

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIA AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMBINAÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* spp. PARA O
CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL**

RENATA ALVES DE SOUSA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JUNHO, 2019**

COMBINAÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* spp. PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL

RENATA ALVES DE SOUSA

Licenciada em Ciências Biológicas, Instituto Federal de Rondônia, 2016

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção de Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

Coorientadora: Elizabeth Amélia Alves Duarte

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

JUNHO, 2019

S725c

Sousa, Renata Alves de.

Combinação de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle da podridão vermelha do sisal / Renata Alves de Sousa. _ Cruz das Almas, BA, 2019.

63f.; il.

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

Coorientadora: Elizabeth Amélia Alves Duarte.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Sisal – Controle biológico. 2.Sisal – Doenças. 3.Semiárido – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.577

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.

Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).

Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

A **Deus**, e aos meus pais, **Antonia** e **Wilson** por tudo que são e o que fazem por mim...

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Seu amor, cuidado e misericórdia comigo até aqui e sempre. Por não ter me deixado desistir.

Aos meus pais, Antonia e Wilson, pelo amor e por acreditarem em mim.

Aos meus segundos pais, Joanita e Kilson, pelo acolhimento, cuidado e carinho na minha estadia em Cruz das Almas.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB e o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA), pela oportunidade de cursar o mestrado em Microbiologia Agrícola.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela bolsa de mestrado e auxílio ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola por meio dos editais de infraestrutura e apoio à pós-graduação.

À minha orientadora Dr.^a Ana Cristina F. Soares, pelo conhecimento transmitido, pela paciência e apoio durante o curso.

À minha coorientadora Dr.^a Elizabeth Duarte, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao prof. Aristóteles Góes-Neto, à Paula L. C. Fonseca e Luiz Marcelo R. Tomé pela colaboração na identificação molecular dos isolados de *Trichoderma*.

A todos os professores do Curso de Microbiologia Agrícola da UFRB, incluindo os pesquisadores da Embrapa, pelos conhecimentos repassados.

À toda equipe de técnicos, pós-doutorandos, doutorandos, mestrandos, ICs e estagiários do laboratório de microbiologia e fitoquímica, em especial: Lene, Thaís, Leonardo, Vanessa, Daniele, Beatriz, Wélica, Jéssica, Verônica e Carol.

À equipe de limpeza e segurança do bloco L, em especial: Dona Val, seu Geovane, Derlon, e seu Bel.

Aos meus colegas e amigos, Dri, Lore, Rao, Lucas e Milena por todas as lágrimas, alegrias e companheirismo compartilhados.

Aos amigos de longa data pelo apoio: Bruninha, Pedro, Josi, Tainá e Nuno.

Ao seu Duda, melhor moto-táxi da cidade, que me ajudou com tanto “sobe e desce” UFRB-Embrapa, principalmente, e claro, pela amizade.

Minha gratidão sincera e eterna a cada pessoa que fez parte dessa jornada. Acredito que são anjos em forma de pessoas que Deus coloca em nossas vidas e sem esses anjos, eu não teria conseguido. Muito obrigada de todo meu coração!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

ÍNDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO I.....	13
A cultura do sisal (<i>Agave sisalana</i> Perrine).....	14
<i>Aspergillus welwitschiae</i> e a podridão vermelha do sisal.....	16
<i>Trichoderma</i> spp.: aspectos gerais, e aplicações no biocontrole	17
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO II.....	32
Resumo.....	33
SOUSA, R. A. Combining <i>Trichoderma</i> spp. isolates for controlling sisal bole rot disease	34
Abstract.....	34
1. Introdução	34
2. Material e Métodos	36
3. Resultados	43
4. Discussão	54
5. Conclusões	57
Referências	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63

RESUMO

SOUSA, R. A. Combinação de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle da podridão vermelha do sisal. Cruz das Almas, 2019. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma cultura de grande relevância para o semiárido da Bahia, alicerçada na extração de fibras das folhas, para diversas finalidades. A produção de sisal na Bahia tem diminuído na última década, devido a problemas com o manejo da cultura e a incidência da podridão vermelha causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae*. Este fungo penetra os tecidos caulinares, causando a podridão do caule, culminando na morte e tombamento da planta. O biocontrole tem sido uma das estratégias mais estudadas para mitigação desta doença. Este estudo teve o objetivo de combinar isolados de *Trichoderma*, a partir de seus diferentes mecanismos de ação, avaliar a compatibilidade entre esses isolados e a eficiência no controle de *A. welwitschiae* *in vitro* e *in vivo*. Os isolados foram identificados como sendo: *Trichoderma koningiopsis* (R39 e R78), *T. harzianum* (C153, R72 e TCS35), *T. saturnisporum* (R75) e *T. lentiforme* (TCS1). Algumas combinações apresentaram incompatibilidade, mas esta não afetou a capacidade de inibir o *A. welwitschiae*. Nas interações *in vitro* entre os isolados de *Trichoderma* pode-se observar a formação de anéis e clamidósporos nas hifas, além de hiperparasitismo e anastomose. A atividade antagônica *in vitro* contra *A. welwitschiae* foi evidenciada em todas os isolados, quando combinados ou dissociados. Nos testes em mudas de sisal constatou-se a redução da incidência da doença com os isolados R75 (43.2%), C153 (41.7%), e com TCS1+R75 (62.5%). Em relação à redução da severidade da doença, os resultados mais significativos foram obtidos com os isolados R75 (76,5%), C153 (68.7%), TCS35 (60.5%) e TCS1+R75 (78%). Conclui-se que a combinação de espécies de *Trichoderma* é eficaz para o controle da podridão vermelha do sisal, destacando-se a combinação *T. saturnisporum* (R75) + *T. lentiforme* (TCS1).

Palavras-chave: *Aspergillus welwitschiae*, antagonismo, compatibilidade, controle biológico.

ABSTRACT

SOUSA, R. A. Combination of *Trichoderma* spp. strains to control sisal red rot. Cruz das Almas, 2019. Dissertation (Master's Degree in Agricultural Microbiology). Federal University of the Recôncavo of Bahia.

Sisal (*Agave sisalana* Perrine) is a crop of great relevance to the semi-arid region of Bahia state in Brazil, based on leaf fiber extraction, for several uses. However, sisal production has been declining due to problems with crop management and the incidence of bole rot disease caused by *Aspergillus welwitschiae*. This fungus penetrates the stem tissues, causing stem rot, culminating in plant death and collapse. Biocontrol is one of the most studied strategies for disease mitigation. This study aimed to combine *Trichoderma* isolates based on their different mechanisms of action, to analyze the compatibility between them and their efficiency in the control of *A. welwitschiae* *in vitro* and *in vivo*. The isolates were identified as: *Trichoderma koningiopsis* (R39 and R78), *T. harzianum* (C153, R72 and TCS35), *T. saturnisporum* (R75) and *T. lentiforme* (TCS1). Some combinations showed incompatibility, which did not affect the ability to inhibit *A. welwitschiae*. For the interactions between the isolates, the formation of rings and chlamydospores in the hyphae, as well as hyperparasitism and anastomosis were observed. *In vitro* antagonistic activity was present in all *Trichoderma* isolates, either combined or dissociated. For the tests with sisal bulbils, the disease incidence was reduced with the isolates R75 (43.2%), C153 (41.7%), and TCS1 + R75: (62.5%). Regarding disease severity reduction, the most significant results were observed with R75 (76.5%), C153 (68.7%), TCS35 (60.5%) and TCS1 + R75 (78%). It is concluded that combining species of *Trichoderma* is effective for controlling sisal bole rot disease, especially for the combination *T. saturnisporum* (R75) + *T. lentiforme* (TCS1).

Key words: *Aspergillus welwitschiae*, antagonism, compatibility, biological control.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de fibras de sisal (*Agave sisalana*), com uma produção de 120.000 t/ano. Toda a produção está concentrada nos estados da região nordeste, principalmente no estado da Bahia, o qual responde por 97% da produção nacional (FAO, 2019; IBGE, 2018). O cultivo de sisal é uma das principais fontes de renda no semiárido da Bahia, com geração de emprego no seu cultivo, desfibramento das folhas, beneficiamento das fibras e posterior produção de diversos produtos, como cordas, tapetes, artesanatos, dentre outros (Soares, 2011).

Esta cultura tem sido acometida pela doença denominada podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* (Duarte et al., 2018). A planta apresenta os seguintes sintomas: murcha e amarelecimento das folhas, podridão dos tecidos internos do caule e da base das folhas, com a coloração avermelhada ou parda, culminando na morte e tombamento da planta. Ocorre a inviabilização do desfibramento das folhas murchas e a redução do número de plantas e de áreas com sisal. Diante disso, já foram registradas perdas variando de 5% a 35% na produção (Coutinho, et al., 2006; Abreu, 2010).

Diferentes gêneros de fungos, bactérias e actinobactérias vêm sendo estudados em condições *in vitro* e *in vivo*, quanto ao potencial de inibição do *A. welwitschiae*, anteriormente identificado como *Aspergillus niger*. Ressalta-se os estudos com *Streptomyces* spp., *Trichoderma viride*, *T. virens* e *T. harzianum* (Sá, 2013); *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp. e *Periconia* sp., (Candeias et al., 2016); *Paenibacillus* sp., *Brevicacterium* sp., e *Bacillus* sp. (Barbosa et al., 2018).

Dentre os microrganismos mais explorados em trabalhos de biocontrole, os fungos do gênero *Trichoderma* são muito estudados e amplamente utilizados na agricultura devido aos diferentes mecanismos de ação que estes exercem no controle de fitopatógenos, além da promoção de crescimento vegetal (Harman, 2004; Shores et al., 2010). Os mecanismos de ação mais conhecidos e explorados no gênero *Trichoderma* são antibiose, competição e micoparasitismo, com eficiência no controle de patógenos fúngicos e bacterianos de importância agrícola, como *Fusarium moliniforme* (El-Hasan et al., 2008);

Phytophthora sp. (Bae et al, 2016) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (JagTap, Jangam e Dey, 2012).

Considerando os diferentes mecanismos de ação de espécies de *Trichoderma* contra fitopatógenos, a hipótese deste estudo é de que, a combinação de isolados de *Trichoderma*, com diferentes mecanismos de ação e compatíveis, poderá otimizar a eficiência destes microrganismos no controle de *A. welwitschiae* no sisal. O objetivo desse trabalho foi avaliar espécies de *Trichoderma* combinadas e não combinadas, como estratégia de controle do *A. welwitschiae* e a podridão vermelha do sisal.

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

A cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine)

O gênero *Agave* foi historicamente estabelecido pelo botânico Linnaeus em 1753 (García-Mendoza, 2004). Este gênero pertence à classe Monocotyledoneae, família Asparagaceae, subfamília Agavoideae, e ordem Asparagales. Na família Asparagaceae destaca-se o gênero *Agave* que possui cerca de 203 espécies (WCPS, 2016), o qual predomina em regiões tropicais, especialmente áridas e semiáridas (García-Mendoza, 2002, Good-Ávila et al., 2006). A espécie *A. sisalana* é oriunda do México (García-Mendoza, 2002; Gentry, 2004) e foi trazida para o Brasil por volta de 1903, época em que os cultivos predominaram no estado da Paraíba. Na década de 30, o seu cultivo se expandiu no estado da Bahia, predominantemente em áreas de agricultores familiares no semiárido deste estado, contribuindo para a sobrevivência de grande parte da população e, desta forma, minimizando o êxodo rural nessas regiões (Suinaga et al., 2006).

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma planta monocotiledônea, perene, com as folhas dispostas em forma espiral e em forma de roseta. É semi-xerófila, apresenta especializações morfológicas e anatômicas que garantem sua resistência em ambientes com escassez de água, como por exemplo a disposição das folhas que permite a planta capturar e direcionar água da chuva até as raízes (García-Mendoza, 2002; Gentry, 2004; Stewart, 2015). Em geral, a morfologia de *A. sisalana* não apresenta muitas variações, devido ao predomínio de reprodução assexuada. Esta planta (sisal) produz frutos e sementes em ramos de gemas localizadas abaixo do escapo floral. Quando as flores caem do escapo floral, novas plantas são formadas, sendo estas denominadas de bulbilhos, que são gerados assexuadamente (Gentry, 2004; Silva, 2008). Os bulbilhos são os órgãos de propagação mais abundantes da *A. sisalana*, além dos rebentos que se desenvolvem a partir de rizomas subterrâneos emitidos pela planta mãe (Silva, 2008). As folhas do sisal são do tipo carnosas, suculentas, fibrosas, lisas e de formato lanceolado, com a presença de espinhos no ápice de cada folha (Suinaga et al., 2006). Predomina uma cutícula grossa, com redução estomática nas folhas, que são características que garantem a sobrevivência desta planta em regiões desérticas e uma barreira natural ao ataque de pragas e patógenos (Nobel et al., 2003; Pimienta-Barrios et al., 2005; Coutinho, et al.,

2006). O sisal apresenta em seus órgãos vegetativos elementos estruturais variados (Neto & Martins, 2012). As folhas possuem bainhas de fibras desenvolvidas, mesófilo compacto e câmara subestomática alongada. O caule é recoberto por uma camada ou casca dura. Quanto à raiz, esta é fasciculada, possui camadas de esclereídes, que são constituídas de células diferenciadas, dando o caráter fibroso que pode conferir à planta maior resistência à penetração de patógenos (Neto & Martins, 2012).

O sisal apresenta metabolismo fotossintético do tipo CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas), com seus estômatos abrindo à noite, fazendo a fixação de CO₂, de forma a reduzir a perda de água via transpiração, e o gasto energético, tornando mais eficiente o mecanismo de fotossíntese e proporcionando à planta maior resistência a ambientes desérticos (García-Mendoza, 2002; Holtum & Winter, 2014; Yang et al., 2015).

Devido aos aspectos morfofisiológicos das folhas de *A. sisalana*, esta planta representa a principal fonte de fibras rígidas no mundo. Cada planta tem capacidade de produzir em média de 20 a 40 folhas por ano, com um ciclo vegetativo de 8 a 10 anos (Alvarenga Júnior, 2012). Do peso total da folha de sisal, 3 a 5% corresponde à fibra, enquanto os 95 a 97% restantes constituem resíduos do beneficiamento. As fibras são compostas basicamente de lignina, hemicelulose e celulose (Martin et al., 2009). Fibras e resíduos das folhas de sisal têm diferentes destinos e aplicações. As fibras são utilizadas principalmente na indústria de cordoaria, fios, tapetes e, em menor escala, na indústria de papéis. Os resíduos são explorados na produção de fármacos e subprodutos derivados (Alvarenga Júnior, 2012), compostos antimicrobianos (Ribeiro et al., 2013), nematicidas (Jesus et al., 2014; Damasceno et al., 2015), na alimentação animal, através da produção de silagem (Brandão et al., 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de fibra de sisal, com produção de 120.000 toneladas por ano (40% da produção mundial), seguido da Tanzânia com 30.000 toneladas e Quênia com 25.000 toneladas. Embora a produção brasileira seja em pequena escala, são exportadas aproximadamente 100.000 toneladas de fibra bruta e bens manufaturados por ano (FAO, 2019). A Bahia é o principal produtor, correspondendo a 97% da produção de fibras no país (IBGE, 2018).

***Aspergillus welwitschiae* e a podridão vermelha do sisal**

A produção de sisal e, conseqüentemente da fibra, tem caído ao longo dos anos no semiárido da Bahia (Carneiro et al., 2014) devido ao baixo nível tecnológico empregado em toda a cadeia produtiva do sisal e a elevada incidência da podridão vermelha do sisal (Lima et al., 1998; Suinaga et al., 2006).

A podridão vermelha do sisal, de acordo com Abreu (2010), é a principal doença que atinge os cultivos de sisal na Bahia, sendo responsável por perdas que variam de 5% a 35% da produção, com redução das áreas plantadas e incidência de 100% nos municípios produtores na Bahia (Abreu, 2010). Esta doença causa o amarelecimento e murcha das folhas de sisal, o apodrecimento do caule e o tombamento e morte da planta (Abreu et al., 2010; Duarte et al., 2018). Esta podridão foi descrita pela primeira vez por Wallace & Dieckmahns (1952), e o agente causal da podridão vermelha do sisal foi descrito como sendo o fungo *Aspergillus niger*. No Brasil, a doença foi descrita tendo como agente causal o fungo *Botryodiplodia theobromae* (Lima et al., 1998) e posteriormente foi descrita como sendo causada por *A. niger* (Coutinho et al., 2006).

Os trabalhos desenvolvidos acerca do biocontrole desta doença foram todos baseados no patossistema *A. niger* – *A. sisalana* (Sá, 2013; Candeias et al., 2016; Barbosa et al., 2018). Entretanto, recentemente Duarte et al. (2018) fizeram uma reavaliação completa da doença, e por meio de estudo integrativo considerando análises fitopatológicas/histopatológicas, microbiológicas e moleculares (filogenia molecular), constaram que o agente causador de podridão vermelha no sisal é o fungo *Aspergillus welwitschiae*. Pertencentes à seção *Nigri*, similaridades são compartilhadas por *A. niger* com *A. welwitschiae*. Contudo, trabalhos demonstraram a diferenciação destas duas espécies por meio de estudos sobre o gene da calmodulina (CaM) e a diferença na capacidade de produção de ocratoxina A e fumosina, que é baixa ou nula para *A. welwitschiae* em relação a *A. niger* (Massi et al., 2016; Susca et al., 2016; Duarte et al., 2018).

Conforme o banco de dados micológicos (Mycobank, 2017), o *A. welwitschiae* pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eutotiomyces, ordem Eurotiales, família Aspergillaceae. *A. welwitschiae* foi identificado pela primeira vez associado à planta *Welwitschia mirabilis* por AF Moller no século XIX. Após classificações errôneas deste fungo, como *Ustilago welwitschiae* por

Saccardo em 1883 e *Sterigmatomyces welwitschiae* por Hennings em 1903, este foi finalmente classificado por Wehmer em 1907 como *Aspergillus welwitschiae* (Hong et al., 2013). *Aspergillus welwitschiae* foi encontrado associado às estruturas de reprodução de *W. mirabilis* e também foi reportado em frutas secas, grãos de uva, café, cacau, amêndoas, cebola, alho (Massi et al., 2016; Susca et al., 2016). O fungo pode ser encontrado no solo e no ar (Whitaker et al., 2008).

Assim como vinha sendo descrito para *A. niger*, as infecções nas plantas de sisal por *A. welwitschiae* ocorrem pela penetração do patógeno em tecidos do hospedeiro com injúrias, por meio de cortes, retirada de rebentos, estresse nutricional e ou hídrico (Coutinho et al., 2006). *A. welwitschiae* age na destruição do parênquima das células do caule do sisal, configurando-o em um patógeno necrotrófico que destrói as células vivas e se nutre a partir destas e vive sobre os tecidos mortos, adquirindo hábito saprofítico (Duarte et al., 2018). Não existe nenhuma medida curativa para a doença. Silva (2008) relata que o manejo da doença se dá pela retirada e queima das plantas doentes e utilização de mudas saudáveis.

***Trichoderma* spp.: aspectos gerais, e aplicações no biocontrole**

O gênero *Trichoderma* foi descrito inicialmente por Persoon em 1774. O grupo inclui fungos filamentosos de ampla ocorrência, de vida livre de competência rizosférica (Ahmad & Baker, 1987) e que podem ser isolados de diversos ambientes, como por exemplo de solo (geralmente de regiões de clima temperado e tropical) e plantas (Bissett, 1991; Howell, 2003). Quanto a taxonomia, o *Trichoderma* é classificado no Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae (Mycobank, 2017). Em sua maioria, algumas linhagens do grupo *Trichoderma* são consideradas anamórficas – fase reprodutiva imperfeita – e quando teleomórficas – fase reprodutiva perfeita, pertencem ao gênero *Hypocrea* (Harman et al., 2004).

Culturas de *Trichoderma* spp. apresentam crescimento rápido, com micélio aéreo esparso que varia na coloração (branco, âmbar, verde-amarelo), no qual organizam-se conidióforos repetidamente ramificados com numerosos

conídios, que em alguns casos podem apresentar parede celular espessa, formando clamidósporos (Bisset, 1991; Gams & Bissett, 1998; Howell, 2003).

Diversas linhagens de fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidas pela gama de substâncias antibióticas e mecanismos de ação que podem exercer sobre patógenos de plantas, principalmente, caracterizando-se por serem efetivos agentes de biocontrole (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998; Harman, et al., 2004; Shores, et al., 2010). São conhecidas diversas substâncias antibióticas produzidas por *Trichoderma* spp.: β -glucanases, proteases, gliotoxinas, celulasas, hemicelulasas, sesquiterpenos, tricocinas, dentre outros (Hermosa et al., 2014; Monfil & Casa-Flores, 2014).

A prospecção de metabólitos de *Trichoderma* spp desperta interesse agrícola, devido aos efeitos antimicrobianos descobertos desde 1932, quando Weindling (1932) observou que exudados do fungo *Trichoderma lignorum* exerciam atividade antagonista contra outro fungo (Harman & Kubicek, 2002). Recentemente, diversos trabalhos têm demonstrado resultados positivos sobre a ação de metabólitos produzidos por diversas espécies e isolados de *Trichoderma* contra patógenos como: *Fusarium moliniforme* (El-Hasan et al., 2008); *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria brassicicola* (Amin et al., 2010); *Phytophthora* sp. (Bae et al., 2016); *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum* (Zeilinger et al., 2016). Além da antibiose promovida por metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp., trabalhos têm relatado o papel desses metabólitos na indução de resistência de plantas a doenças através de elicitores que interagem com receptores da planta hospedeira, como por exemplo, os peptaibols, ácido jasmônico e ácido salicílico, tricocinas (Engelberth et al., 2001; Harman et al., 2004; Viterbo et al., 2007; Luo et al., 2010; Hidangmayum, 2018).

A promoção de crescimento de plantas e mitigação de estresses bióticos e abióticos também são atividades desencadeadas por *Trichoderma* spp. através de metabólitos (Harman et al., 2004). Há relatos sobre o ácido harziano, um sideróforo capaz de se ligar a íons metálicos essenciais de boa afinidade, produzido pela espécie *Trichoderma harzianum* (Vinale et al., 2013). A lactona insaturada, 6-pentil pirona (6-PP), que caracteriza algumas linhagens de *Trichoderma* com “aroma de coco” exerce ação antifúngica e promotora de crescimento de plantas (Vinale et al., 2009). Adicionalmente, a ACC-deaminase

e o ácido-indolacético (AIA) produzidos por *Trichoderma asperellum* foram descritos promovendo o crescimento de sorgo (Anam et al., 2019).

O micoparasitismo de fitopatógenos é um importante mecanismo de ação de *Trichoderma* spp. (Harman, et al., 2004). A competição estabelecida no solo, principalmente na rizosfera, devido às numerosas e complexas relações entre microrganismos, nematoides e plantas, implica em interações antagônicas, nas quais, uma espécie parasita diretamente a outra, caracterizando esse processo como micoparasitismo. As interações antagônicas acima citadas (geralmente altamente específicas) são classificadas em interações biotróficas e necrotróficas, as quais são baseadas na agressividade do parasita em relação ao seu hospedeiro (Herrera-Estrella & Chet, 2003). O mecanismo micoparasitário do *Trichoderma* spp. é um processo complexo. São desencadeados eventos sequenciais e cooperativos, como: crescimento quimiotrófico positivo, contato direto com o fungo hospedeiro, e enrolamento em torno das hifas do hospedeiro (Herrera-Estrella & Chet, 2003; Harman et al., 2004). Neste processo, alterações morfológicas podem ocorrer nas hifas do *Trichoderma*, com a formação de apressório e a secreção de enzimas (celulases, quitinases, glucanases) que hidrolisam as células do hospedeiro, facilitando a penetração do fungo parasita (Kubicek, 2001; Woo & Lorito, 2007).

Linhagens de *Trichoderma* foram estudadas e relatadas apresentando micoparasitismo e ação de biocontrole sobre patógenos fúngicos e bacterianos de importância agrícola. *T. harzianum* foi avaliado contra *Fusarium graminearum*, demonstrando eficiência no controle da podridão do colmo do milho (Saravanakumar et al., 2017). Elamathi et al. (2018) relataram a atividade micoparasitária de *T. harzianum* sobre *Colletotrichum falcatum*, agente causal da podridão vermelha em cana-de-açúcar, e descreveram o padrão de expressão de genes de micoparasitismo desse fungo na presença do patógeno.

Por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massa, compostos voláteis e não voláteis produzidos por *Trichoderma* sp, atuando sobre *Sclerotium* sp. (agente causal da podridão do caule em alface) foram identificados. Os compostos álcool feniletílico e sesquiterpeno (epi-cubenol) foram constatados e são conhecidos como substâncias antifúngicas. Adicionalmente, através de ensaios enzimáticos, foi observada a ação de β -1,3-glucanase (possivelmente envolvida na degradação de parede celular do patógeno) no antagonismo de

Trichoderma sp. sobre *Sclerotium* e os autores relataram que na planta, houve significativa redução da severidade da doença (Wonglom et al., 2019).

Não foram encontrados na literatura trabalhos relatando o biocontrole de *A. welwitschiae* por *Trichoderma* spp. Entretanto, alguns estudos abordaram a aplicação de *Trichoderma* spp. sobre *Aspergillus niger*. Os estudos com *A. niger* e *Trichoderma* podem fornecer informações relevantes para os estudos da interação *A. welwitschiae* – *Trichoderma*. Gajera et al. (2016) estudaram enzimas envolvidas na ação antioxidante desencadeada por *T. viride* sobre o patossistema *A. niger* – *Arachis hypogaea* L. Durante a interação tripartite, enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase aumentaram a resposta à infecção pelo patógeno nas plantas, com atividade significativamente aumentada, sugerindo a aplicação de *T. viride* no combate às reações oxidativas causada pela invasão de fitopatógenos.

Em se tratando de uso combinado de espécies de *Trichoderma* para biocontrole de fitopatógenos, El-Sharkawy, Rashad & Ibrahim (2018) avaliaram a ação combinada e individual de *T. harzianum* e *T. viride* com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) sobre *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*, agente causal de ferrugem do colmo do trigo. Estes autores detectaram que a suspensão combinada de esporos dos isolados fúngicos apresentou superioridade em relação aos demais tratamentos, e que em condições *in vivo*, foi observada redução significativa da doença, melhorando os parâmetros de crescimento das plantas.

Espécies de *Trichoderma* são constantemente estudadas para biocontrole de diversos patógenos causadores de podridão caulinares e radiculares de diversas cultivares, como: podridão do caule do amendoim – *T. harzianum* x *Sclerotium rolfsii* (Biswass et al., 2000); mofo branco em batata – *Trichoderma* spp. x *Sclerotinia sclerotiorum* (Ojaghian, 2011); podridão de raiz preta em feijão de fava – *Trichoderma* spp. x *Fusarium solani* (Belete, Ayalew & Ahmed, 2015); podridão de carvão (podridão cinza) em soja – *Trichoderma* spp. x *Macrophomina phaseolina* (Khalili et al., 2016). Tais informações podem contribuir com esclarecimentos dos processos de biocontrole da podridão caulinar do sisal através da aplicação de *Trichoderma* spp.

Tendo em vista a eficiência de fungos do gênero *Trichoderma* como agentes biocontroladores de fitopatógenos, vários formulados com espécies deste fungo já estão disponíveis no mercado, a exemplo de: Agrotlich Plus®, *Trichodermax*® (Nº de registro 12511), Trichoplus JCO, etc. (Betiol, et al., 2012; Lucon, Chaves e Bacilieri, 2014).

A hipótese deste trabalho é de que os diferentes mecanismos de ação que os isolados de *Trichoderma* apresentam, quando combinados, podem atuar de forma complementar otimizando o biocontrole da podridão vermelha do sisal. Este estudo teve como objetivo avaliar combinações de espécies de *Trichoderma* que apresentam diferentes mecanismos de ação *in vitro* no controle de *A. welwitschiae* para o controle da podridão vermelha em mudas de sisal.

REFERÊNCIAS

- Abreu, K. C. L. M. 2010. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia. Tese. Doutorado em Ciências Agrárias na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia 106p.
- Ahmad, J.S., Baker, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, 77, 182–189. DOI: 10.1139/m88-043.
- Alvarenga-Júnior, E. R. 2012. Cultivo e aproveitamento do sisal (*Agave sisalana*). Minas Gerais-MG, Dossiê Técnico-CETEC, 34.
- Amin, F. Razdan, v. k., mohiddin, f. a., bhat, k. a., sheikh, p. a. 2010. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens in-vitro. **Journal of Phytology**, 2, 10, 34-37.
- Anam, G. B., Reddy, M. S. Anh, Y. 2019. Characterization of *Trichoderma asperellum* RM-28 for its sodic/saline-alkali tolerance and plant growth promoting activities to alleviate toxicity of red mud. **Science Of The Total Environment**, 662, 462-469.

- Bae, S-J., Mohonta, T. K., Chung, J. Y., Reju, M., Park, G., Shim, S., Hong, S-B., Slo, H., Bae, D-W., Bae, I., Kim, J-J., Bae, H. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. **Biological Control**, 92, 128-138. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2015.10.005.
- Barbosa L. O., Lima, J. S., Magalhães, V. C., Gava, C. A. T., Soares, A. C. F., Marbach, P. A., Souza, J. T. 2018. Compatibility and combination of selected bacterial antagonists in the biocontrol of sisal bole rot disease. **Biocontrol**, 63, 4, 595-505. DOI: 10.1007/s10526-018-9872-x.
- Belete, E., Ayalew, A., Ahmed, S. 2015. Evaluation of Local Isolates of *Trichoderma* spp. against Black Root Rot (*Fusarium solani*) on Faba Bean. **J. Plant. Pathol. Microb.**, 6, 6. DOI: 10.4172/2157-7471.1000279.
- Bettiol, W. Morandi, M. A. B., Pinto, L., Júnior, T. J. P. 2012. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna-SP (Documentos Embrapa Meio Ambiente 88), 155.
- Bisset, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, 9, 11, 2357-2372.
- Biswas, K. K., Sen, C. Management of stem rot of groundnut caused by *Sclerotium rolfsii* through *Trichoderma harzianum*. **Indian Phytopath**, 53, 3, 290-295.
- Brandão, L.G.N. 2011. Efeito de aditivos no teor de matéria seca, fração nitrogenada e pH da silagem de coproduto do sisal. In: V Congresso Nordeste De Produção Animal. Aracaju.
- Carneiro, F. S.; Queiroz, S. R. O. D.; Passos, A. R.; Nascimento, M. N.; Santos, K. S. 2014. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesq. Agropec. Trop.**, 44, 33, 294-303.

- Coutinho, W.M., Luz, C.H., Suassuna, N.D., Silva, O.R.R.F., Suinaga, F.A. 2006. A podridão do tronco do sisal. Embrapa Algodão (Comunicado Técnico, 281).
- Candeias, E. L., Santos, M. L., Duarte, E. A. A., Oliveira, T. A. S., Bezerra, J. L., Soares, A. C. F. 2016. Fungos endofíticos de raízes de sisal antagonistas ao *Aspergillus niger*. **Agrotrópica**, 28, 29-36. DOI: 10.21757/0103-3816.
- Damasceno, J. C. A., Soares, A. C. F., Jesus, F. N., and Santana, R. S. 2015. Sisal leaf decortication liquid residue for controlling *Meloidogyne javanica* in tomato plants. **Hortic. Bras.** 33, 155–162. DOI: 10.1590/S0102-053620150000200004.
- Duarte, E. A. A., Damasceno, C., Oliveira, T. A. S., Barbosa, L. O., Martins, F. M., Silva, J. R. Q., Lima, T. E. F., Silva, R. M. Silva, Kato, R. B. Bortolini, D. E., Azevedo, V., Góes-Neto, A., Soares, A. C. F. 2018. Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschieae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, 9, 1- 21. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01227.
- El-Hasan, A., Walker, F., Buchenauer, H., 2008. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. **J. Phytopathol.** 156, 79-87. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01330.x.
- El-Sharkawy, H. H. A., Rashad, Y. M., Ibrahim, S. A. 2018. Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 103, 84-91. DOI: 10.1016/j.pmpp.2018.05.002.

- Elamathi, E., Malathi, P., Rasappa, V., Sundar, A. R. 2018. Expression analysis on mycoparasitism related genes during antagonism of *Trichoderma* with *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. **J. Plant Biochem. Biotechnol.**, 27, 3, 351-361. DOI:10.1007/s13562-018-0444-z.
- Engelberth, J., Koch, T., Schuler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J., Boland, W., 2001. Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendril coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. **Plant Physiol.** 125, 369-377.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2019. Future Fibers: Sisal. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/>> acesso em maio de 2019.
- Gajera, H. P., Katakpara Z. A., Patel, S. V., Golakiya, B. A. 2016. Antioxidant defense response induced by *Trichoderma viride* against *Aspergillus niger* Van Tieghem causing collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Microbial Pathogenesis.** 91, 26-34. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.11.010
- Gams, W., Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3-34. - In Kubicek C. P. and G. E. Harman (eds.), **Trichoderma and Gliocladium.** Taylor & Francis.
- García-Mendoza, Abisaí J. 2002. Los agaves de México. **Ciencias**, 87, 14-23.
- García-Mendoza, A. 2004. Agaváceas. In: García-Mendoza, A., Ordóñez, M., J., Briones, M. (Eds.), **Biodiversidad de Oaxaca**, 159-169. México: Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Biología/Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza/World Wildlife Fund.
- Gentry, H. S. 2004. **Agaves of Continental North America.** Tucson, AZ, EE.UU.: University of Arizona Press, 670.

- Good-Avila S., Souza V., Gaut, B., Equiarte, L. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *PNAS*, 103, 9124-9129. DOI: 10.1073/pnas.0603312103.
- Harman, G. E., Kubicek, C. P. 2002. ***Trichoderma* And *Gliocladium*: Basic Biology, Taxonomy and Genetics**. Vol. 1. p.300.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I.; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. ***Nature Reviews/Microbiology***, 2, 43-56.
- Hennings, P. 1903. H. Baum Kunene-Zambesi Expedit. Berlin.
- Herrera-Estrella, A., Chet, I. 2003. The biological control agent *Trichoderma*: from fundamentals to applications. In: Arora, D. (Ed.), ***Handbook of Fungal Biotechnology***, 1000–1020. DOI: 10.1201/9780203913369.
- Hermosa, R., Cardoza, R.E., Rubio, M.B., Gutierrez, S., Monte, E., 2014. Chapter 10 secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma* A2-Gupta, Vijai K. In: Herrera- Estrella, M.S., Druzhinina, R.S.U., Tuohy, M.G. (Eds.), ***Biotechnology and Biology of Trichoderma***. Elsevier, 125-137.
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P. 2018. Plant Responses to *Trichoderma* spp. and their Tolerance to Abiotic Stresses: A review. ***Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry***, 7, 1, 758-766.
- Holtum, J. A. & Winter, K. 2014. Limited photosynthetic plasticity in the leaf-succulent CAM plant *Agave angustifolia* grown at different temperatures. ***Functional Plant Biology***, 41, 8, 843-849. DOI: 10.1071/FP13284.
- Hong S-B., Lee M., Kim, D-H., Varga J, Frisvad, J. C., Perrone G. et al. 2013 *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* In East Asia. *PLoS ONE*, 8, 5, e63769. DOI: 10.1371/journal.pone.0063769

- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The History and evolution of current concepts. **Plant Disease**, 87, 4-10. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.1.4.
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018. Produção Agrícola Municipal ano 2018 www.sidra.ibge.gov.br (Acesso em 22 de maio de 2018).
- Jagtap, G. P., Jangam, A. M., Deya, U. 2012. Management of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Scientific Journal of Microbiology**, 1,1, 10-18.
- Jesus, F. N., Damasceno, J. C. A., Barbosa, D. H. S. G., Malheiro, R., Pereira, J. A., Soares, A. C. F. 2014. Control of the banana burrowing nematode using sisal extract. **Agron. Sustain. Dev.**, 35, 783-791. DOI: 10.1007/s13593-014-0264-z.
- Khalili, E., Javed, M. A., Huyop, F., Rayatpanah, S. 2016. Evaluation of *Trichoderma* isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. DOI: 10.1080/13102818.2016.1147334.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martínez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., et al, 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biol.** 12, 40. DOI:10.1186/gb-2011-12-4-r40.
- Lima, E. F., Moreira, J. A. N., Batista, F.A.S.; Silva, O. R. R. F. D; Farias, F. J. C., Araújo, A. E. 1998. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**,2, 109-112.

- Lucon, C. M. M., Chaves, A. L. R., Bacilieri, S. 2014. *Trichoderma*: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura. Instituto Biológico, p. 35.
- Luo, Y., Zhang, D. D., Dong, X. W., Zhao, P. B., Chen, L. L., Song, X. Y., Wang, X. J., Chen, X. L., Shi, M., Zhang, Y. Z., 2010. Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. **FEMS Microbiol. Lett.** 313, 120-126.
- Massi, F. P., Sartori, D., de Souza Ferranti, L., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Vieira, M. L., et al. 2016. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **Int. J. Food Microbiol.** 221, 19-28. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.010.
- Martin, A. R., Martins, M. A., Mattoso, L. H., Odilon, R., Silva, R. F. 2009. Chemical and structural characterization of sisal fibers from *Agave sisalana* variety. **Polímeros**, 19, 1. DOI: 10.1590/S0104-14282009000100011.
- Monfil, V. O., Casas-Flores, S. 2014. Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture in G. **Biocontrol And Plant Growth Promotion**, Elsevier, 429-452.
- Mycobank: Fungal database, nomenclatures and species banks. 2017. Disponível em: < <http://www.mycobank.org/> > acesso em setembro, 2017.
- Neto, I. L. C., and Martins, F. M. 2012. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Agave sisalana* Perrine ex En-Gelm (Agavaceae). **Rev. Caatinga**. 25, 72–78.
- Nobel, P. S. 2003. **Environmental biology of Agaves and cacti**. Nueva York, EE.UU.: Cambridge University Press, 284.

- Ojaghian, M. R., 2011. Potential of *Trichoderma* spp. and *Talaromyces flavus* for biological control of potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, 39, 185-193.
- Persoon, C. H. 1794. Disposita methodica fungorum. Römer's Neues Mag Bot. 1794, 1:81–128.
- Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J. & García-Galindo, J. 2006. Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana*. **Agrociencia**, 40 6, 699-709.
- Ribeiro, B. D., Alviano, D. S., Barreto, D. W., Coelho, M. A. Z. 2013. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 436, 736-743. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.08.007>.
- Saccardo, P. A. 1883. Florula Mycologica Lusitanica. **Bolet. Soc. Brot.**, 11, 9-90.
- Sá, J. O. 2013. Controle biológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine) com *Trichoderma* spp. e actinobactérias. Tese Doutorado em Ciências Agrárias na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 155.
- Saravanakumar, K., Li, Y., Yu, C., Wang, Q-q., Wang, M., Gao, J. S. J-x., Chen, J. 2017. Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. **Scientific Reports**, 7, 1771.
- Shoresh, M., Harman, G.E., Mastoury, F., 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Ann. Rev. Phytopathol.** 48, 21-43.
- Silva, O. R. R. F. 2008. **Cultivo do sisal no Nordeste brasileiro**, Campina Grande.

- Sivasithamparam, R. Ghisalbert, E. L. 1998. In ***Trichoderma and Gliocladium***, vol. 1 (eds Kubicek, C. P. & Harman, G. E.). Taylor and Francis, 139-191.
- Soares, R. M. F. 2011. Interfaces entre identidade, memória e comercialização da produção artesanal no território do sisal/ Bahia: o artesanato como fator de desenvolvimento local. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Gestão Social na Universidade Federal da Bahia). Salvador-BA, 160.
- Suinaga, F.A., Silva, O.R.R.F., Coutinho, W.M. 2006. In: Andrade, W. (Ed.) **Sisal do Brasil**, 1.ed, Salvador.
- Susca, A., Proctor, R. H., Morelli, M., Haidukowski, M., Gallo, A., Logrieco, A. F., et al. 2016. Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. **Front. Microbiol**, 7, 1412. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01412.
- Stewart, J. R. 2015. Agave as a model CAM crop system for a warming and drying world. **Frontiers in Plant Science**, 69, 684. DOI: 10.3389/fpls.2015.00684.
- Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S., Lorito, M., 2009. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. **Lett. Appl. Microbiol.** 48, 705-711.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E.L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S.L., Lorito, M., 2013. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiol. Lett.** 347, 123-129.

- Viterbo, A., Wiest, A., Brotman, Y., Chet, I., Kenerley, C., 2007. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. **Mol. Plant Pathol.** 8, 737-746. DOI : 10.1111/j.1364-3703.2007.00430.x.
- Wallace, G. B., Dieckmahns, E. C. (1952). Bole rot in sisal. East African **Agricultural. For. J.** 18, 24-29. DOI: 10.1080/03670074.1952.11664819.
- WCSP-World Checklist of Selected Plant Families in the Catalogue of Life. 2016. Disponível em: <<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2017/details/species/id/a956ecee73618224ba7e81f012b84671>> Acesso em maio de 2017.
- Wehmer, C. 1907. Zur Kenntnis einiger *Aspergillus* arten. Centralb. f. Bakt. etc. II, Abt. *Bd.* 18, 385-395.
- Weindling, Emerson, 1936. The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. **Phytopathology.** 26, 1068-1070.
- Winter, K., García, M., Holtum, J. A. 2014. Nocturnal versus diurnal CO₂ uptake: How flexible is *Agave angustifolia*? **Journal of Experimental Botany**, 65, 13, 3695- 3703. DOI: 10.1093/jxb/eru097.
- Whitaker, C., Pammenter, N. W., and Berjak, P. 2008. Infection of the cones and seeds of *Welwitschia mirabilis* by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* in the Namib-Naukluft Park. *S. Afr. J. Bot.* 74, 41-50. DOI: 10.1016/j.sajb.2007.08.008.
- Wonglom, P., Daengsuwan, W., Ito, S-c., Sunpapao, A. 2019. Biological control of Sclerotium fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved. **Physiological and Molecular Plant Pathology.** DOI: 10.1016/j.pmpp.2019.04.007.

- Woo, S. L., Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro, M.; Gressel, J. (eds.). **Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management**. Springer, 107-130.
- Yang, X., Cushman, J. C., Borland, A. M., Edwards, E. J., Wullschleger, S. D., Tuskan, G. A., et al. 2015. A roadmap for research on crassulacean acid metabolism (CAM) to enhance sustainable food and bioenergy production in a hotter, drier world. **New Phytol.** 207, 491–504. DOI: 10.1111/nph.13393.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P. K. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* e Chemistry meets genomics. **British Mycological Society**, 30, 74-90. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>.

CAPÍTULO II

Combinação de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle da podridão vermelha do sisal

Artigo no formato de submissão para a Revista BioControl – Springer.

SOUSA, R. A. Combinação de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle da podridão vermelha do sisal

Resumo

O sisal (*Agave sisalana* Perrine), uma cultura socioeconomicamente importante no semiárido brasileiro, tem tido decaído em sua produtividade nas últimas duas décadas, devido à alta incidência da podridão vermelha. Esta doença é causada por *Aspergillus welwitschiae*, com sintomas de amarelecimento e murcha das folhas, podridão e morte da planta. Este trabalho teve o objetivo de combinar isolados de *Trichoderma* com diferentes mecanismos de biocontrole para o controle de *A. welwitschiae* e a podridão vermelha. Isolados de *Trichoderma koningiopsis* (R39 e R78), *T. harzianum* (C153, R72 e TCS35), *T. saturnisporum* (R75) e *T. lentiforme* (TCS1) foram avaliados para a compatibilidade entre eles e a eficiência no controle de *A. welwitschiae*. Nas interações entre *Trichoderma* spp., observou-se formação de clamidósporos, anéis e anastomose nas hifas. Observou-se antagonismo para todos os isolados combinados e dissociados. Em mudas de sisal, a incidência e severidade da doença foi reduzida em até 62.5% e 78%, respectivamente pela combinação TCS1+R75. Portanto, combinar espécies de *Trichoderma* é uma estratégia eficaz para controle da podridão vermelha do sisal.

Palavras-chave: *Agave sisalana*, biocontrole, *Aspergillus welwitschiae*, compatibilidade.

SOUSA, R. A. Combining *Trichoderma* spp. isolates for controlling sisal bole rot disease

Abstract

Sisal (*Agave sisalana* Perrine), a socioeconomically important crop in the Brazilian semi-arid region, has decreased in productivity in the past two decades, due to the high incidence of bole rot disease. This disease is caused by *Aspergillus welwitschiae*, with symptoms of leaf yellowing and wilting, bole rot and plant death. The objective of this work was to combine *Trichoderma* isolates with different biocontrol mechanisms for *A. welwitschiae* and sisal bole rot control. Isolates of *Trichoderma koningiopsis* (R39 and R78), *T. harzianum* (C153, R72 and TCS35), *T. saturnisporum* (R75) and *T. lentiforme* (TCS1) were tested for compatibility between them and efficiency in *A. welwitschiae* control. For the interactions between *Trichoderma* spp., the formation of chlamydospores, rings, and anastomosis in hyphae were observed. Antagonism was observed for all combined and dissociated *Trichoderma* isolates. In sisal bulbils, the incidence and severity of the disease were reduced by up to 62.5% and 78%, respectively by the TCS1 + R75 combination. Therefore, combining *Trichoderma* species is an effective strategy for controlling sisal bole rot disease.

Keywords: *Agave sisalana*, biocontrol, *Aspergillus welwitschiae*, compatibility.

1. Introdução

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma importante cultura do semiárido da Bahia, por se desenvolver bem em regiões de clima seco, devido às suas características morfofisiológicas (García-Mendoza, 2002; Suinaga et al., 2006; Stewart, 2015). Suas folhas são utilizadas para a extração de fibras que possuem valor comercial (Coutinho, et al., 2006). O Brasil é o maior produtor mundial de fibras de sisal, com a produção de 120.000 t/ano, e o estado da Bahia lidera com 97% da produção de fibras no país (FAO, 2019; IBGE, 2018).

A podridão vermelha do sisal é a principal doença que afeta a cultura do sisal, causada pelo fungo fitoparasita e oportunista *Aspergillus welwitschiae* (Duarte et al., 2018). O problema vem exigindo maior atenção devido ao aumento da incidência da

doença, a falta de medidas de controle e baixo nível tecnológico empregado no manejo da cultura sisaleira (Abreu, 2010; Candeias et al., 2016).

No sisal, o *A. welwitschiae* penetra os tecidos injuriados do caule, causando a podridão com coloração avermelhada nos seus tecidos internos e a murcha e amarelecimento das folhas, inviabilizando o seu desfibramento e causando a morte e tombamento da planta (Abreu, 2010; Duarte et al., 2018). Os estudos com *A. welwitschiae* indicam que este fungo causa a destruição do parênquima das células do caule do sisal (Duarte et al., 2018).

A retirada e queima das plantas doentes e a utilização de mudas sadias têm sido as principais estratégias indicadas para o manejo desta doença (Coutinho, et al., 2006). Estratégias de controle biológico da podridão vermelha do sisal vêm sendo exploradas a partir de estudos do patossistema *A. niger* - *A. sisalana*. Alguns microrganismos já foram testados *in vitro* e *in vivo* quanto ao potencial de inibição do patógeno, como antibiose de *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp. e *Periconia* sp., isolados a partir de raízes do sisal (Candeias et al., 2016), e ação antagonista das bactérias *Paenibacillus* sp., *Brevibacterium* sp., e *Bacillus* sp. (Barbosa et al., 2018).

Visando alternativas sustentáveis e ambientalmente mais aceitas no controle de fitopatógenos, microrganismos associados às plantas e ao solo vem sendo amplamente explorados quanto à eficácia de biocontrole, como os fungos do gênero *Trichoderma* (Strobel, 2003; Vorholt, 2012). *Trichoderma* spp. podem atuar através de competição por nutrientes e espaço, síntese de antibióticos, inativação de enzimas do patógeno, secreção de substâncias antimicrobianas e também por micoparasitismo (Benítez, et al., 2004; Harman, et al., 2004; Mukherjee et al., 2012; Harman et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a compatibilidade da combinação entre sete isolados de *Trichoderma* spp, e a eficácia destes de forma combinada e não combinada contra o patógeno *A. welwitschiae* e o controle da podridão vermelha em mudas do sisal. Este trabalho é o primeiro a reportar o uso combinado de espécies de *Trichoderma* para biocontrole de podridão vermelha do sisal em condições, e a reportar a espécie *Trichoderma lentiforme* como biocontrolador de doença de planta.

Neste trabalho, foi observado que mesmo havendo reações de incompatibilidade durante o pareamento interespecífico entre as espécies de *Trichoderma*, estas não anulam a capacidade de antagonismo contra *A. welwitschiae*. A combinação dessas espécies foi significativamente eficiente para o controle da podridão vermelha do sisal em mudas de sisal.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos isolados

As espécies de *Trichoderma* utilizadas nos testes de compatibilidade de antagonismos contra *A. welwitschiae* foram obtidas da coleção de isolados de *Trichoderma* do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, sendo estes codificados como R39, R72, R75, R78, C153, TCS1 e TCS35.

O patógeno *A. welwitschiae* também foi obtido da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e identificado conforme Duarte et al. (2018).

2.2. Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma*

Para a identificação molecular todos os isolados foram reativados em meio de cultura MEA (malt extract agar), e incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 5-10 dias, com o acompanhamento do crescimento diariamente. Após o crescimento, todos os isolados tiveram o DNA total extraído utilizando o FastDNA Spin Kit (Mp Biomedicals, Lote:103927) e purificado utilizando o High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Lote:21538900), seguindo as recomendações dos fabricantes.

O DNA total de todas amostras foi analisado qualitativamente e quantitativamente por eletroforese em gel e em espectrofotômetro Nanodrop 1000ND (Thermo Scientific, USA). Para todos os isolados foi feita a reação em cadeia da polimerase 37 (PCR) utilizando os primers ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') para a amplificação da região interna transcrita que abrangem as regiões ITS1-5.8S-ITS2 do código de barras primário de fungos (White et al., 1990), primers Cal-228F (5'-GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC-3') e Cal-737R (5'-CATCTTTCTGGCCATCATGG-3') para amplificação da região da Calmodulina (Carbone e Kohn, 1999) e primers EF-728M (5'-CATYGAGAAGTTCGAGAAGG-3') e EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') para amplificação da região do fator de alongação (EF) (Carbone e Kohn, 1999; Rehner 2001).

A reação de PCR foi realizada utilizando o Kit 4G Taq DNA Polimerase em volume final de 50 μL , contendo 10 μL de tampão 5X KAPA, 3,0 μL de MgCl_2 (25mM), 1 μL de DNTP (10mM), 1 μL de primer Direto (10 pmol), 1 μL de primer Reverso (10

pmol), 1 μL de DMSO (Absoluto), 1,5 μL de BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 5 μL de Betaína (5M), 0,2 μL de Taq (5U/ μL), 25,3 μL ddH₂O, e 1 μL de DNA. A reação de PCR foi realizada em termociclador Biocycler e Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), com a seguinte programação: desnaturação inicial: 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação: 94°C por 1 minuto; anelamento: 55°C por 1 minuto; extensão: 72°C por 1 minuto, e extensão final: 72°C por 5 minutos.

Para verificar a amplificação do fragmento de interesse, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% utilizando o tampão TBE 1X (Tris-Borato EDTA 0,5 M pH 8,0) com adição de gelred. Todos os amplicons foram purificadas utilizando EDTA 125 mM, etanol 70%, e etanol absoluto. Para o procedimento, 45 μL do produto de PCR amplificado foi misturado com 11,25 μL de EDTA e 135 μL de etanol absoluto, a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 25 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, 120 μL de etanol 70% foram adicionados aos tubos, estes foram homogeneizados por inversões sucessivas e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o etanol residual foi evaporado durante 20 minutos a uma temperatura de 37°C. O DNA foi ressuspenso em 10 μL de água Milli-Q autoclavada e incubado a 37°C por 20 minutos.

Após a purificação, 100 ng de DNA genômico de cada amostra foi enviado para sequenciamento por eletroforese capilar em sequenciador automático DNA sequencer ABI3730TM (Applied Biosystems) na empresa Myleus Biotechnology. Todas as sequências obtidas foram editadas e as sequências consenso geradas no software Geneious® 9.0.5. As sequências consenso foram submetidas ao Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para comparação e identificação por análise de similaridade com o banco de dados de sequência de nucleotídeos (nr) do NCBI (GenBank).

2.3. Teste de compatibilidade entre os isolados de *Trichoderma*

Para a avaliação da interação entre os isolados de *Trichoderma*, as combinações foram selecionadas com base nos seus mecanismos de ação, sendo: R75 - antibiose, sem competição; R72, R78, R39 e TCS35 - produção de compostos voláteis, micoparasitismo e competição; TCS1 - produção de compostos voláteis e competição; e C153 - micoparasitismo e competição (Barbosa, 2019). As combinações foram definidas a partir da seleção do isolado R75 (único com antibiose e sem competição), juntamente com

outros isolados, resultando nas combinações: R75+R39; R75+R72; R75+R78; R75+C153; R75+TCS1; e R75+TCS35.

As culturas preservadas em água esterilizada, pelo método Castellani (1939) foram reativadas em meio BDA (batata-ágar-dextrose), durante sete dias a $25\pm 2^\circ\text{C}$ em câmara BOD com fotoperíodo 12 horas. Discos (5mm) da borda de cada colônia foram transferidos para placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura BDA, utilizando a metodologia clássica de cultura pareada/co-cultura (Mariano, 1993). Como controle, discos de cada isolado foram posicionados individualmente em placas contendo meio BDA.

Placas com microcultivos entre os isolados de *Trichoderma* também foram preparadas para posteriores observações microscópicas, seguindo o mesmo processo de duplo pareamento, com adição de uma lamínula nas placas. Os ensaios de microcultivo foram analisados sete dias após o período de incubação. Todas as culturas foram incubadas em câmara BOD com fotoperíodo de 12h à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, e as medidas do crescimento das colônias foram realizados após 5 e 7 dias. Com uma régua milimetrada, fez-se a medição do diâmetro das colônias. Cada tratamento foi composto por cinco repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial através da equação de Camporota (1985): $PI (\%) = (Dc-Dt/Dc)\times 100$, em que $PI (\%)$ = a porcentagem de inibição; Dc = diâmetro médio da colônia controle; e Dt = diâmetro médio da colônia dos isolados testados.

Testes de metabólitos voláteis entre as espécies de *Trichoderma* combinadas também foram realizados. Discos de micélio (5mm) de cada isolado foram posicionados individualmente em duas bases de placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo BDA e posteriormente as bases foram sobrepostas e vedadas com filme de PVC (Dennis & Webster, 1971). O controle consistiu em apenas um disco da colônia de um isolado transferido para uma das bases das placas de Petri. As placas com as culturas foram incubadas em câmara BOD a $25\pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12h por 7 dias. Os tratamentos foram compostos por cinco repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

2.4. Contagem de anéis formados nas hifas durante teste de compatibilidade

Um segundo ensaio de compatibilidade por pareamento foi realizado seguindo os mesmos parâmetros do teste mencionado no tópico 2.3 deste trabalho.

Três lamínulas previamente esterilizadas foram transferidas para o centro de cada placa de Petri onde se esperava observar a zona de interação entre os isolados. Após o crescimento das colônias, as lamínulas foram retiradas e transferidas para lâminas microscópicas e foram coradas com azul de lactoglicerol e visualizadas em microscópio óptico de luz. A contagem dos anéis formados pelas hifas dos isolados de *Trichoderma* foi feita observando-se todo o espaço das lamínulas.

2.5. Teste de antagonismo por pareamento

O potencial de biocontrole das espécies de *Trichoderma* contra *A. welwitschiae* foi avaliado usando o método de cultura dupla (Mariano, 1993) descrito no item anterior, em que *Trichoderma* spp. foram confrontados com *A. welwitschiae* (combinados e não combinados, ex.: R75+R78 x *A. welwitschiae* e R75 x *A. welwitschiae*). As culturas (antagonistas e patógeno) foram multiplicadas em meio BDA (batata ágar dextrose durante sete dias para *Trichoderma* e dez dias para *A. welwitschiae*, ambas com incubação à $25\pm 2^\circ\text{C}$ em incubadora BOD com fotoperíodo 12h, para posterior retirada de discos de 5mm de cada colônia em crescimento ativo. O diferencial neste pareamento duplo foi que ao invés de transferir apenas um disco de micélio de um dos antagonistas em posição equidistante ao disco de micélio do patógeno, foram transferidos dois discos que ficaram lado a lado. Como controle positivo, placas contendo meio BDA receberam disco de micélio apenas do patógeno. Todas as placas foram incubadas em incubadora BOD à $25\pm 2^\circ\text{C}$ por 10 dias, com uma avaliação feita no dia em que o controle cresceu por toda superfície da placa.

Como relatado no item 2.2 deste trabalho, para verificar a porcentagem de inibição do *A. welwitschiae*, o diâmetro das colônias foram medidos e utilizou-se a equação $PI(\%) = (Dc - Dt / Dc) \times 100$ para o cálculo da porcentagem de inibição. Ensaios de microcultivo foram realizados conforme descrito no item 1.2. Neste ensaio, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, e cada repetição foi constituída de três placas, sendo estas correspondentes a uma unidade experimental.

2.6. Antagonismo por metabólitos voláteis e não-voláteis

Como descrito no item 2.3 deste trabalho, testes de metabólitos voláteis entre as espécies de *Trichoderma* combinadas e individuais contra *A. welwitschiae* foram

realizados, seguindo o método de Dennis & Webster (1971). As placas foram incubadas em câmara BOD com fotoperíodo 12h a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10 dias.

O efeito dos metabólitos não-voláteis sobre *A. welwitschiae* foi testado de acordo com a metodologia de Mello et al. (2007), a partir do cultivo das espécies de *Trichoderma* em frascos de Erlenmeyer contendo 250 mL de meio de cultura BD (batata-dextrose) e incubados em agitador orbital a 150 rpm, a 25°C no escuro, no período de sete dias. Após a incubação, foi coletada a parte líquida por filtração em filtro de papel (com espessura: 0,20 mm e retenção de partículas de 4-7 μm) e gaze esterilizada, e posteriormente centrifugada a 2550 rpm por 3 minutos (centrífuga digital Cientec modelo CT-5000). Os filtrados de cada antagonista foram incorporados em meio BDA de forma combinada e não combinada (exemplo: combinado R72+R75 – 2,5 mL de filtrado de R72 + 2,5 mL de filtrado de R75, com total de 5 mL incorporados em 15 mL de BDA; não combinado: ex.: R72 – 5m L do filtrado incorporados em 15 mL de BDA (volumes para uma placa) e vertidos em placas de Petri.

Como controle, apenas água esterilizada foi adicionada em vez do filtrado ao meio BDA. Discos de micélio (5mm) do patógeno foram transferidos para o centro das placas de Petri contendo o meio de cultura suplementado com filtrado das culturas de *Trichoderma* spp. As placas foram incubadas em BOD com fotoperíodo 12h à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, e avaliadas no décimo dia, quando ao crescimento do patógeno. O ensaio foi avaliado no dia em que o fungo do tratamento controle atingiu as bordas da placa de Petri. A equação $\text{PI}(\%) = (\text{Dc}-\text{Dt}/\text{Dc})\times 100$ foi aplicada para determinar a porcentagem de inibição. Os tratamentos foram compostos por cinco repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

2.7. Análise da esporulação

Após o período de incubação das culturas pareadas e das culturas dos ensaios de metabólitos voláteis e não-voláteis referentes ao teste de antagonismo (por combinação e individual), fez-se a contagem de esporos para verificar se houve redução da esporulação do patógeno frente aos tratamentos.

As suspensões de esporos foram preparadas a partir da remoção de disco (5mm) de micélio da área de crescimento ativo do patógeno e transferência para microtubos com solução azul de lactofenol. Os tubos foram agitados em vórtex, a suspensão de esporos foi transferida para câmara de Neubauer e fez-se a contagem dos esporos para todos os

tratamentos. Após a contagem, utilizou-se a equação $C=N \times 2,5 \times 10^5$, sendo: C - à concentração da amostra que se deseja descobrir; N - número de conídios contabilizados na câmara; e $2,5 \times 10^5$ - fator de correção do quadrante.

2.8. Análise macro e microscópica das interações de compatibilidade e antagonismo

Alterações macro e microscópicas decorrentes dos pareamentos entre os isolados de *Trichoderma* foram descritas conforme Reaves e Crawford (1994). Interações entre os isolados de *Trichoderma* e o *A. welwitschiae* foram avaliadas seguindo alguns aspectos descritos por Boddy (2000) que podem ocorrer em culturas duplas, sendo estes: i) ocorrência de inibição de contato, no qual os isolados param o crescimento sem apresentar halo – zona clara; ii) inibição com presença de zona clara, tratada como inibição à distância, sendo que as espécies não crescem na área de crescimento da outra; iii) supercrescimento de micélio de um isolado sobre o outro; iv) substituição de micélio dos fungos interagentes; e v) substituição mútua – os fungos invadem o espaço um do outro.

Lâminas microscópicas foram preparadas a partir de culturas puras do patógeno para serem usadas como controle. Alterações nas hifas e conidióforos foram avaliadas por microscopia óptica de luz, a partir de lâminas preparadas por técnica de microcultivo e coloridas com azul de lactoglicerol. As imagens foram obtidas no microscópio marca Leica DM 750, com câmera modelo ICC 50 HD.

2.9. Testes de inoculação em mudas de sisal

2.9.1. Obtenção das mudas de sisal

Bulbilhos de sisal foram coletados de plantas sadias na região sisaleira do município de Valente, Bahia, Brasil. Os bulbilhos foram selecionados para padronização do tamanho e sanidade e em seguida plantados em solo esterilizado e cultivados em casa de vegetação até atingirem a altura de aproximadamente 20 cm para a aplicação dos tratamentos.

2.9.2. Preparação das suspensões de esporos para inoculação e aplicação

Conforme Santos et al (2009), com adaptações, discos (5mm) de micélio da margem das colônias de cada isolado (*Trichoderma* spp. ou *A. welwitschiae*) foram transferidos para sacos sanfonados de polietileno com filtro para trocas gasosas, contendo

200g de arroz parboilizado previamente umedecido e esterilizado em autoclave a 120 °C por 30 minutos. Cada saco foi devidamente identificado de acordo com o isolado e incubado em BOD a 25°±1°C com fotoperíodo de 12 h, e agitados a cada 3 dias até a observação de máxima colonização do substrato pelo fungo (\cong 15 dias).

Após o crescimento dos fungos, aproximadamente 30 g de arroz colonizado foram transferidos para frascos de Erlenmeyer e homogeneizados em 30 mL de água destilada esterilizada, com 0,03% de Tween 20, formando uma suspensão matriz. Cada suspensão matriz foi filtrada em gaze esterilizada, e em seguida, alíquotas (100 μ L) dessas suspensões de conídios foram diluídas na proporção 1/10 e fez-se a contagem de conídios em câmara de Neubauer em microscópio óptico de luz.

A mistura de suspensões dos isolados que foram combinados foi realizada após o ajuste da concentração das suspensões (1×10^7 esporos/mL) de cada tratamento individual, em seguida $\frac{1}{2}$ da suspensão de R72 foi transferida para um tubo de centrifuga e adicionados mais $\frac{1}{2}$ da suspensão de R75 e homogeneizados formando o tratamento R72+R75, por exemplo.

2.9.3. *Inoculação de A. welwitschiae e aplicação de Trichoderma spp. em mudas de sisal*

Para a inoculação das mudas de sisal foram feitos dois microferimentos (\cong 3 mm de profundidade) equidistantes em lados opostos do caule das mudas de sisal, com uma agulha hipodérmica esterilizada. Em seguida, 1 mL de suspensão de esporos dos isolados de *Trichoderma* foi inoculada (1mL) nos mesmos ferimentos na planta, utilizando dez plantas para cada tratamento. Como controle negativo, água destilada e esterilizada foi aplicada nas lesões. Após 24 horas, a suspensão de esporos (1×10^6 esporos/ mL⁻¹) de *A. welwitschiae* foi inoculada em cada uma das lesões feitas anteriormente. Como controle positivo, apenas a suspensão de esporos do patógeno foi inoculada nas plantas.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com irrigação a cada três dias. As plantas foram observadas diariamente para o aparecimento dos sintomas externos e, após 40 dias de inoculação avaliou-se a incidência da doença (presença ou ausência de sintomas externos da podridão vermelha). Em seguida, as plantas foram colhidas e cortadas verticalmente no caule e ao longo da região do meristema para avaliação dos sintomas internos para estimativa da severidade da doença, com base na escala de notas descrita por Barbosa (2019). O experimento foi conduzido em blocos casualizados

(DBC), com quatro blocos, quinze tratamentos, e dezesseis plantas por tratamento, totalizando 240 unidades amostrais.

2.10. Análise estatística

Neste trabalho, ANOVA, e os testes de Tukey, Skott-Knott e Shapiro-Wilk foram utilizados para gerência e análise dos dados. Foi empregado o Software R© versão 3.4.4.

3. Resultados

3.1. Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma*

A partir da análise do sequenciamento de DNA, foi obtida a identificação de todos os isolados de *Trichoderma* a nível de espécie, sendo: C153, R72 e TCS35 – *Trichoderma harzianum*; R39 e R78 – *T. koningiopsis*; R75 – *T. saturnisporum*, e TCS1 – *T. lentiforme* (Tabela 1).

Tabela 1 Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma*

Strains	Region	Contig	Species	BLAST Result		
				ID*	Coverage	e-value
R39	ITS**	Yes	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	0	100
	CaM***	Yes	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99.79	0	100
	tef****	Yes	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99.46	0	100
R72	ITS	Yes	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	0	100
	CaM	Yes	<i>Trichoderma harzianum</i>	99.78	0	97
	tef	Yes	<i>Trichoderma harzianum</i>	98.62	0	100
TCS1	ITS	Yes	<i>Trichoderma lentiforme</i>	99.67	0	100
	CaM	Yes	<i>Trichoderma lentiforme</i>	99.78	0	100
	tef	Yes	<i>Trichoderma lentiforme</i>	99.35	0	100
C153	ITS	Yes	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	0	100
	CaM	Yes	<i>Trichoderma harzianum</i>	99.52	0	100
	tef	Yes	<i>Trichoderma harzianum</i>	99.78	0	100
R78	ITS	Yes	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	100	0.0
	CaM	Yes	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	99.61	0.0
	tef	Yes	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100	100	0.0
TCS35	ITS	Yes	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	0	100
	CaM	Yes	<i>Trichoderma harzianum</i>	99.78	0	97
	tef	Yes	<i>Trichoderma harzianum</i>	98.99	0	100
R75	ITS	Yes	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	100	0	100
	CaM	Yes	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	98.50	0	40
	tef	Yes	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	97.35	0	99

*ID: Identity;

**ITS: Internal Transcribed Spacer;

***CaM: Calmodulin;

****tef: Translation Elongation Factor

3.2. Avaliação da compatibilidade entre as espécies de *Trichoderma*

Observou-se inibição do crescimento micelial entre todas as interações das espécies de *Trichoderma*. O isolado R75 foi inibido em quase todas as combinações pelos demais isolados. Dentre os fungos combinados com R75, apenas R39 foi inibido (56,63%) significativamente ($p < 0.05$) (Figura1). As características macroscópicas das culturas nos ensaios das interações revelaram que houve inibição principalmente por competição.

Nos testes de metabólitos voláteis, R75 também foi inibido significativamente ($p < 0.05$) pelas outras espécies em todas as combinações. O isolado mais inibido por R75 foi TCS35 (12,4%) quando comparado às demais combinações (Figura2).

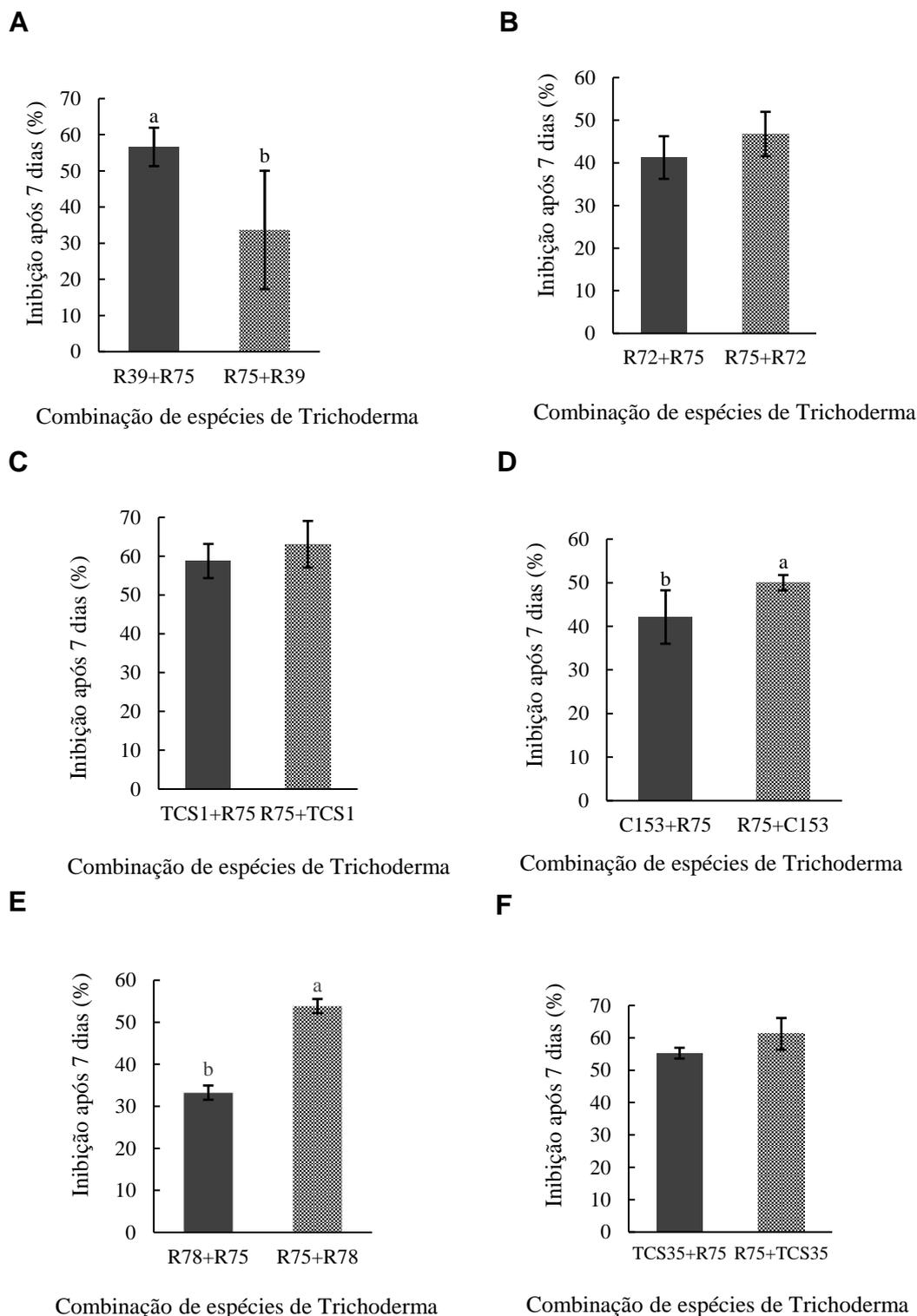


Fig.1 Porcentagem de inibição para teste de compatibilidade entre espécies de *Trichoderma* por pareamento. Colônias avaliadas após sete dias de crescimento em meio BDA a 25°C sob fotoperíodo de 12h. Barras cinza-escuro representam a redução no diâmetro da colônia das demais espécies de *Trichoderma* em função do isolado R75. Barras cinza-claro representam a porcentagem de redução no diâmetro da colônia do isolado R75 reduzida em função das demais espécies de *Trichoderma*. Médias que não apresentam letras minúsculas sobre as barras não podem ser consideradas diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todos os dados seguem distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância. **A)** CV: 30.13%; **B)** CV: 12.96%; **C)** CV: 9.66%; **D)** CV: 10.95%; **E)** CV: 4.34%; **F)** CV: 7.02%

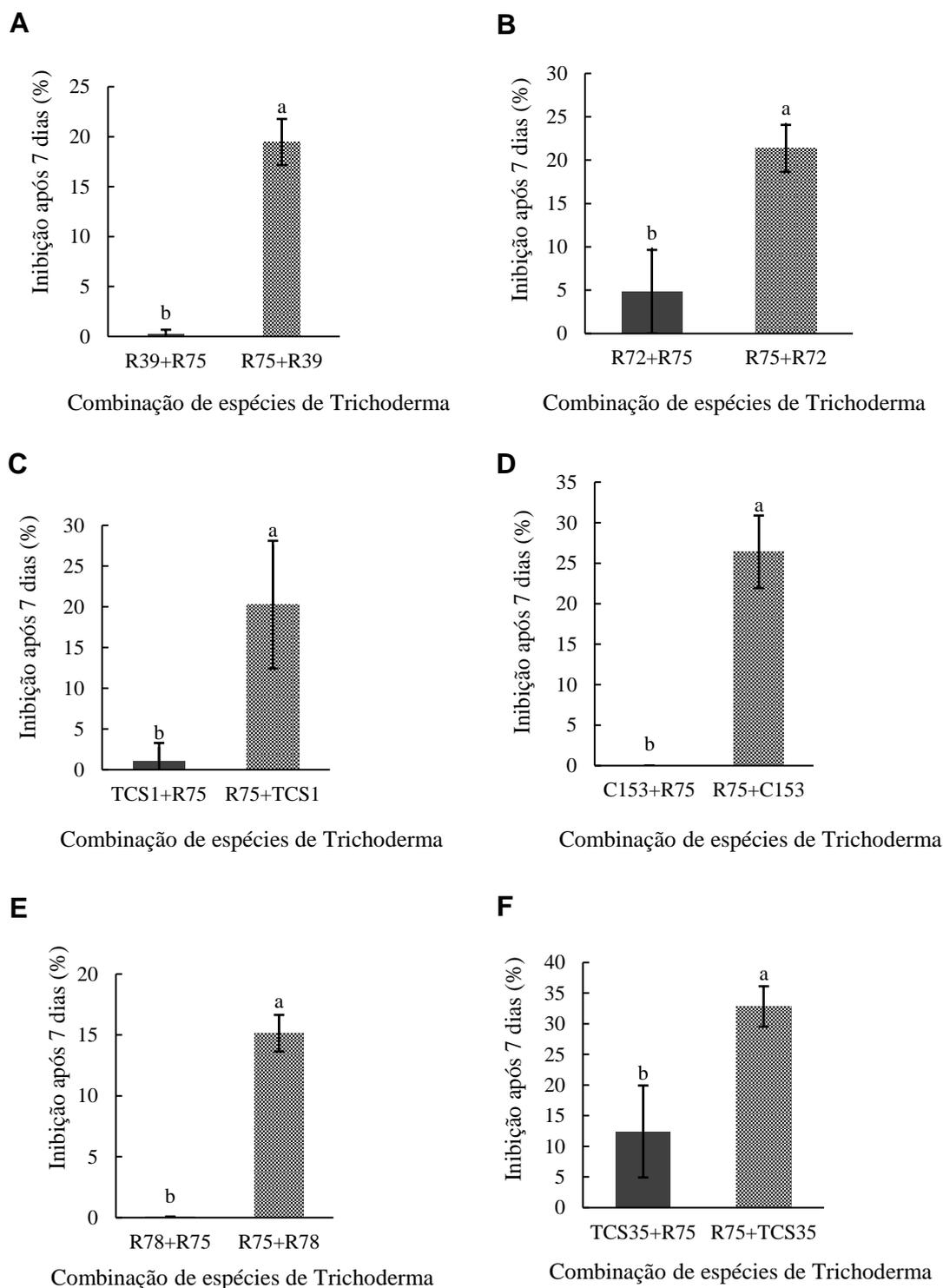


Fig. 2 Porcentagem de inibição nos testes de compatibilidade entre espécies de *Trichoderma* por metabólitos voláteis. Colônias avaliadas após sete dias de crescimento em meio BDA a 25°C sob fotoperíodo de 12h. Barras cinza-escuro representam a redução no diâmetro da colônia das demais espécies de *Trichoderma* em função do isolado R75. Barras cinza-claro representam a redução no diâmetro da colônia do isolado R75 reduzida em função das demais espécies de *Trichoderma*. Médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todos os dados seguem distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância. **A)** CV: 18.9%; **B)** CV: 33.38%; **C)** CV: 60.28%; **D)** CV: 26.81%; **E)** CV: 15.68%; **F)** CV: 28.63

Nas observações microscópicas das combinações de *Trichoderma* foi constatada considerável ocorrência de hifas enoveladas (em forma de anéis) com diâmetro dos anéis formados variando entre 11µm a 20µm (Figura 3; 3A e 3B). Características de micoparasitismo e formação de clamidósporos intercalados e terminais, e anastomose também foram observados na associação de R72+R75 (Figura 3). A partir da contagem desses anéis, constatou-se um aumento na formação de hifas enoveladas, em forma de anéis, quando em associação com o isolado R75 (Figura 4).

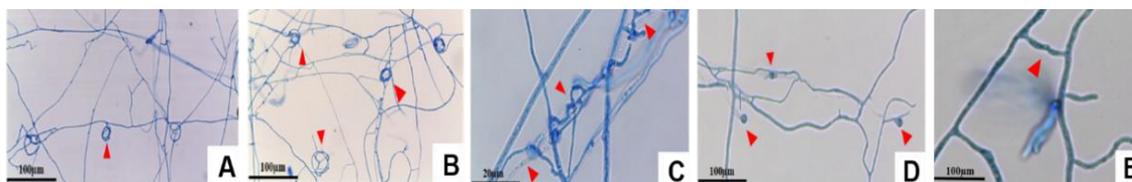


Fig. 3 Aumento de 400x (exceto imagem C e E- aumento de 1000x). (A) combinação R75+TCS35; (B) combinação R75+C153; (C) combinação R75+C153. As figuras A e B apresentam enrolamentos terminais e intercalados nas hifas dos isolados. (C) micoparasitismo nas hifas de um isolado sobre outro, e hifas “vazias” com perda de material citoplasmático; (D) formação de clamidósporos terminais e intercalados; (E) formação de ponte de anastomose nas hifas. As figuras C, D e E correspondem ao exame microscópico da combinação R75+R72

3.3. Avaliação da interação dos isolados de *Trichoderma spp.* x *A. welwitschiae* (pareamento)

Todos os isolados de *Trichoderma* nas formas combinadas e não combinadas demonstraram algum tipo de antagonismo ao *A. welwitschiae* e os mecanismos antagônicos predominantes foram de competição e antibiose. Os tratamentos que apresentaram maiores taxas de inibição ($p < 0.05$) do crescimento micelial de *A. welwitschiae* foram: C153 (78.15%); R39 (79.46%); R72 (78.46%); TCS1 (77.90%); C153+R75 (81,35%); R39+R75 (78.62%); TCS1+R75 (78.99%) e TCS35+R75 (78.61%). A menor taxa de inibição por tratamento não combinado foi exibida por R75 (*T. saturnisporum*), com 62.10% em relação ao controle (Tabela 2).

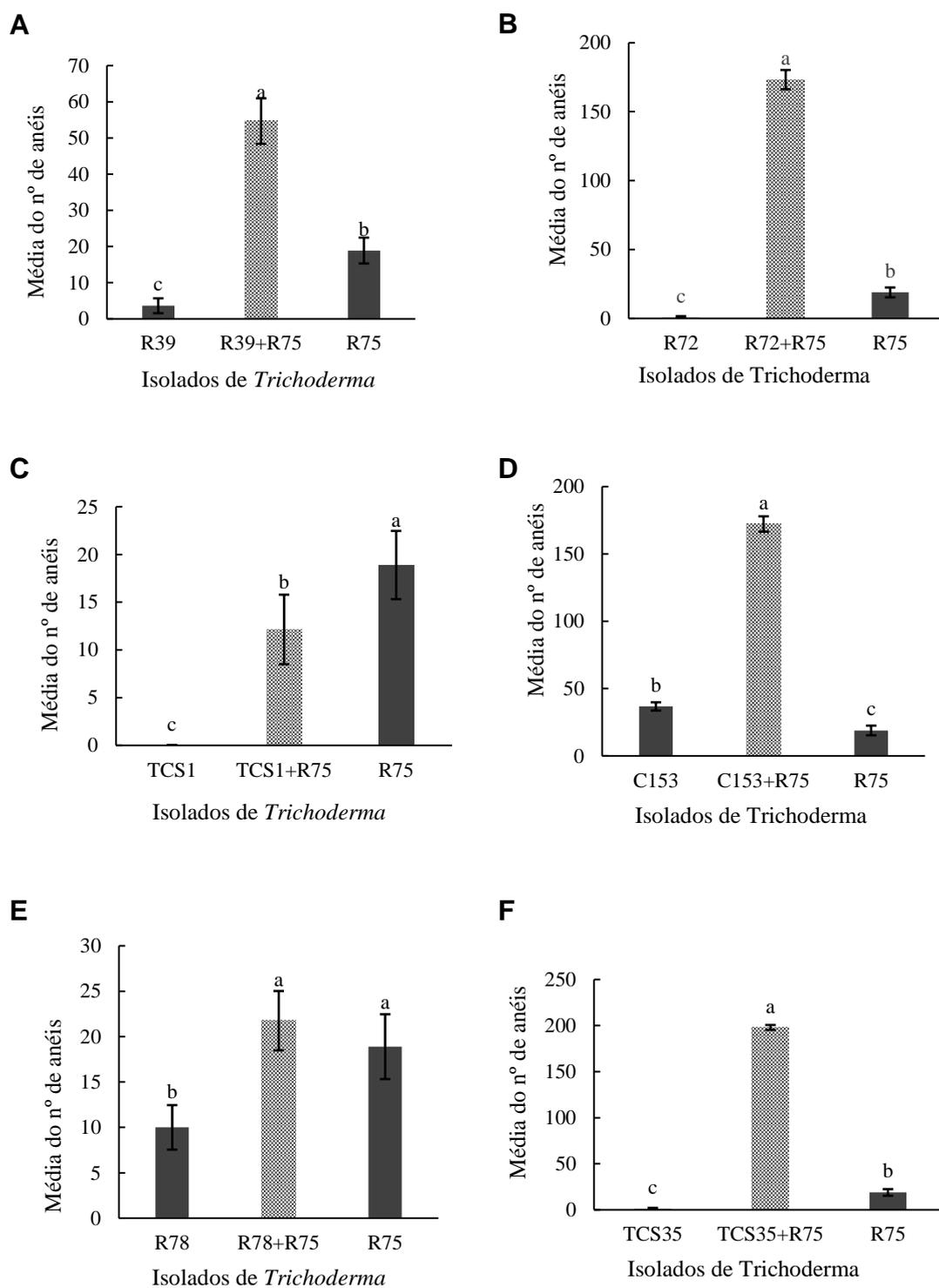


Fig. 4 Formação de anéis nas hifas de *Trichoderma* spp. com e sem associação do isolado *T. saturnisporum* (R75). Barras nas cores cinza-escuro representam isolados não combinados, enquanto barras cinza-claro representam a combinação entre espécies de *Trichoderma*. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas sobre as barras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todos os dados seguem distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância. **A)** 19.18%; **B)** CV: 7.84%; **C)** CV: 30.10%; **D)** CV: 6.1%; **E)** CV: 19.81%; **F)** CV: 4.16%

Tabela 2 Médias (%) da redução de esporos, inibição micelial após 10 dias de *A. welwitschiae* através do pareamento com formas combinadas e não combinadas de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Redução da esporulação (%) (Pareamento)	Tratamentos	Redução do diâmetro da colônia (%) (Pareamento) *
R72	99.04 a	C153+R75	81.35 a
R72+R75	97.76 a	R39	79.46 a
TCS1+R75	96.98 a	TCS1+R75	78.99 a
C153	95.13 a	R39+R75	78.62 a
R78+R75	93.44 a	TCS35+R75	78.61 a
C153+R75	91.59 b	R72	78.46 a
TCS1	91.30 b	C153	78.15 a
R75	89.71 b	TCS1	77.90 a
R39	88.55 b	TCS35	76.86 b
R39+R75	84.92 b	R78+R75	76.33 b
TCS35	82.02 b	R72+R75	75.22 b
R78	81.56 b	R78	73.53 b
TCS35+R75	57.39 c	R75	62.10 c
Controle	0.00 d	Controle	0.00 d
CV (%)	13.82	CV (%)	7.58

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro das colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e não diferem significativamente entre si.

*As médias referentes ao diâmetro das colônias foram submetidos à transformação angular do arcosen ($\sqrt{x}/100$) visando atender as pressuposições da análise de variância.

Pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk a 5%) todos os dados representados apresentam distribuição normal

Os tratamentos TCS35 (76.86%) e R72+R75 (75.22%) foram os únicos a diferirem significativamente no potencial de inibição do patógeno, considerando o fator combinação (Tabela 2). O efeito dos isolados de *Trichoderma* em sua forma combinada e não combinada sobre a redução da esporulação de *A. welwitschiae* foi constatado para todos os tratamentos. Os maiores percentuais de redução de esporos do patógeno foram observados nos tratamentos R72 (99.04%); R72+R75 (97.76%); TCS1+R75 (96.98%); C153 (95.13%); e R78+R75 (93.44%). Foi evidenciado estatisticamente que a combinação de *T. saturnisporum* (R75) com as espécies *T. koningiopsis* (R78) e *T. lentiforme* (TCS1) causou um aumento no percentual de redução dos esporos do patógeno, enquanto para o isolado TCS35, houve o decréscimo no percentual de redução de esporos. Ressalta-se que o tratamento com o isolado *T. harzianum* (C153) na ausência de *T. saturnisporum*, foi significativamente mais eficiente na redução de esporos do patógeno, quando comparado à sua forma combinada (Tabela 2).

3.4. Avaliação da interação dos isolados de *Trichoderma spp.* x *A. welwitschiae* (metabólitos voláteis e não-voláteis)

Os metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* foram eficientes em causar a redução da esporulação de *A. welwitschiae* (Tabela 3).

Os tratamentos com os isolados C153, R39 e R72 foram inferiores no percentual de redução quando comparados às suas formas combinadas. Com exceção da combinação TCS35+R75, todas as outras reduziram em 100% a esporulação do patógeno.

Quanto à atividade antagônica sobre a colônia do patógeno, houve variação entre a maioria dos tratamentos, e a combinação R72+R75 (83.61%) foi a mais eficiente na inibição do crescimento micelial de *A. welwitschiae*, comparado aos demais tratamentos, e à forma não combinada de R72 (59.72%).

Tabela 3 Médias (%) da redução da esporulação e da inibição do crescimento micelial após 10 dias de *A. welwitschiae* através de testes de metabólitos voláteis com formas combinadas e não combinadas de *Trichoderma spp.*

Tratamentos	Redução da esporulação (%) (Metabólitos voláteis)	Tratamentos	Redução do diâmetro da colônia (%) (Metabólitos voláteis)
R75	100 a	R72+R75	83.61 a
R78	100 a	TCS35+R75	78.88 b
TCS1	100 a	R39	77.22 c
TCS35	100 a	TCS35	76.38 c
C153+R75	100 a	TCS1	75.55 c
R39+R75	100 a	R39+R75	75 c
R72+R75	100 a	TCS1+R75	74.16 d
R78+R75	100 a	C153+R75	73.05 d
TCS1+R75	100 a	R78	71.94 d
TCS35+R75	91.21 b	R78+R75	67.5 e
R72	46.83 c	C153	65 e
C153	40.15 d	R75	60.83 f
R39	33.04 e	R72	59.72 f
Controle	0.00 f	Controle	0.00 g
CV (%)	6.92	CV (%)	7.33

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro das colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e não diferem significativamente entre si.

Todos os dados foram submetidos à transformação angular do arcsen ($\sqrt{x}/100$) visando atender as pressuposições da análise de variância.

Pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk a 5%) todos os dados representados apresentam distribuição normal

Os metabólitos não-voláteis também exerceram algum tipo de inibição sobre a esporulação e o crescimento micelial de *A. welwitschiae*.

Em relação à esporulação, R75 (96.98%) foi mais eficiente, quando comparado aos demais, enquanto para redução de crescimento, a combinação dos filtrados de

C153+R75 (52.77%) foi mais eficaz, quando comparado aos demais e à sua forma individual C153 (22.27%) (Tabela 4).

Tabela 4 Médias (%) da redução da esporulação e da inibição do crescimento micelial de *A. welwitschiae*, após 10 dias de incubação dos ensaios de metabólitos não-voláteis com formas combinadas e não combinadas de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Redução de esporulação % (Metabólitos não-voláteis)	Tratamentos	Redução do diâmetro da colônia % (Metabólitos não-voláteis)
R75	96.98 a	C153+R75	52.77 a
C153	94.14 b	R78+R75	44.16 b
R39	83.66 c	R39	43.61 b
R78+R75	81.68 d	TCS1+R75	42.77 b
TCS1+R75	79.89 e	R72	41.66 b
R72	71.09 f	TCS1	28.61 c
R39+R75	68.40 g	R75	26.94 c
TCS35	64.99 h	R78	25.55 c
TCS1	61.57 i	C153	22.27 c
R78	60.86 i	R39+R75	18.66 d
R72+R75	54.03 j	TCS35	0.00 e
C153+R75	53.85 j	R72+R75	0.00 e
TCS35+R75	44.16 k	TCS35+R75	0.00 e
Controle	0.00 l	Controle	0.00 e
CV (%)	2.25	CV (%)	2.85

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro das colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e não diferem significativamente entre si.

Todos os dados foram submetidos à transformação angular do arcosen ($\sqrt{x/100}$) visando atender as pressuposições da análise de variância.

Pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk a 5%) todos os dados representados apresentam distribuição normal

3.5. Características macro e microscópicas observadas a partir das interações antagonista – patógeno

A análise macroscópica mostrou que na forma combinada, o mecanismo de antagonismo predominante contra *A. welwitschiae* foi de competição através de contato micelial sem formação de halo (zona clara) e, em alguns casos, de supercrescimento com sobreposição de micélio na colônia do patógeno. As mesmas características aplicam-se para os tratamentos não combinados, com exceção de R75 (*T. saturnisporum*) que apresentou inibição à distância com formação de halo (Figura 5).

As interações que envolviam isolados de *Trichoderma* combinados e não combinados apresentaram modificações principalmente nos conidióforos do *A. welwitschiae*, como torções e enrolamento em outras hifas e germinação anormal partindo diretamente nas fiálides (Figura 6). Também ocorreu a formação de anéis nas hifas dos isolados de *Trichoderma* idênticas às observadas nos testes de compatibilidade.

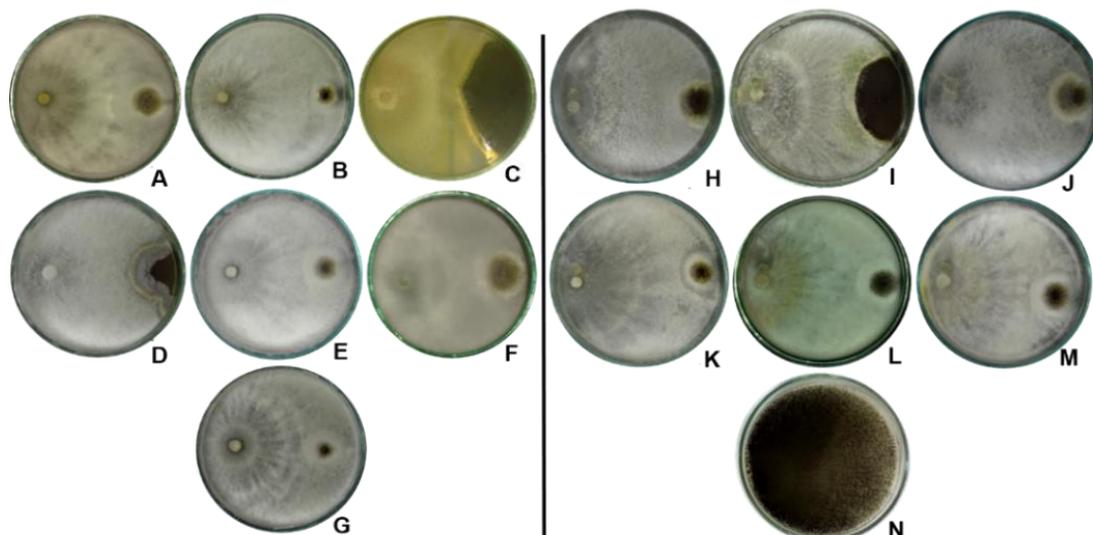


Fig. 5. Teste de antagonismo entre espécies de *Trichoderma* não combinadas (grupo da esquerda: **A a G**) e combinadas (grupo da direita: **H a M**) contra o patógeno *A. welwitschiae* (colônia que se apresenta sempre à direita em todas as placas) através de duplo pareamento em meio BDA à $25\pm 2^\circ\text{C}$ após 10 dias. Em relação aos não combinados: (**A, B, D, E, F e G**) isolados R39, R72, R78, C153, TCS1 e TCS35 respectivamente com supercrescimento em relação ao patógeno, onde (**D e F**) sobrepõem o micélio da colônia de *A. welwitschiae*; (**C**) R75 com presença de zona clara/halo durante interação com *A. welwitschiae*. Quanto aos tratamentos combinados: (**H, J, K, L e M**) combinações R75+R39, R75+R78, R75+C153, R75+TCS1 e R75+TCS35, respectivamente com supercrescimento em relação ao patógeno, onde (**H e J**) sobrepõem o micélio de *A. welwitschiae*; (**I**) inibição por competição com zona de contato entre R75+R72 x *A. welwitschiae* (**N**) controle representado por colônia única de *A. welwitschiae*

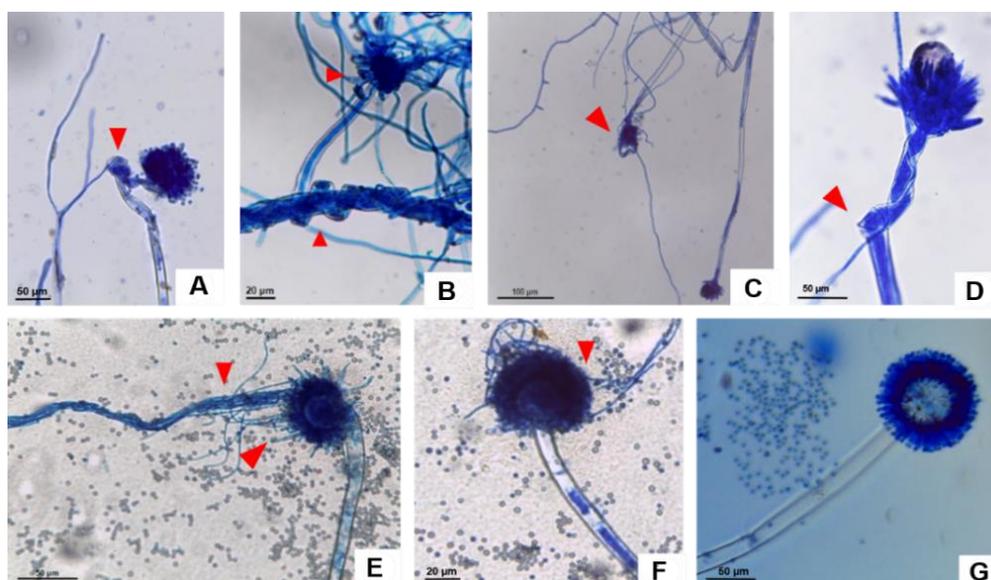


Fig. 6 Alterações em conidióforos de *A. welwitschiae* pós teste de antagonismo entre combinados e não combinados de *Trichoderma*. Lâminas preparadas a partir da zona de interação entre os isolados. Aumento de 400x e 1000x (**A, B, C e D**) – R39+R75: conidióforos retorcidos (setas vermelhas); (**E e F**) – C153+R75: germinação anormal nos conidióforos de *A. welwitschiae* partindo diretamente das fiálides; (**G**) conidióforo de *A. welwitschiae* a partir de cultura pura

3.6. Tratamento de mudas de sisal com as espécies de *Trichoderma* combinadas e não combinadas

A eficiência das espécies de *Trichoderma* em diminuir a incidência da podridão nas mudas de sisal foi observada nos tratamentos TCS1+ R75 com redução de 62.50%, e C153 com 56.50% (Tabela 5).

Tabela 5. Médias (%) da redução da incidência e severidade da podridão vermelha em mudas de sisal com o tratamento de formas combinadas e não combinadas de *Trichoderma* spp., após 40 dias de inoculação.

Tratamentos	Redução de Incidência da doença (%)	Tratamentos	Redução da Severidade da doença (%)
Controle (-)	100 a	T2	100 a
R75+TCS1	62.50 b	T4	78 a
C153	56.50 b	T1	76.50 a
R75	43.75 c	T9	76.50 a
R75+C153	37.50 c	T13	60.25 b
TCS35	37.50 c	T10	54 b
R75+R72	25 c	T6	48.50 b
R75+R39	25 c	T5	47.75 b
R75+TCS35	25 c	T14	47.25 b
TCS1	18.75 c	T3	47.25 b
R39	18.75 c	T11	47 b
R75+R78	12.50 c	T12	46.75 b
R78	12.50 c	T15	46.50 b
R72	12.50 c	T7	41.50 b
Controle (+)	0.00 c	T8	5.50 c
CV (%)	67.84	CV (%)	31.71

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro das colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade e não diferem significativamente entre si.

Pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk a 5%) todos os dados representados apresentam distribuição normal

Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente do controle positivo com apenas *A. welwitschiae*. Os tratamentos TCS1+R75, R75, C153, TCS35 reduziram significativamente a severidade da doença em 78%, 76.50%, 68.67%, e 60.25%, respectivamente, quando comparados aos demais tratamentos e ao controle. Os tratamentos mencionados reduziram a severidade dos sintomas nos tecidos internos das mudas (Figura 7).

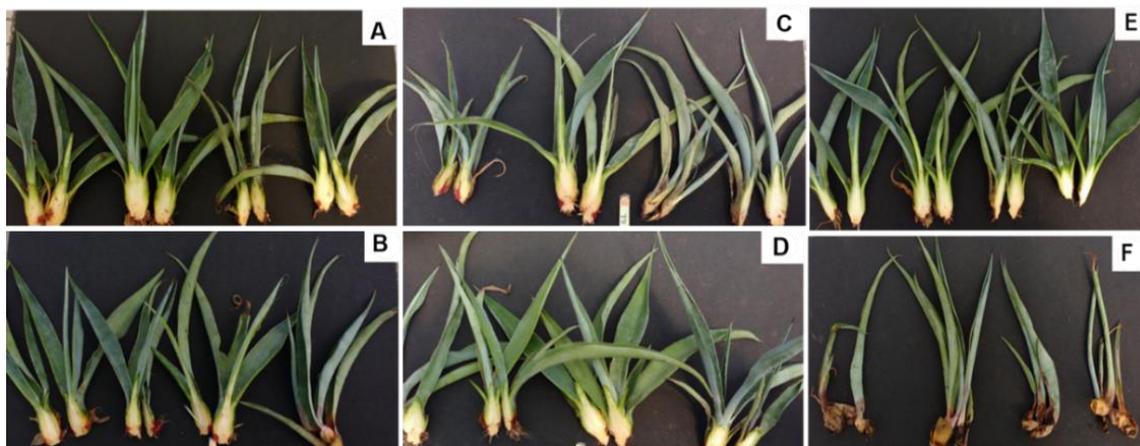


Fig. 7 Mudanças de sisal tratadas com *Trichoderma* spp. Corte feito após 40 dias de inoculação do patógeno e aplicação dos tratamentos. **A)** tratamento R75 (*T. saturnisporum*); **B)** tratamento C153 não combinado (*T. harzianum*); **C)** tratamento não combinado TCS35 (*T. harzianum*); **D)** tratamento combinado TCS1+R75 (*T. lentiforme* + *T. saturnisporum*); **E)** tratamento controle negativo (água); **F)** tratamento controle positivo (*A. welwitschiae*)

4. Discussão

Neste trabalho foi possível descrever seis características relevantes dos isolados de *Trichoderma*: i) apesar de alguns isolados serem da mesma espécie, estes se comportaram de formas diferentes durante os testes, o que pode ser explicado pelas particularidades fisiológicas de cada linhagem; ii) os isolados de *Trichoderma* quando combinados, apresentaram inibição e alterações microscópicas, mas estas não reduziram significativamente a capacidade antagônica *in vitro* dos isolados contra o *A. welwitschiae*, contudo, nos ensaios em bulbilhos de sisal, a atividade de biocontrole pode ser reduzida em alguns casos; iii) algumas combinações promovem efeitos de inibição diferentes dos efeitos observados pelos isolados não combinados; iv) uma das seis combinações foi mais eficiente, mostrando-se significativamente mais eficaz no controle, do que em sua forma individual; v) a depender do teste, o isolado *T. saturnisporum* pode influenciar de forma positiva, negativa ou ser indiferente quanto a capacidade de alguns isolados de *Trichoderma* em inibir o *A. welwitschiae* e de controlar a podridão vermelha do sisal.

Apesar dos poucos relatos na literatura sobre avaliação de compatibilidade entre espécies pertencentes ao mesmo gênero para fins de biocontrole, Reaves & Crawford (1994) fizeram estudos de pareamento *intra* e interespecíficos de espécies de *Trichoderma* e constataram compatibilidade vegetativa entre algumas combinações. A

formação das estruturas de “anéis” nas hifas, anastomose e clamidósporos terminais foram descritas. Segundo os autores, estas modificações associam-se às reações de antagonismo (exceto a anastomose) principalmente interespecies. Em se tratando dos enrolamentos, a hipótese pode ser rebatida neste trabalho, já que foram observados os mesmos enrolamentos nas hifas de culturas puras.

Quanto às estruturas circulares nas hifas, fungos nematófagos apresentam anéis de constrição, um mecanismo micoparasitário que envolve transdução de sinais, metabolismo e energia celular reguladas por diferentes vias de sinalização (Su et al. 2015). Contudo, de acordo com o observado neste trabalho, a característica constritiva dos anéis em *Trichoderma* spp. sobre o patógeno não se aplica.

López et al. (2019) observaram as mesmas estruturas nas interações *Trichoderma koningiopsis* x *Phoma* sp. e *T. koningiopsis* x *Fusarium oxysporum* e estas também são similares às recorrentes no fungo endofítico *Muscodora albus*, porém, não é explicitado como e porque essas estruturas se formam. O aumento no número de anéis durante a associação entre *T. saturnisporum* com os outros isolados é que pode estar relacionada à hipótese de resposta antagônica supracitada por Reaves & Crawford (1994).

A anastomose é formada em fungos micorrízicos arbusculares, com representação de compatibilidade vegetativa, e acarreta funções importantes como a migração nuclear, fluxo de nutrientes, homeostase micelial, etc. (Carlile et al. 1995). O processo pode ocorrer em *Trichoderma* spp., contudo, Barcellos & Kleiner (2003) relataram que, através do cruzamento de linhagens de *Trichoderma* via anastomose, colônias recombinantes instáveis foram obtidas, apresentando crescimento lento.

Levando em conta o argumento anterior, pode-se explicar a redução de atividade antagonista/competitiva da combinação da linhagem *T. harzianum* + *T. saturnisporum* (R72+R75) sobre *A. welwitschiae* em condições *in vitro* e *in vivo*, como mostrado neste trabalho, que neste caso, segundo Worrall (1997) e Novais et al. (2017) a anastomose pode ter gerado uma incompatibilidade vegetativa, levando a morte de compartimentos das hifas, causando ineficiência na capacidade de forrageamento e absorção, e logo redução da atividade de competição dos antagonistas em relação ao patógeno testado.

Em relação às observações *in vitro*, frente a capacidade de muitas espécies de *Trichoderma* produzirem uma variedade de metabólitos secundários tóxicos, a produção destes como antibióticos e enzimas líticas pode ter ocorrido e reduzido significativamente a esporulação do patógeno, como demonstrado neste trabalho (Harman et al., 2004; Monfil et al., 2014; Raut et al. 2014). Metabólitos de linhagens de *T. harzianum* (ácido

harziânico), *T. koningiopsis* (coningina), são conhecidos por inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos, como por exemplo *Sclerotinium rolfsii* (Saxena et al., 2015), *Pythium middletonii* (Vinale et al., 2014), *Corynespora casicola* (Pujad-Renaud et al., 2019).

O consórcio entre diferentes microrganismos na supressão de fitopatogênicos e aumento do desempenho fisiológico das plantas é uma opção muito considerável a ser aplicada, já que os diferentes mecanismos dos antagonistas podem atuar de forma sinérgica, e apresentarem resultados superiores aqueles à aplicação individual, como foi observado para a combinação *T. lentiforme* + *T. saturnisporum* (TCS1+R75) sobre a podridão vermelha do sisal, ou seja, diferentes linhagens que podem ter desencadeado processos diferentes e complementares, resultando na eficácia do controle da doença (Pascual, 2016; Woo & Pepe, 2018).

Ensaio de antagonismos *in vitro* de *Trichoderma* spp. têm apresentado bons resultados também na inibição de *A. niger* que pode servir como referência para testes de inibição contra *A. welwitschiae*. Nas condições em que *A. niger* é agente causal da podridão do colo do amendoim (Kumari & Singh, 2017), na planta, os autores obtiveram melhores resultados na redução da incidência da doença quando combinaram *T. harzianum* com a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, levando a compreender que é muito efetivo trabalhar com combinação de mecanismos de diferentes agentes de biocontrole.

As linhagens *T. harzianum* – C153 e *T. koningiopsis* – R39, se comportaram diferente das linhagens *T. harzianum* (TCS35, R72) e *T. koningiopsis* (R78) na inibição *in vitro* de *A. welwitschiae* na forma não combinada, e quando associados com R75 promoveram a germinação anormal dos esporos do patógeno. Este evento pode ser explicado pela própria diferença de linhagem, considerando particularidades fisiológicas dos fungos, e/ou efeitos de *T. saturnisporum*, que possui enzimas β -endoglucanases capazes de inibir conídios e crescimento de fitopatogênicos, como *Fusarium oxysporum* (Sharma, Salwan e Shanmugam, 2018).

As espécies *T. lentiforme* e *T. saturnisporum* merecem atenção especial pela eficácia na redução de incidência e severidade da podridão vermelha do sisal. São espécies com poucas descrições sobre atividade de biocontrole, comparadas às outras espécies identificadas neste estudo com sisal. Este trabalho é o primeiro a reportar a aplicação de *T. lentiforme* no controle de doença de planta e mostrar que esta espécie tem alta capacidade de inibir *A. welwitschiae*, e na planta, a sua atividade é otimizada quando associada a *T. saturnisporum*. A literatura traz abordagens recentes sobre *T. lentiforme*

no contexto industrial, como produtor de lipases potenciais para detergentes (Wang et al., 2018).

Em 2016, *T. saturnisporum* foi descrito pela primeira vez por Martínez et al. (2016) como sendo um agente promotor de crescimento de plantas, sendo produtor de sideróforos e ácido-indolacético (AIA), além de habilidade para controle de *Phytophthora capsici* e *Phytophthora parasitica*. Os autores reportaram que metabólitos voláteis do isolado suprimiu o crescimento micelial dos patógenos, e *in vivo* os sintomas da doença foram reduzidos. Essas características podem explicar a causa de *T. saturnisporum* ter apresentado eficiência no controle de *A. welwitschiae* sob condições de laboratório e casa de vegetação.

5. Conclusões

A combinação entre *Trichoderma* spp. pode: ser indiferente para o biocontrole; ser positiva e otimizar o efeito de biocontrole; gerar incompatibilidade e redução de atividade biocontroladora de alguma espécie em função de outra.

T. lentiforme e *T. saturnisporum* combinados são eficazes e recomendados para o biocontrole da podridão vermelha do sisal *in vivo*.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia-FAPESB, pelo financiamento da bolsa e apoio a infraestrutura de pesquisa na UFRB. À CAPES pelo apoio a pesquisa e pós-graduação com recursos financeiros para a pesquisa.

Referências

Abreu, KCLM (2010) Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia. Tese. Doutorado em Ciências Agrárias na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia 106p.

- Barbosa LO, Lima, JS, Magalhães, VC, Gava, CAT, Soares, ACF, Marbach, PA, Souza, JT (2018) Compatibility and combination of selected bacterial antagonists in the biocontrol of sisal bole rot disease. *Biocontrol*. doi: 10.1007/s10526-018-9872-x.
- Barbosa, LO (2019) Podridão vermelha do sisal: controle com *Trichoderma* spp., escala de notas e estudos histopatológicos. Tese. Doutorado em Ciências Agrárias na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 128 p.
- Barcellos FG, Kleiner AAP (2003) Genetic characterization of somatic recombination in *Trichoderma pseudokoningii*. *Braz J Microbiol*. 34:2.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiology*. 7: 249-260.
- Boddy L, (2000) Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiol Ecol*. 31: 185–194.
- Camporota P (1985) Antagonism in vitro of *Trichoderma* spp. vis-a-vis *Rhizoctonia solani* Kuhl. *Agronomie*. 5: 613-620.
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91:553–556.
- Carlile MJ (1995) The success of the hypha and mycelium. p. 3-19. In: Gow, NAR, Gadd, GM., eds. *The growing fungus*. Springer.
- Castellani A (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg*. 24: 270-276.
- Coutinho WM, Luz CH, Suassuna ND, Silva ORRF, Suinaga FA (2006) A podridão do tronco do sisal. Embrapa Algodão (Comunicado Técnico, 281).

- Candeias EL, Santos ML, Duarte EAA, Oliveira TAS, Bezerra JL, Soares ACF (2016) Fungos endofíticos de raízes de sisal antagonistas ao *Aspergillus niger*. *Agrotrópica*. doi: 10.21757/0103-3816.
- Dennis, CY, Webster, J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 41-48.
- Duarte EAA, Damasceno C, Oliveira TAS, Barbosa LO, Martins FM, Silva JRQ, Lima TEF, Silva RM, Kato RB, Bortolini DE, Azevedo V, Góes-Neto A, Soares ACF (2018) Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschieae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2018.01227.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019) Future Fibers: Sisal. Disponível via: <<http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/>> Acesso em maio de 2019.
- García-Mendoza AJ (2002) Los agaves de México. *Ciencias*, 87:14-23.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev*. doi: 10.1038/nrmicro797.
- Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito, M (2012) Special issue: *Trichoderma* – from basic biology to Biotechnology, 158:1-2.
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018) Produção Agrícola Municipal ano 2018. Disponível via < www.sidra.ibge.gov.br > Acesso em maio de 2018
- Kumari M, Singh M (2017) Management of collar rot disease of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) caused by *Aspergillus niger* through bio-agents. *Int J of Chemical Studies*. 5: 73-76.

- López AC, Alvarenga AE, Zapata PD, Luna MF, Villalba LL (2019) *Trichoderma* spp. from Misiones, Argentina: effective fungi to promote plant growth of the regional crop *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*. doi: 10.1080/21501203.2019.1606860.
- Mariano RLR (1993) Métodos de seleção “in vitro” para controle microbiológico. *Rev. Anual de Pat. de Plantas*. 1: 369–409.
- Martínez FD, Santos M, Carretero F, Marín F (2016) *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agente. *Sci Food Agric*. 96:1934-1944.
- Mello SCM, Ávila ZR, Braúna LM, Pádua RR, Gomes D (2007) Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. *Sacc Fitosanidad*. 11: 3-9.
- Monfil VO, Casas-Flores S (2014) Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture in G. *Biocontrol And Plant Growth Promotion Elsevier, México*, pp. 429-452.
- Mukherjee M, Mukherjee PK, Howitz BA, Zachow C, Berg G, Zeillinger S (2012). *Trichoderma – Plant –Pathogen Interactions: advances in genetics of biological control*. *Indian J Microbiol*. doi: 10.1007/s12088-012-0308-5.
- Novais CB, Pepe A, Siqueira JO, Giovannetti M, Sbrana C. (2017). Compatibility and incompatibility in hyphal anastomosis of arbuscular mycorrhizal. *Sci Agric*. doi: 10.1590/1678-992X-2016-0243.
- Pascual JA (2016) The Use of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Combination with *Trichoderma* spp. in Sustainable Agriculture. *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*. doi:10.1007/978-81-322-2779-3_7.
- Pujade-Renaud V, Déon M, Gazis R, Ribeiro S, Desailly F, Granet F, Chaverri P (2019) Endophytes from wild rubber trees as antagonists of the pathogen *Corynespora cassicola*. *APS Publications*. doi: 10.1094/PHYTO-03-19-0093-R.

- Raut I, Doni MB, Calin M, Oancea F (2014) Effect of Volatile and Non-Volatile Metabolites from *Trichoderma* spp. against Important Phytopathogens. *Rev. Chim*, 65: 11.
- Reaves JL, Crawford RH (1994) *In vitro* colony interactions among species of *Trichoderma* with interference toward biological control. Dep of Agr Forest Service. doi: 10.2737/PNW-RP-474.
- Rehner, SA (2011) Primers for elongation factor 1-alpha (EF1-alpha). Disponível via: www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf. Acesso em junho de 2019.
- Santos FJ, Ferreira JMS, Ribeiro VJO, Azevedo AGC (2009) Protocolo para produção massal de fungos entomopatogênicos II- *Hirsutella thompsonii*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 43 –Embrapa: 24.
- Saxena A, Raghuwanshi R, Singh HB (2015) *Trichoderma* species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. *J Basic Microbiol*. 55:195-206.
- Sharma V, Salwan R, Shanmugam V (2018) Molecular characterization of β -endoglucanase from antagonistic *Trichoderma saturnisporum* isolate GITX – Panog (C) induced under mycoparasitic conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. doi: 10.1016/j.pestbp.201806001.
- Su H, Zhao Y, Zhou J, Feng H, Jiang D, Zang K-Q, Yang J (2015) Trapping devices of nematode-trapping fungi: formation, evolution, and genomic perspectives. *Biological Reviews*. doi: 10.1111/brv.12233.
- Suinaga FA, Silva ORRF, Coutinho WM (2006). In: Andrade, W. (ed.) *O Sisal do Brasil*, 1.ed, Salvador.
- Stewart JR (2015) Agave as a model CAM crop system for a warming and drying world. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2015.00684.

- Strobel G, Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev.* doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.
- Vinale F, Sivasithamparan K, Ghisalberti EL, Woo EL, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Ruocco M, Lanzuise S, Manganiello G, Lorito M (2014) *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal.* 8: 127-139.
- Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol.* doi: 10.1038/nrmicro2910.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor, JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* Innis, MA.; Gelfand, DH.; Sninsky, JJ.; White, TJ., editors. New York: Academic Press. 315-322.
- Woo S, Pepe O (2018) Microbial Consortia: Promising Probiotics as Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2018.01801.
- Worrall JJ, Anagnost SE, Zabel RA (1997). Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. *Mycologia,* 89: 199–219.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese deste estudo era de que a combinação de espécies de *Trichoderma*, com diferentes mecanismos de ação, aumenta a eficiência de controle de *Aspergillus welwitschiae* e a podridão vermelha do sisal. A definição da combinação das espécies de *Trichoderma* partiu do conhecimento dos mecanismos de ação e eficiência dessas espécies no controle da podridão vermelha do sisal (Barbosa, 2019).

Sabe-se que o patógeno só penetra na planta com algum tipo de ferimento. Não se sabe se o *Trichoderma* também só age na planta quando inoculado através de um ferimento. Estudos sobre formas de inoculação dos isolados de *Trichoderma* necessitam ser aprofundados.

Neste estudo ficou demonstrado que a combinação de *T. saturnisporum* + *T. lentiforme* foi mais eficiente que o uso isolado de cada espécie de *Trichoderma*. Entretanto, em condições de campo, sob estresses abióticos e bióticos, pode ser que outras combinações sejam também eficientes, prevalecendo a ação de diferentes espécies de *Trichoderma*, a depender da condição ambiental. Estes aspectos devem ser avaliados em estudos futuros.

Ficou demonstrada a eficiência destes isolados de *Trichoderma*, combinados ou dissociados, no controle da podridão vermelha do sisal, o que deve ser avaliado em condições de campo na região semiárida da Bahia.