface methodology under solid-state fermentation. **Folia Microbiologica**, v. 67, n. 2, p. 253-264, 2021.

ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. O gênero *Trichoderma*. MEYER, M.; MAZARO, S.; SILVA, J. *Trichoderma: uso na agricultura*. Primeira Edição. Brasília, DF. EMBRAPA, p. 163-180, 2019.

ABUHENA, Md. et al. A stressing method for producing high-density *Trichoderma* spores in a dual-layer by utilizing a starch-based medium in a reconditioning approach. **Bioresource Technology Reports**, v. 19, p. 1-13, 2022.

AGRIOS, G. N. 2005. Plant Pathology. Plant diseases. Elsevier, Academic Press, Califórnia, 5 ed. 921p.

AGROVEL. 2015 Disponível em: <http://www.agrov.com/vegetais/hortalicas/cebolinha.htm> Acesso em: 29.07.2023.

ALI, A. The competitive potential of different *Trichoderma* spp. to control rhizoctonia root rot disease of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Egyptian Journal of Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 136-150, 2021.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. Â. V.; MAFIA, R. G. Produção, determinação e calibração da concentração de inóculo em suspensão. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, p. 103-116, 2007.

ALMEIDA, D. Manual de culturas hortícolas. Lisboa: Presença, 2006.

AMORIM, L. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres, 2016. v. 2, 810p.

ANDRÉS, P. A. et al. A comparative study of different strains of *Trichoderma* under different conditions of temperature and pH for the control of *Rhizoctonia solani*. **Agricultural Sciences**, v. 13, n. 06, p. 702-714, 2022.

AOYAGI, L. N.; DOI, S. M. O. Avaliação da atividade antagonista de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 3234-3239, 2021.

APHORTESP. Couve-manteiga. Associação dos Produtores e Distribuidores de Hortifruti do Estado de São Paulo. 2016. Disponível em <http://www.aphortesp.com.br/index.php/ct-menu-item-11/12-produtos/55-couve-manteiga>. Acesso em: 29.07.2023

ARAÚJO NETO, S. E. et al. Plantio direto de cebolinha sobre cobertura vegetal com efeito residual da aplicação de composto orgânico. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1206-1209, 2010.

AZEVEDO, D. M. Q. et al. Antagonistic effect of *Trichoderma* isolates and its metabolites against *Fusarium solani* and *F. oxysporum* in chickpea. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 36344-36361, 2020.

BALA, I-A. et al. Effects of blue-light laser irradiation on the enzymatic activities and sporulation of *Trichoderma atroviride* grown on rice husks. **Applied Sciences**, v. 13, n. 16, p. 1-16, 2023.

BATISTA FILHO, A. **Controle biológico de insetos e ácaros**. São Paulo, Instituto biológico de São Paulo, 2006. 86p.

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.

BONONI, L. et al. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

BRAGA JUNIOR, G. M. et al. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* *in vitro*. **Biota Amazônia**, v.7, n. 3, p. 45-51, 2017.

BRAINER, M. S. C. P. Informe setorial de hortaliças. Ano 4, nº 205. 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade**. Brasília, DF, 19 nov. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>. Acesso em: 24 de agosto de 2022.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade. Brasília, DF, 19 nov. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>. Acesso em: 24 de agosto de 2022.

BRITO, S. Tecnologia prioritária para o controle da *Spodoptera frugiperda* na África é tema de capacitação na Embrapa. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/45085724/tecnologia-prioritaria-para-o-controle-da-spodoptera-frugiperda-na-africa-e-tema-de-capacitacao-na-embrapa>. Acesso em: 20 nov. 22.

CANNON, P. et al. *Lectera*, a new genus of the Plectosphaerellaceae for the legume pathogen *Volutella colletotrichoides*. **Myckeys**, v. 3, p. 23-36, 2012.

CARBONI, R. C. D. Complexos de espécies de *Colletotrichum* associados aos citros e a outras frutíferas no Brasil. 2018.

CARRO-HUERGA, G. et al. The influence of temperature on the growth, sporulation, colonization, and survival of *Trichoderma* spp. in grapevine pruning wounds. **Agronomy**, v. 11, n. 9, p. 1-18, 2021.



CARVALHO, D. D. C. et al. *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro comum. In: Seminário Jovens Talentos, 4., 2010, Santo Antônio de Goiás. **Resumos apresentados**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2010, p. 47.

CARVALHO, C.; KIST, B. B. **Anuário Brasileiro de Hortaliças 2017**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016, 56 p.

CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. 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.

CLEMENT, C. R. et al. **Utilização e conservação de recursos genéticos de espécies hortícolas, frutíferas e medicinais por comunidades do Alto Amazonas**. In: I Encontro de Etnobiologia e Etnoecologia da Região Norte, Etnoconservação e Ética: Dialogando entre os Sabers, 2001, Manaus, AM. Anais do I Encontro de Etnobiologia e Etnoecologia da Região Norte. Manaus, AM: Soc. Bras. Etnobiologia e Etnoecologia - SBEE, Núcleo de Estudos Rurais e Urbanos Amazônicos - NERUA, 2001.

CNA. Confederação Nacional da Agricultura. PIB do Agronegócio avança no trimestre e acumula alta de 9,81% no primeiro semestre de 2021. CNA, 13 de setembro de 2021. Disponível

CNA. Confederação Nacional da Agricultura. Panorama do Agro. Disponível em: <https://cnabrasil.org.br/cna/panorama-do-agro>. Acesso em: 31 de agosto de 2022.

CONAFER. Confederação Nacional de Agricultores Familiares e Empreendedores Familiares Rurais. Agricultores familiares são os maiores produtores de hortaliças e frutas do Brasil. Disponível em: <https://conaferr.org.br/agricultores-familiares-sao-os-maiores-produtores-de-hortalicas-e-frutas-do-brasil/>. Acesso em: 31 de agosto de 2022.

COSTA JUNIOR, O. Cebolinha: Para que serve, valor nutricional, benefícios, malefícios e dicas. 2022. Disponível em: <https://www.saudedica.com.br/cebolinha/>. Acesso em: 29 jul. 2023.

DA COSTA, A. C. et al. Potential of *Trichoderma piluliferum* as a biocontrol agent of *Colletotrichum musae* in banana fruits. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 1-7, 2021.

DA COSTA, K. K. et al. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose de *Euterpe precatoria*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 1, 2019.

DA SILVA, L. L. et al. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1891-1904, 2020.

DARYAEI, A. et al. Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 999-1009, 2016.

DE MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Ceres, 2018. p. 261-272.

DE MEDEIROS, F. H. V. et al. *Trichoderma*: interações e estratégias. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; DA SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. 538 p., 2019.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 3, p. 363-369, 1971.

DHAVER, P. et al. Optimization, purification, and characterization of xylanase production by a newly isolated *Trichoderma harzianum* strain by a two-step statistical experimental design strategy. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2022.

DRISCOLL, A. O. **Diseases of vegetable brassicas**. Kenilworth: AHDB Horticulture, 2020, 53p.

ELKHATEEB, W. A. et al. Biotechnology and environmental applications of *Trichoderma* spp. **Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 13, n. 3, p. 149-157, 2021.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tem Ciência no seu Alimento. Hortaliças em Revista, Brasília - DF, n. 25, p. 4-22, 01 maio 2018. Quadrimestral. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1102128> Acesso em: 09/06/2023.

FANTINEL, V. S. et al. First report of *Colletotrichum siamense* causing anthracnose on *Acca sellowiana* fruits in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 6, 1035-1035, 2017.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. 2012. The State of Food and Agriculture. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i3028e/i3028e.pdf>. Acesso em: 09/06/2023.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Pesticides use and trade 1990–2021. **Faostat Analytical Briefs**. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc6958en/cc6958en.pdf>. Acesso em: 09/06/2023.

FELIPE, M. T. et al. A importância da liofilização na preservação de espécies do gênero *Aspergillus* de interesse biotecnológico. **Revista UNINGÁ Review**, v. 34, n. 2, p. 1-15, 2019.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo Mundo de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

FILGUEIRA, F. A. R. 2008. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. UFV: Viçosa, 421p.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: P. KUBICEK, C.; E. HARMAN, Gary. **Trichoderma and Gliocladium Volume 1: basic biology, taxonomy and genetics**. London: Taylor & Francis E-Library, 1998, 300p.

GHAZANFAR, M. U.; RAZA, M.; RAZA, W. Effect of physiological parameters on mass production of *Trichoderma* species. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 59-65, 2018.

GU, X. et al. Four new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* clade from northern China. **Myckeys**, v. 73, p. 109-132, 2020.

GÜÇLÜ, T.; ÖZER, N. *Trichoderma harzianum* antagonistic activity and competition for seed colonization against seedborne pathogenic fungi of sunflower. **Letters In Applied Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1027-1035, 2022.

HALIFU, S. et al. Effects of Two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* annual seedlings. **Forests**, v. 10, n. 9, p. 1-17, 2019.

HANKIN, L; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n.3, p. 597-607, 1975.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E. et al. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 529-546, 2021.

HEREDIA, N. A. et al. Produção e renda bruta de cebolinha e de salsa em cultivo solteiro e consorciado. **Horticultura Brasileira**, v.21, n. 3, p. 574-577. 2003.

HORTALIÇAS, EMBRAPA. Patrimônio Vegetal. Hortaliças em Revista, n. 28, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag\\_2022\\_mar.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2022_mar.pdf). Acesso em: 20 de novembro de 2022.

IDAM. Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas. Disponível em: <http://www.idam.am.gov.br/wp-content/uploads/2014/01/RAIDAM2012.pdf>. Acesso em: 20 de novembro de 2022.

IDAM. Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas. Disponível em: <http://www.idam.am.gov.br/wp-content/uploads/2018/05/RAIDAM2017.pdf>. Acesso em: 20 de novembro de 2022.

IDAM. Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas. Disponível em: <http://www.idam.am.gov.br/wp-content/uploads/2020/07/RAIDAM2021-Versao-final.pdf>. Acesso em: 20 de novembro de 2022.

IDAM. Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas. Disponível em: <http://www.idam.am.gov.br/wp-content/uploads/2020/07/RAIDAM2022-Versao-Final.pdf>. Acesso em: 20 de novembro de 2022.

ISAIAS, C. O. et al. Ação antagonica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.1, p.34-41, 2014.

JACQUES, S. et al. An optimized sporulation method for the wheat fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. **Plant Methods**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2021.

J.U.T., FREITAS, P.S.L., BERIAN, L.O.S., and GOTO, R., comps. Hortaliças-fruto [online]. Maringá: EDUEM, 2018, pp. 271-313. ISBN: 978-65-86383-01-0. <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0010>.

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. Principais doenças de anonáceas no Brasil: descrição e controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 55-64, 2014.

KANEKO, M. G. Produção de coentro e cebolinha em substratos regionais da Amazônia à base de madeira em decomposição (paú). 2006.

KASHYAP, P. L. et al. *Trichoderma* for climate resilient agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 1-18, 2017.

KHAN, R. A. A. et al. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 1-22, 2020.

KUBICEK, C. P. et al. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. **Bmc Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-24, 2019.

KUMAR, K. et al. Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 137-144, 2011.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LARA, S. S. et al. A agricultura do agronegócio e sua relação com a intoxicação aguda por agrotóxicos no Brasil. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 32, p. 1-19, 2019.

LAWRENCE, D. P. et al. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. **Mycologia**, v. 105, n. 3, p. 530-546, 2013.

LAWRENCE, D. P.; ROTONDO, F.; GANNIBAL, P. B. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. **Mycological Progress**, v. 15, n. 1, pág. 1-22, 2016.

LEITE, P. Benefícios da Cebolinha – Para que serve e como usar. Mundo Boa Forma 23, dezembro, 2020 Disponível em: <https://www.mundoboforma.com.br/beneficios-da-cebolinha/> Acesso em: 29.07.2023

LEZAMA, C. P. et al. *In vitro* study of the compatibility of four species of *Trichoderma* with three fungicides and their antagonistic activity against *Fusarium solani*. **Horticulturae**, v. 9, n. 8, p. 1-14, 2023.

LIU, B. et al. Isolation of *Trichoderma* in the rhizosphere soil of *Syringa oblata* from Harbin and their biocontrol and growth promotion function. **Microbiological Research**, v. 235, p. 1-10, 2020.

LOC, N. H. et al. Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. **Mycology**, v. 11, n. 1, p. 38-48, 2019.

MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. et al. The interactions of *Trichoderma* at multiple trophic levels: inter-kingdom communication. **Microbiological Research**, v. 240, p. 1-15, 2020.

Maestrovirtuale. Liliaceae: características, habitat, espécies representativas, usos. Disponível em: <http://maestrovirtuale.com/liliaceae-caracteristicas-habitat-especiesrepresentativas-usos>. Acesso em: 29.07.2023

MARINGONI, A. C.; SILVA JÚNIOR., T. A. F. Doenças das Brássicas Crucíferas (brócolis, couve, couve chinesa, rabanete, repolho e rúcula). In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de Fitopatologia. Ouro Fino: CERES, 2016. v. 2, p.165-173.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, T. O. et al. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 11, n. 5, p. 1135-1147, 2020.

MATAS-BACA, M. Á. et al. Morphological and molecular characterization of a new autochthonous *Trichoderma* sp. isolate and its biocontrol efficacy against *Alternaria* sp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 2620-2625, 2022.

MATTOO, A. J.; NONZOM, S. Investigating diverse methods for inducing sporulation in endophytic fungi. **Studies In Fungi**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2022.

MELLO, S. C. M. et al. Controle de Doenças de Plantas. Controle Biológico de Pragas na Agricultura. Brasília–DF: EMBRAPA, 2020.

MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 2, 1976.

METZ, N.; HAUSLADEN, H. *Trichoderma* spp. As potential biological control agent against *Alternaria solani* in potato. **Biological Control**, v. 166, p. 1-10, 2022.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. **Trichoderma: Uso na Agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, p. 181-199, 2019.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, 341p.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W.; JÚNIOR, T. J. P. Controle biológico de doenças em plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JÚNIOR, W. C. J.; RODRIGUES, F. A. **O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas**. 22 ed., Viçosa, MG: UFV, DFP, 2014. p. 177- 225.

MORENO-RUIZ, D. et al. Influence of different light regimes on the mycoparasitic activity and 6-Pentyl- $\alpha$ -pyrone biosynthesis in two strains of *Trichoderma atroviride*. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1-16, 2020.

Mycobank Database, 2017. Fungal Databases, Nomencl. Species Banks. Disponível em: <http://www.mycobank.org/> (Acesso em 17 agosto de 2022).

NIETO-JACOBO, M. F. et al. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-18, 2017.

NOZAKI, M. H. et al. Controle *in vitro* de *Alternaria solani* por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Cultivando o Saber**, v. 11, n. 4, p. 9-16, 2018.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OLIVEIRA, L. L. B. et al. Influência da temperatura e radiação ultravioleta no desenvolvimento de isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 34, n. 3, p. 423-430, 2019.

OSZUST, K.; CYBULSKA, J.; FRAC, M. How do *Trichoderma* genus fungi win a nutritional competition battle against soft fruit pathogens? A report on niche overlap nutritional potentiates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1-19, 2020.

PAL, K. K.; GARDENER, B. M. Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**, v. 2, p. 1117-1142, 2006.

PASCHOLATI, S. F.; DE SOUZA, V. H. M.; CARDOSO FILHO, J. A. Indução de resistência por *Trichoderma*. **Trichoderma: Uso na Agricultura**; Embrapa Soja: Brasília, Brazil, v. 1, p. 235-254, 2019.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc. 491p., 2002.

RAJPUT, A. Q.; KHANZADA, M. A.; SHAHZAD, S. Effect of different organic substrates and carbon and nitrogen sources on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Agriculture, Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 731-745, 2014.

REIS FILGUEIRA, F. A. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Universidade Federal de Viçosa, 2000.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, n. 2, p. 265-270, 1950.

RIHANI, A.; SOUMATI, B. Extracellular lipase production by *Trichoderma harzianum* isolated from oil contaminated soil. **Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry**, v. 20, n. 1, p. 11-19, 2019.

RODRIGUES, G. S. et al. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da murcha de *Ceratocystis* em cacauieiro. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 72-78, 2018.

RUFFATTO, K.; ZIEM, J. H.; MACIEL, M. J. Avaliação da viabilidade de células fúngicas em diferentes tipos de armazenamento. **Revista Estudo & Debate**, v. 28, n. 2, p. 7-17, 2021.

SAKR, N. Evaluation of two storage methods for fungal isolates of *Fusarium* sp. and *Cochliobolus sativus*. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 53, n. 1, p. 11-18, 2018.

SENANAYAKE I. C. et al. Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. **Mycosphere**, v. 11, n. 1, p. 2678-2754, 2020.

SILVA, L. L. et al. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1891-1904, 2020.

SILVA, R. N. et al. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. **Fungal Biology**, v. 123, n. 8, p. 565-583, 2019.

SINGH, A. et al. Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. **Virology and Mycology**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2014.

SUN, Y. et al. Extracellular protease production regulated by nitrogen and carbon sources in *Trichoderma reesei*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 122-132, 2021.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Doenças fúngicas da batata. In: MERENDA, A. M. C. M. PITELLI (Org.). **Batata: Desafios Fitossanitários e Manejo Sustentável**, Jaboticabal, 2017, p. 123-152.

TÖFOLI, J. G., DOMINGUES R.J., ZANOTTA, S. Doenças Fúngicas da Batata. In: SALAS, F. J. S.; TÖFOLI, J. G. **Cultura da batata: pragas e doenças**. Instituto Biológico, p. 162-208, 2017.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **O Biológico**, v. 77, n. 1, p. 21-34, 2015.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Doenças fúngicas. In: BRANDÃO FILHO, J. U. T.; FREITAS, P. S. L.; BERIAN, L. O. S.; GOTO, R. comps. *Hortaliças-fruto* [online]. Maringá: EDUEM, 2018, pp. 271-313. ISBN: 978-65-86383-01-0. <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0010>.

TOGHUEO, R. M. K. et al. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. **South African Journal of Botany**, v. 109, n. 3, p. 146-153, 2017.

VIDAL, M. F.; XIMENES, L. F. Comportamento recente da fruticultura nordestina: área, valor da produção e comercialização. 2016.

VIEIRA, A. S. et al. Caracterização molecular e morfocultural de isolados dos fungos *Colletotrichum* sp. e *Alternaria* spp., agentes causais de doenças de hortaliças em Manaus. In: Congresso Brasileiro de Micologia, 2019, Manaus. IX Congresso Brasileiro de Micologia, Manaus: Editora INPA, 2019. v. 9.

WAGHUNDE, R. R.; SHELAKI, R. M.; SABALPARA, A. N. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n. 22, 1952-1965, 2016.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies In Mycology**, v. 73, p. 115-180, 2012.

WILLERDING, A. L. et al. Estratégias para o desenvolvimento da bioeconomia no estado do Amazonas. **Estudos Avançados**, v. 34, p. 145-166, 2020.



WONG, P. T. W.; MEAD, J. A.; CROFT, M. C. Effect of temperature, moisture, soil type and *Trichoderma* species on the survival of *Fusarium pseudograminearum* in wheat straw. Australasian **Plant Pathology**, v. 31, n. 3, p. 253-257, 2002.

WOO, S. L. et al. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, p. 71-126, 2014.

WOUDENBERG, J. H. C. Large-spored *Alternaria* pathogens in section Porri disentangled. **Studies In Mycology**, v. 79, n. 1, p. 1-47, 2014.

XIANG, J.; WANG, X.; SANG, T. Cellulase production from *Trichoderma reesei* RUT C30 induced by continuous feeding of steam-exploded *Miscanthus lutarioriparius*. **Industrial Crops and Products**, v. 160, p. 1-8, 2021.

YOU, J. et al. Biological control and plant growth promotion by volatile organic compounds of *Trichoderma koningiopsis* T-51. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 1-11, 2022.

ZANIN, T. 11 benefícios da couve e como consumir (com receitas saudáveis). 2023. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/couve/>. Acesso em: 29 jul. 2023.

ZIN, N. A.; BADALUDDIN, N. A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 2, p. 168-178, 2020.

## 8. ANEXOS

**Anexo 1** - Análise de variância do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Trichoderma* spp. em meio AFA

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	P
Tratamentos	6	1,254924	0,209154	2,423	0,0809 <sup>ns</sup>
Erro	14	1,208600	0,086329		
Total corrigido	20				
CV (%)	1,83				
Média geral	16,0347619	Número de observações		21	

<sup>ns</sup> Efeito não significativo ( $p > 0,05$ ); CV – coeficiente de variação

**Anexo 2** - Análise de variância do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Trichoderma* spp. em meio BDA

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	P
Tratamentos	6	8,694457	1,449076	29,172	0,0000*
Erro	14	0,695200	0,049657		
Total corrigido	20				
CV (%)	1,43				
Média geral	15,5885714	Número de observações		21	

\*Efeito significativo de 5% ( $p < 0,05$ ); CV – coeficiente de variação

**Anexo 3** - Análise de variância do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Trichoderma* spp. em meio AFM

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	P
Tratamentos	6	0,248895	0,041483	6,870	0,0015*
Erro	14	0,084533	0,006038		
Total corrigido	20				
CV (%)	0,49				
Média geral	15,9371429	Número de observações		21	

\*Efeito significativo de 5% ( $p < 0,05$ ); CV – coeficiente de variação

**Anexo 4** - Análise de variância da esporulação de *Trichoderma* spp. em três meios de cultura

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	P
Fungos	6	1.092136488E+0009	182022748.004410	68.558	0,0000*
Meios	2	683076630.002085	341538315.001043	128.639	0,0000*
Fungos x Meios	12	171398183.601402	14283181.966784	5.380	0,0000*
Erro	42	111510598.433079	2655014.248407		
Total corrigido	62	2.058121900E+0009			
CV (%)	17,68				
Média geral	9217,2871572	Número de observações		21	

\*Efeito significativo de 5% ( $p < 0,05$ ); CV – coeficiente de variação

**Anexo 5** - Análise de variância do ensaio de cultura pareada de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum theobromicola*

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	P
Tratamentos	7	12353,475747	1764,782250	476,148	0,0000*
Erro	24	88,952925	3,706372		
Total corrigido	31	12442,428672			
CV (%)	3,73				
Média geral	51,5990625	Número de observações		32	

\*Efeito significativo de 5% ( $p < 0,05$ ); CV – coeficiente de variação

**Anexo 6** - Análise de variância do ensaio de cultura pareada de *Trichoderma* spp. contra *Alternaria japonica*

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	P
Tratamentos	7	11004,845097	1572,120728	563,265	0,0000*
Erro	24	66,986025	2,791084		
Total corrigido	31	11071,831122			
CV (%)	3,60				
Média geral	46,3934375	Número de observações		32	

\*Efeito significativo de 5% ( $p < 0,05$ ); CV – coeficiente de variação

**Anexo 7** - Análise de variância do ensaio de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum theobromicola*

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	P
Tratamentos	7	13444,006272	1920,572325	3776,387	0,0000*
Erro	24	12,205775	0,508574		
Total corrigido	31	13456,212047			
CV (%)	6,42				
Média geral	11,1128125	Número de observações		32	

\*Efeito significativo de 5% ( $p < 0,05$ ); CV – coeficiente de variação

**Anexo 8** - Análise de variância do ensaio de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. contra *Alternaria japonica*

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	p
Tratamentos	7	16977,349447	2425,335635	7739,172	0,0000*
Erro	24	7,521225	0,313384		
Total corrigido	31	16984,870672			
CV (%)	3,15				
Média geral	17,7790625	Número de observações		32	

\*Efeito significativo de 5% ( $p < 0,05$ ); CV – coeficiente de variação

**Anexo 9** - Análise de variância do ensaio de metabólitos não voláteis termoestáveis de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum theobromicola*

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	p
Tratamentos	7	13473,672647	1924,810378	1102,678	0,0000*
Erro	24	41,893875	1,745578		
Total corrigido	31	13515,566522			
CV (%)	11,12				
Média geral	11,8834375	Número de observações		32	

\*Efeito significativo de 5% ( $p < 0,05$ ); CV – coeficiente de variação

**Anexo 10** - Análise de variância do ensaio de metabólitos não voláteis termoestáveis de *Trichoderma* spp. contra *Alternaria japonica*

Fonte de variação	GL	SQ	QM	FC	p
Tratamentos	7	15043,603938	2149,086277	2406,968	0,0000*
Erro	24	21,428650	0,892860		
Total corrigido	31	15065,032588			
CV (%)	6,59				
Média geral	14,3443750	Número de observações		32	

\*Efeito significativo de 5% ( $p < 0,05$ ); CV – coeficiente de variação