



## SELEÇÃO *IN VITRO* DE CEPAS PROMISSORAS DE *Trichoderma asperellum* PARA O CONTROLE DA REQUEIMA PRECOCE (*Alternaria solani*) DA BATATA

### SELECTION *IN VITRO* OF PROMISING STRAINS OF *Trichoderma asperellum* FOR THE CONTROL OF EARLY BLIGHT (*Alternaria solani*) OF POTATO CROP

Edwin Ronnie Gakegne<sup>1\*</sup> ; Benedicto Martínez Coca<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fazenda Agropecuária M&F *Fresh Local Produce*, Huambo-Catata, Angola.

<sup>2</sup> Centro Nacional de Saúde Agropecuária (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, CP 32700, Cuba.

\* Email para correspondência: [gakegneronnie@gmail.com](mailto:gakegneronnie@gmail.com)

#### RESUMO

A requeima precoce da batata, causada por *Alternaria solani*, é uma das doenças foliares mais disseminadas e importantes dessa cultura em áreas com condições climáticas favoráveis. O controle biológico de doenças de plantas é um método muito atual devido às suas vantagens e à ausência de danos ambientais. Neste estudo, avaliou-se a ação antagonística de treze cepas de *Trichoderma asperellum* contra uma cepa de *A. solani* isolada da batata em condições *in vitro*. O antagonismo foi determinado utilizando a técnica de cultura dupla, e os tipos de interações hifais foram observados (aumentos de 400/630x), assim como a influência do pH sobre elas. As cepas de *Trichoderma* apresentaram um claro efeito antagonístico, com alta competitividade pelo substrato, mais evidente nas cepas *Ta.25*, *Ta.1*, *Ta.12*, *Ta.85* e *Ta.3*. As cepas *Ta.12*, *Ta.13*, *Ta.28* e *Ta.56* destacaram-se por sua ação parasitária. O efeito antibiótico foi mais evidente nas cepas *Ta.75*, *Ta.78* e *Ta.90*. As interações hifais mostraram que o fungo antagonista afetou o fungo patogênico por meio de vacuolização, parasitismo, granulação e lise. Diferenças

#### ABSTRACT

The early blight in potatoes, caused by *Alternaria solani*, is one of the most widespread and important foliar diseases of this crop in areas with favorable climatic conditions. The biological control of plant diseases is a very current method due to its advantages and lack of environmental damage. In this study, the antagonistic action of thirteen strains of *Trichoderma asperellum* against one strain of *A. solani* of potato crop was evaluated *in vitro*. The antagonism was determined using the culture dual technique, and the types of hyphal interactions were observed (400/630x magnification), as well as the influence of pH on them. The *Trichoderma* strains showed a clear antagonistic effect, with high competitiveness for the substrate, most evident in strains *Ta.25*, *Ta.1*, *Ta.12*, *Ta.85*, and *Ta.3*. Strains *Ta.12*, *Ta.13*, *Ta.28*, and *Ta.56* stood out for their parasitic action. The antibiosis effect was most evident in strains *Ta.75*, *Ta.78*, and *Ta.90*. Hyphal interactions showed that the antagonistic fungus affected the pathogenic fungus through vacuolization, parasitism,



significativas na antibiose foram observadas entre as cepas em diferentes níveis de pH e temperatura, com a cepa *Ta.85* exibindo a antibiose mais forte em pH 6. De modo geral, as cepas *Ta.85* se destacam devido à sua ação parasitária, antibiose e Competência pelo substrato. Os resultados obtidos demonstram o importante papel que *Trichoderma* pode desempenhar como agente biológico para o controle de *A. solani*.

**Palavras-chave:** Requeima precoce, antagonismo, pH, controle biológico, temperatura.

granulation, and lysis. Significant differences in antibiosis were observed between strains at different pH and temperature levels, with strain *Ta.85* exhibiting the strongest antibiosis at pH 6. In general, the *Ta.85* strains stand out due to their parasitic action, antibiosis, and competition for the substrate. The results obtained show the important role that *Trichoderma* could play as a biological agent for the control of *A. solani*.

**Keywords:** Early blight, antagonism, pH, biological control, temperature.

## Introdução

As estratégias agrícolas convencionais incluem o uso de produtos químicos, como fungicidas, e o desenvolvimento de variedades resistentes; no entanto, ao longo do tempo, essas estratégias têm se mostrado ineficazes devido ao desenvolvimento de resistência a pragas e doenças (Cortés-Hernández *et al.*, 2023). A necessidade de proteger as culturas de fitopatógenos do solo e reduzir o uso de pesticidas químicos levou pesquisadores da área de proteção de plantas a se concentrarem na introdução do biocontrole com microrganismos como uma alternativa promissora dentro das práticas de manejo de culturas já estabelecidas.

Os agentes biológicos são uma das alternativas mais promissoras para reduzir o impacto ambiental causado pelo uso frequente de produtos químicos para o controle de pragas em plantas. Eles representam uma alternativa eficaz e segura para o controle de patógenos. Dentre esses agentes, destacam-se os isolados do gênero *Trichoderma*. O gênero *Trichoderma* vem sendo estudado há mais de sete décadas (Cai *et al.*, 2020). Seu efeito antagônico o torna um dos favoritos no controle de vários patógenos e doenças que afetam culturas de importância agrícola e econômica (Konappa *et al.*, 2022; Cortés-Hernández *et al.*, 2023).

O principal benefício do *Trichoderma* para a agricultura é o antagonismo com microrganismos fitopatogênicos devido à sua capacidade de produzir secreções enzimáticas tóxicas extracelulares que causam a desintegração e morte de fungos fitopatogênicos que habitam o solo (micoparasitismo), na degradação das paredes celulares das hifas de fungos patogênicos (predação), na produção de substâncias químicas voláteis e antibióticos antifúngicos que inibem fungos basidiomicetos (amensalismo), na colonização direta do fungo por penetração hifal (predação), na Competência por oxigênio, nutrientes e espaço no solo e devido à sua grande adaptabilidade e rápido crescimento (Infante *et al.*, 2015; Meyer *et al.*, 2022; Andrade-Hoyosa *et al.*, 2023). Espécies do gênero *Trichoderma* são os antagonistas mais utilizados em todo o mundo devido à sua ubiquidade (Cai *et al.*, 2020), à facilidade de isolamento e cultivo e ao rápido crescimento em uma ampla gama de substratos, principalmente ágar malte (AM) e ágar dextrose de batata (PDA) (Meyer *et al.*, 2022; Matas-Baca *et al.*, 2023). Em geral, os antagonistas não possuem um único modo de ação, e sua multiplicidade é uma característica importante para sua seleção como agentes de controle biológico.

*Trichoderma* pode afetar diversas estruturas de fungos patogênicos: conídios, escleródios e hifas. Outra vantagem é a ampla gama de fungos patogênicos que pode controlar, incluindo fungos do solo que causam doenças radiculares e/ou vasculares, e fungos que produzem manchas foliares, míldio ou requeima (Martínez *et al.*, 2013; Andrade-Hoyosa *et al.*, 2023).

Diferentes espécies de *Trichoderma* têm capacidade antagonica contra fungos fitopatogênicos (Meyer *et al.*, 2022), como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium* fs dianthii, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotricum gloesporioides*, *Sclerotium rolfsii*, *Rosellinia bunodes* (Matas-Baca *et al.*, 2023), *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum* com *T. harzianum*, *Botrytis cinerea* com *T. virens*, *Rosellinia bunodes* com *T. pseudokoningii*, *Armillaria mellea* com *T. viride*, *Phytium* sp. e *Phytophthora* sp. com *T. hamatum*, *Cryptonectria parasitica* com *T. parceromosum* (Infante *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2016; Andrade-Hoyosa *et al.*, 2023).

A requeima da batata, causada pelo fungo *Alternaria solani* Sorauer, é uma das doenças mais importantes da cultura, especialmente em regiões com alta umidade e temperaturas elevadas, e tem apresentado crescimento significativo nos últimos anos. Essa doença se torna um problema significativo, causando perdas de produtividade entre 20% e 30% e, em casos extremos, até 50%. A doença afeta principalmente a folhagem, mas também pode afetar os tubérculos (Betancourth *et al.*, 2020; Saavedra, 2023).

O objetivo deste estudo foi avaliar, em condições *in vitro*, a ação antagonica de treze cepas de *T. asperellum* contra uma cepa de *A. solani* isolada da batata.

## Materiais e Métodos

### Origem das Culturas Microbianas e Produção do Inóculo Microbiano

O estudo se realizou no Laboratório de Micologia Vegetal (LMV) do Centro Nacional de Saúde Agropecuária (CENSA) (Latitude 22,991867; Longitude -82,153892), Província de Mayabeque, Cuba.

### Agentes de controle biológico utilizados:

Como agentes de controle biológico, foram utilizadas cepas de *T. asperellum* (*Ta.1*, *Ta.3*, *Ta.12*, *Ta.13*, *Ta.17*, *Ta.25*, *Ta.28*, *Ta.52*, *Ta.75*, *Ta.78*, *Ta.79*, *Ta.85* e *Ta.90*). Essas cepas foram caracterizadas morfo-fisiologicamente (Infante *et al.*, 2015), molecularmente e patogenicamente contra diferentes alvos (Infante *et al.*, 2013) e foram obtidas da coleção do laboratório de Micologia Vegetal (CLMV) do CENSA. Para a obtenção do micélio fúngico, fragmentos de micélio das colônias foram inoculados em placas de Petri contendo ágar malte (MA) (BIOCEN) pH 5,6 ± 0,2 por 72 h a 30 ± 1 °C no escuro.

### Patógeno:

Utilizou-se o isolado altamente patogênico de *A. solani* n° 160 (número de catálogo no CLMV de *Alternaria* spp.), previamente isolado de folhas de batata com sintomas típicos de requeima, provenientes da província de Las Tunas (Pérez, 2003). O isolado foi purificado pela inoculação de fragmentos de micélio em placas de Petri contendo ágar batata-dextrose (PDA) (BIOCEN) pH 5,6, durante sete dias a 28 ± 1 °C, no escuro.



Para todos os experimentos, o inóculo fúngico consistiu em discos de 5 mm de diâmetro retirados da periferia das colônias.

### **Efeito antagônico *in vitro* de cepas de *T. asperellum* no crescimento de *A. solani***

O efeito antagônico de treze cepas de *T. asperellum* contra *A. solani* foi avaliado utilizando a técnica de cultura dupla (CD) (Bell *et al.*, 1982) em um desenho completamente aleatório. Três placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio de cultura PDA foram selecionadas para cada cepa. Dois discos de micélio de 5 mm de diâmetro, provenientes das colônias de *Trichoderma* e do patógeno, foram inoculados na mesma placa, diametralmente opostos e a aproximadamente 5 mm da borda. As placas inoculadas com ambos os fungos (três por cepa) foram seladas com Parafilm. Três placas foram utilizadas como controle, inoculadas com o patógeno da mesma maneira que as anteriores, mas sem o antagonista. As placas foram incubadas a  $30 \pm 1$  °C no escuro. As medições de crescimento (raio em mm) de ambos os fungos foram realizadas usando uma régua graduada em 16, 40, 48, 64, 72, 88, 96, 160, 184, 208, 232, 328, 352 e 400 h. Os modos de ação avaliados foram: antibiose, Competência por espaço e micoparasitismo (Martínez e Solano, 1995).

#### *Antibiose*

O crescimento linear (mm) da colônia de *A. solani* foi medido com uma régua graduada até 72 h. A antibiose foi determinada comparando o crescimento do patógeno no CD no momento do contato físico entre os dois fungos com o do controle (Martínez e Solano, 1995). Os dados foram processados utilizando ANOVA simples, e as médias foram comparadas pelo teste de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ). O critério de seleção para antibiose foi definido como 3 mm, com base no cálculo do intervalo de confiança da média (2,00–3,56) para  $p=0,05$ .

#### *Competência por espaço*

A percentagem da área ocupada pelo antagonista e pelo patógeno foi avaliada. As cepas de *T. asperellum* foram classificadas com base em seu antagonismo, de acordo com a escala de classes descrita por Bell *et al.* (1982). Às 96 horas, a percentagem de inibição do crescimento radial (PRGI) do patógeno foi determinada utilizando a fórmula de Samaniego *et al.* (1989):

$$\text{PRGI} = (R1 - R2) / R1 \times 100$$

Onde, R1 é o raio do patógeno controle e R2 é o raio do patógeno no enfrentamento.

Os dados de percentagem da área ocupada foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

#### *Micoparasitismo*

Para demonstrar o micoparasitismo (enrolamento, penetração, vacuolização e lise) (Chet *et al.*, 1981), três amostras foram coletadas aleatoriamente da zona de interação de ambos os fungos por réplica (placa de Petri) aos 96 h e colocadas em lâminas com uma gota de lactofenol. As observações foram feitas utilizando um microscópio Zeiss (400/630x) com sistema de foto documentação KSS. O efeito do crescimento do antagonista sobre o patógeno também foi avaliado de 96 a 400 h. Os dados foram comparados com os do controle para o mesmo período de avaliação utilizando o teste t de Student. Curvas de regressão foram geradas para as cepas de *T. asperellum* que apresentaram diferenças significativas.

Para a seleção das cepas, os seguintes critérios foram considerados com base em seu modo de ação:

- i) A cepa é classificada como nível 1 na escala de Bell *et al.*
- ii) A inibição do crescimento do patógeno resultante do efeito antibiótico é de pelo menos 3 mm.
- iii) O antagonista apresenta pelo menos três interações hifais com o patógeno.

### **Efeito da interação pH-temperatura no antagonismo de cepas promissoras de *T. asperellum* frente a *A. solani***

O meio de cultura PDA foi utilizado em pH 5,2, 6 e 7. O pH dos meios de cultura foi verificado preparando-se 10 ml adicionais de cada meio, esterilizando-os juntamente com os meios de cultura utilizados no ensaio e medindo-se o pH após a esterilização. Nas placas de Petri com os respectivos meios de cultura ajustados aos diferentes valores de pH, foi estabelecido a CD, de acordo com Martínez e Solano (1995), utilizando um desenho completamente aleatório. As placas inoculadas com ambos os fungos (antagonista e patógeno, três por variante) foram seladas com Parafilm e incubadas a temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C. Três placas inoculadas da mesma forma que as anteriores, mas sem o antagonista, foram utilizadas como controle. O crescimento radial das colônias de ambos os fungos foi medido com uma régua em 18, 42, 66, 90 e 162 horas.

As avaliações microscópicas (vacuolização, granulação, espiralamento, lise e penetração) foram realizadas conforme descrito na seção anterior, em 162 horas. Os dados foram processados utilizando-se uma análise de variância de três fatores, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## **Resultados e Discussão**

### **Efeito antagônico *in vitro* de cepas de *T. asperellum* no crescimento de *A. solani***

#### *Antibiose*

Todas as cepas de *T. asperellum* apresentaram efeito antibiótico frente a *A. solani*, porém houve diferenças na inibição do crescimento do patógeno, com base na liberação de metabólitos antes do contato hifal entre os dois fungos. Um grupo de 10 cepas se destacou, não apresentando diferenças significativas entre si (Tabela 1). Isso foi mais evidente nas cepas *Ta. 90* (Fig. 1), *Ta. 78*, *Ta. 75* e *Ta. 85*, cuja redução de crescimento foi equivalente ao crescimento do controle ao longo de 24 h.

Essa inibição do crescimento do patógeno pode estar relacionada à ação de metabólitos voláteis e/ou não voláteis, que podem ter diferentes origens: enzimas, quitinases, glucanases, celulasas, xilanases, laminarinases, esterases, glucosidases, lipases e proteases. toxinas, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, antibióticos: gliotoxina, viridina, gliovirina; hormônios, ácido 3-indolacético, ácido indolbutírico, L-triptofano, etileno, auxinas e giberelinas conforme relatado por Infante *et al.* (2009); Akemi *et al.* (2015); Romero *et al.* (2015); Villamil *et al.* (2015); Hernández *et al.* (2016); Hidalgo e Caicedo (2020). Esse modo de ação aumenta sua relevância prática quando



*Trichoderma* coloniza as raízes das plantas e libera compostos tóxicos para a praga, o que pode impedir a penetração e colonização da praga pela planta ou reduzir os danos sofridos. Esse efeito na folhagem pode ser observado devido à liberação de metabólitos durante o processo de germinação dos esporos do antagonista, que limitam a germinação ou o crescimento do fitopatógeno (Pérez, 2001).

Por outro lado, Gómez (2013) reafirmou que esse mecanismo de controle é o principal para *Trichoderma*, uma vez que seu efeito de controle é evidente mesmo sem contato direto com o patógeno, e que as enzimas hidrolíticas presentes nele também promovem a penetração e o saprofitismo.

Tabela 1. Efeito inibitório in vitro de cepas de *T. asperellum* no crescimento de *A. solani* em 72 h

Cepas de <i>T. asperellum</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>A. solani</i> (mm)
<i>Ta.</i> 12	0,66 a
<i>Ta.</i> 3	1,66 ab
<i>Ta.</i> 25	2,00 abc
<i>Ta.</i> 13	2,33 abcd
<i>Ta.</i> 1	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 79	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 56	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 17	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 28	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 85	3,66 bcd
<i>Ta.</i> 75	4,00 cd
<i>Ta.</i> 78	4,16 d
<i>Ta.</i> 90	4,33 d
ESx	0,23
CV	0,52

Médias com letras diferentes diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ , de acordo com o teste LSD de Fisher).

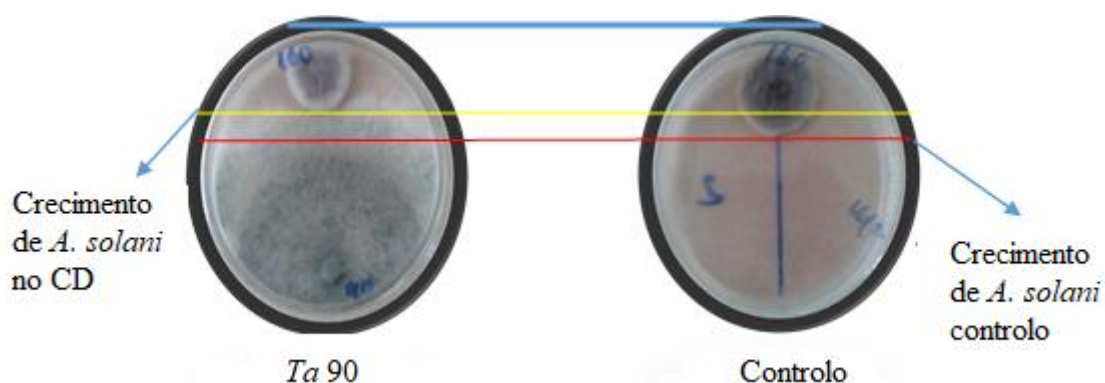


Figura 1. Efeito antibiótico da cepa *Ta.* 90 frente a *A. solani* em cultura dupla aos 72 h.

Os resultados obtidos confirmam esta acção e demonstram o importante papel que *Trichoderma* pode desempenhar como agente de controle biológico e, neste caso, para o controle de *A. solani*, cujo manejo actualmente não é suficientemente eficiente (Matas-Baca *et al.*, 2023).

#### Competência por espaço

As cepas de *T. asperellum* apresentaram um claro efeito antagônico com alta Competência por espaço (Tabela 2). É importante notar que a taxa de crescimento das cepas de *T. asperellum* variou de 0,77 a 0,69 mm h<sup>-1</sup>, enquanto a de *A. solani* foi de 0,17 mm h<sup>-1</sup>.

Essa diferença na taxa de crescimento entre o antagonista e o patógeno é a razão fundamental pela qual *Trichoderma* ocupa rapidamente grande parte da área da placa. No entanto, esse processo é favorecido pela variedade de metabólitos presentes nesse antagonista, o que lhe permite limitar o avanço do patógeno.

Entre as cepas de *Trichoderma*, observaram-se diferenças significativas na área ocupada por suas colônias na placa, com destaque para as cepas *Ta.* 1, *Ta.* 3, *Ta.* 12, *Ta.* 25 e *Ta.* 85. Após 72 h, as cepas de *Trichoderma* começaram a crescer sobre a colônia do patógeno e, nesse caso, também foram observadas diferenças entre elas. As cepas *Ta.* 17, *Ta.* 3, *Ta.* 90, *Ta.* 78, *Ta.* 28 e *Ta.* 85 apresentaram maior crescimento ( $\geq 80\%$ ) sobre o patógeno. De acordo com esses resultados, a maioria das cepas avaliadas se enquadra no grau 2 da escala de Bell *et al.*; apenas a cepa *Ta.* 85 atingiu o grau 1 (Tabela 2). A análise PICR mostrou que variou entre 36,62 e 54,45, com destaque para as cepas *Ta.* 75, *Ta.* 78, *Ta.* 79 e *Ta.* 85, com resultados acima de 50%. Esses resultados demonstram que *T. asperellum* é um bom competidor por espaço contra *A. solani* e o importante papel que a cepa antagonista tem no controle deste fitopatógeno, embora Samuels (1996) tenha opinado que a capacidade competitiva dependia mais da espécie do que do papel decisivo que os isolados têm no controle biológico.

Tabela 2 Competência de cepas de *Trichoderma* em relação ao crescimento em cultura dupla aos 96 h

Cepas de <i>T. asperellum</i>	Crescimento micelial de <i>Ta.</i> em relação à área (mm)	Graus de escala Bell <i>et al.</i>	PICR (%)
<i>Ta.</i> 56	67,00 a	2	42,56
<i>Ta.</i> 28	67,67 ab	2	42,56
<i>Ta.</i> 17	68,33 ab	2	39,59
<i>Ta.</i> 90	69,33 abc	2	46,52
<i>Ta.</i> 79	69,33 abc	2	50,49
<i>Ta.</i> 13	69,67 abcd	2	42,56
<i>Ta.</i> 78	70,33 bcde	2	54,45
<i>Ta.</i> 75	70,33 bcde	2	50,49
<i>Ta.</i> 3	72,00 cdef	2	44,54
<i>Ta.</i> 12	72,67 def	2	46,52
<i>Ta.</i> 1	73,33 ef	2	36,62
<i>Ta.</i> 25	74,00 f	2	45,53



Ta. 85	74,33	f	1	50,49
ESx		0,51		
CV		0,05		

Médias com letras diferentes diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ , de acordo com o teste de Duncan).

Esses resultados coincidem com os obtidos por Martínez *et al.* (2013, 2014), que observaram isolados de *Trichoderma* spp. com atividade inibitória contra o crescimento de *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm e *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams e Haswks. Os resultados obtidos reafirmaram os de Kamal *et al.* (2014), que relataram alta capacidade competitiva em isolados de *Trichoderma* spp. Frente a *Alternaria porri* (Ellis) Cif. *in vitro*. Pérez *et al.* (2013) obtiveram alta Competência por substrato *in vitro* com a cepa A-34 de *T. harzianum* frente aos isolados dos fitopatógenos *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker e *S. oryzae*, classificando-a no nível 1 da escala de Bell *et al.* aos 96 h.

Essa diferença pode ser atribuída ao uso de apenas uma cepa antagonista e/ou a diferentes fungos-alvo. Os resultados deste estudo contrastam com os de Hernández *et al.* (2016), que relataram que 14 dos 31 isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram o efeito competitivo máximo (classe 1 na escala de Bell *et al.*), ou seja, mais de 45% dos isolados, enquanto no presente estudo apenas 7,69% foram atingidos. Essa diferença provavelmente se deve ao fato de o fitopatógeno alvo (*R. solani*) e/ou as cepas antagonistas não serem os mesmos.

Considerando que a Competência por espaço ou nutrientes é considerada um dos mecanismos básicos para o controle de *Trichoderma*, as cepas de *T. asperellum* avaliadas com alta capacidade competitiva podem apresentar resultados positivos como agentes de controle biológico de *A. solani*.

#### Micoparasitismo

As cepas Ta. 12, Ta. 28, Ta. 13, Ta. 56 e Ta. 85 (Tabela 3) exibiram pelo menos três interações hifais, e as três últimas apresentaram quatro, contra *A. solani*. As interações hifais mais frequentemente observadas foram vacuolização, penetração e granulação (Fig. 2).

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Mokhtar e Dehimat (2012), que observaram que isolados de *T. harzianum* causaram lise e parasitismo nas paredes celulares de *Cladosporium* spp. e *Stemphylium botryosum* Wallroth; entretanto, esses autores não mencionaram vacuolização e granulação. Esses resultados são mais semelhantes aos obtidos por Pérez *et al.* (2013), que em sua pesquisa detectaram penetração, lise e vacuolização nas células do patógeno durante o antagonismo de *T. harzianum* contra *B. oryzae*.

Tabela 3. Tipos de interações hifais de cepas de *T. asperellum* em *A. solani* em cultura dupla aos 96 h

Cepas de <i>T. asperellum</i>	Tipos de interações hifais
Ta. 1	V-P
Ta. 3	G
Ta. 12	V-G-P
Ta. 13	V-G-L-P
Ta. 17	V-P

Ta. 25	V-P
Ta. 28	V-L-P
Ta. 56	V-G-L-P
Ta. 75	V
Ta. 78	V-G
Ta. 79	G
Ta. 85	V-G-L-P
Ta. 90	V-G

Legenda: (V) Vacuolização, (G) Granulação, (L) Lise e (P) Penetração

Os resultados das observações microscópicas sugerem a possível presença de enzimas antagonistas extracelulares com atividade lítica nas hifas do patógeno. Diversos estudos têm demonstrado a produção de enzimas líticas (quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,6-glucanases e proteases, entre outras) por espécies de *Trichoderma*, que contribuem para a degradação das paredes celulares de microrganismos patogênicos (Acosta *et al.*, 2013). Este poderia ser um dos motivos pelos quais diversas cepas de *T. asperellum* avaliadas apresentaram esses resultados, visto que já foi demonstrado que elas possuem atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase (Hidalgo e Caicedo, 2020). Contudo, são necessários estudos adicionais para explorar esse aspecto com maior profundidade e identificar as enzimas que podem estar presentes na interação entre *T. asperellum* e *A. solani*.

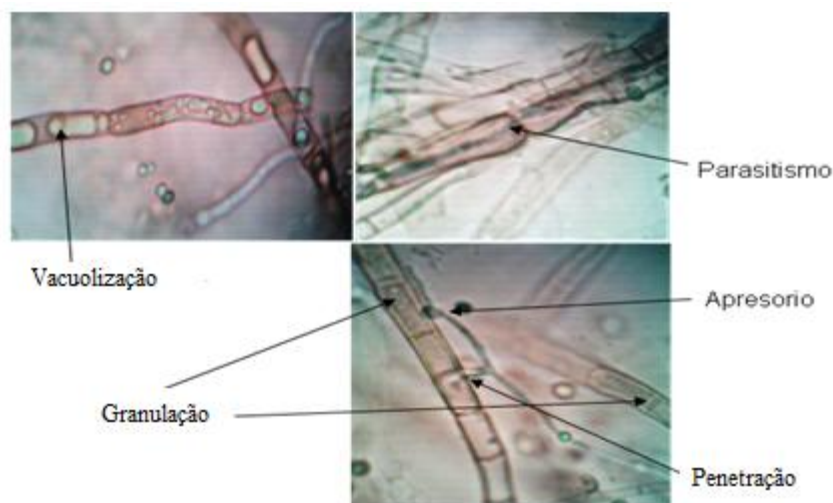


Figura 2. Interações hifais observadas da cepa Ta. 85 de *T. asperellum* em *A. solani* em cultura dupla aos 162 h.

As análises do teste t de Student mostraram que oito das cepas de *T. asperellum* (Ta. 1, Ta. 3, Ta. 12, Ta. 13, Ta. 25, Ta. 28, Ta. 56 e Ta. 85) causaram uma redução significativa na área ocupada pelo patógeno em 400 h, em comparação com o tamanho da colônia em 96 h (Fig. 3). A cepa Ta. 85 se destaca com a maior redução. Pode-se inferir que o micoparasitismo predomina nessa interação antagonista-patógeno, o que confirma o estudo de Liu e Baker (1980), citado por Hidalgo e Caicedo (2020), que propuseram que o micoparasitismo de *Trichoderma* em *R. solani* é responsável pela diminuição da densidade do inóculo desse patógeno e que isso corresponde a um aumento na densidade populacional de *Trichoderma*. No entanto, nessa ação, a atividade enzimática dos isolados também deve intervir, degradando a parede das hifas do patógeno, penetrando-as e, assim, reduzindo o tamanho da colônia de *A. solani*.

Este resultado tiene gran importancia desde el punto de vista del desarrollo del antagonismo, pues en condiciones de campo los patógenos casi siempre preceden, en posicionamiento físico del área, a los ACB, por lo que cepas con estas características tienen la capacidad de reducir el espacio ocupado por estos, dándole ventajas a la planta en su enfrentamiento ante estos patógenos.

A pesar de que existe abundante información acerca de que las especies de *Trichoderma* se comportan como antagonistas de varios hongos fitopatógenos (Martínez *et al.*, 2013), esto refuerza la necesidad de efectuar una correcta selección de las cepas respecto a sus dianas y ambientes, para obtener resultados consistentes en condiciones de campo.

El establecimiento in vitro de los modos de acción presentes en los aislamientos del biorregulador, constituye la base de la selección de estos, no solo para las pruebas siguientes en condiciones semicontroladas y/o campo, sino que es una orientación sobre la forma de producción, que se debe realizar para lograr mayor estabilidad y eficacia en los resultados en campo.

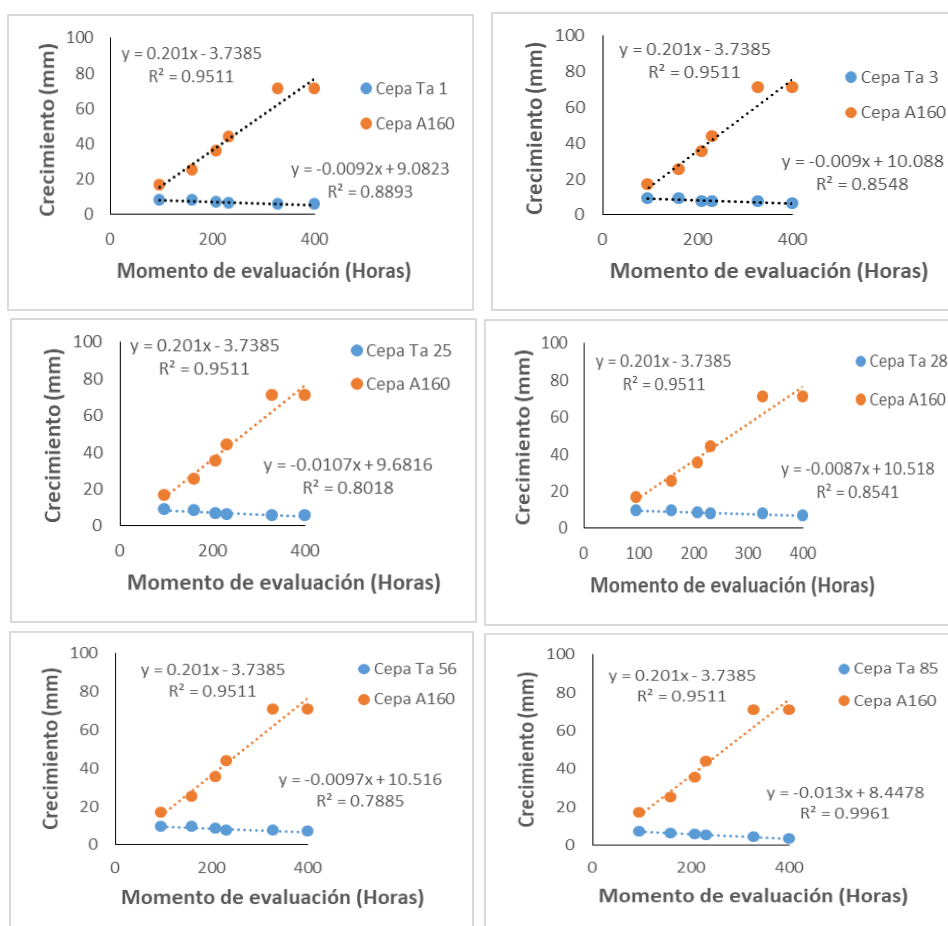


Figura 3. Redução da área cultivada por *A. solani* após contato hifal com as cepas de *T. asperellum* Ta. 1, Ta. 3, Ta. 25, Ta. 28, Ta. 56 e Ta. 85.

A análise abrangente dos resultados obtidos demonstrou que a estirpe *Ta. 85* atendeu a todos os critérios de seleção estabelecidos e, portanto, foi considerada a estirpe mais promissora para o controle de *A. solani* (Tabela 4).

Esses resultados são inovadores no controle biológico de *A. solani* em batata, pois representam a primeira vez no país que o antagonismo de estirpes de *T. asperellum* contra esse patógeno foi determinado e uma estirpe que apresenta todos os mecanismos de ação direta para o controle da requeima nessa cultura foi selecionada.

Tabela 4. Seleção da(s) estirpe(s) promissora(s) de acordo com os critérios previamente estabelecidos.

Cepas de <i>T. asperellum</i>	Grau na escala de Bell <i>et al.</i> (grau 1)	Número de interações hifais (3)	Inibição do crescimento de <i>A. solani</i> por antibiose (+3 mm)
<i>Ta. 1</i>	2	2	2,66
<i>Ta. 3</i>	2	1	1,66
<i>Ta. 12</i>	2	3	0,66
<i>Ta. 13</i>	2	4	2,33
<i>Ta. 17</i>	2	2	2,66
<i>Ta. 25</i>	2	2	2,00
<i>Ta. 28</i>	2	3	2,66
<i>Ta. 56</i>	2	4	2,66
<i>Ta. 75</i>	2	1	4,00
<i>Ta. 78</i>	2	2	4,16
<i>Ta. 79</i>	2	1	2,66
<i>Ta. 85</i>	1	4	3,66
<i>Ta. 90</i>	2	2	4,33

Legenda: Nas colunas 2, 3 e 4, os critérios de seleção correspondentes são indicados entre parênteses.

## Efeito da interação pH-temperatura no antagonismo de cepas promissoras de *T. asperellum* frente a *A. solani*

### Efeito antibiótico

A cepa *Ta. 85* apresentou efeito antibiótico nas interações de pH 5,2, 6 e 7 a 30 °C e em pH 7 a 25 °C aos 66 h. Esse efeito não foi observado nas demais interações (Tabela 5). Esse modo de ação foi favorecido a 30 °C, independentemente do pH do meio, embora em pH 7 e 25 °C tenha apresentado diferenças significativas em comparação ao controle. Além das interações de pH e temperatura mencionadas acima, as demais interações não favoreceram a liberação de metabólitos antifúngicos em quantidades suficientes para limitar o desenvolvimento do patógeno.

De acordo com os resultados, esse efeito seria favorável em condições de campo, quando a temperatura atinge valores em torno de 30°C. Este é um aspecto importante para o combate à doença, uma vez que, em temperaturas mais elevadas, o patógeno reduz a duração de suas gerações e aumenta sua intensidade (Castellanos, 2000).

Tabela 5. Influência da interação pH-temperatura no efeito antibiótico da cepa *Ta. 85* sobre *A. solani* (A 160) em cultura dupla.

Cepa	pH	Temperatura (°C)	Crescimento micelial de <i>A. solani</i> em CD aos 66 h (mm)
<i>Ta. 85</i>	7	35	3,67 a
<i>Ta. 85</i>	6	35	4,00 ab
<i>A 160</i>	6	35	4,67 abc
<i>Ta. 85</i>	5,2	35	4,67 abc
<i>A 160</i>	7	35	5,00 abc
<i>A 160</i>	5,2	35	5,33 abc
<i>Ta. 85</i>	6	30	6,33 bcd
<i>Ta. 85</i>	5,2	20	7,00 cde
<i>A 160</i>	5,2	20	8,67 def
<i>Ta. 85</i>	5,2	30	9,00 efg
<i>Ta. 85</i>	5,2	25	9,33 efg
<i>Ta. 85</i>	7	25	10,00 fgh
<i>Ta. 85</i>	6	20	10,33 fghi
<i>Ta. 85</i>	6	25	10,67 fghi
<i>Ta. 85</i>	7	20	11,00 fghij
<i>A 160</i>	5,2	25	11,67 ghij

A 160	6	20	11,67	ghij
Ta. 85	7	30	11,67	ghij
A 160	6	30	11,67	ghij
A 160	5,2	30	12,00	hij
A 160	6	25	12,33	hij
A 160	7	20	12,67	ij
A 160	7	25	13,33	j
A 160	7	30	16,33	k
ESx			0,24	
CV			0,36	

Médias com letras diferentes diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ , de acordo com o teste de Tukey).

### Competência por espaço

De modo geral, observou-se interação entre pH e temperatura aos 162 h. Nesse ponto, a cepa *Ta. 85* apresentou inibição do crescimento na maioria das combinações de pH e temperatura em comparação com os controles, sendo as interações de pH 5,2 com temperaturas de 20, 25 e 30 °C particularmente notáveis (Tabela 6). Os resultados indicam que a interação pH-temperatura influencia significativamente o antagonismo de *Trichoderma* frente a *A. solani*.

As combinações pH 5,2 – 35 °C e pH 6 – 35 °C não apresentaram diferenças em comparação com os respectivos controles (Tabela 6). Esses resultados sugerem que, quando o solo apresenta esses valores de pH e as temperaturas atingem 35 °C, não se deve esperar que o antagonista limite o crescimento do fungo patogênico.

Tabela 6. Influência da interação pH-temperatura no antagonismo da cepa *Ta. 85* sobre *A. solani* (A 160) em cultura dupla.

Cepa	pH	Temperatura (°C)	Crescimento micelial de <i>A. solani</i> em relação à área (mm) aos 162 h
<i>Ta. 85</i>	5,2	35	4,00 a
A 160	5,2	35	7,00 ab
<i>Ta. 85</i>	6	35	8,67 abc
<i>Ta. 85</i>	7	35	9,33 abc
<i>Ta. 85</i>	5,2	20	10,00 bcd
<i>Ta. 85</i>	5,2	25	10,00 bcd
<i>Ta. 85</i>	6	30	10,33 bcd
<i>Ta. 85</i>	7	30	11,67 bcde
<i>Ta. 85</i>	7	20	11,67 bcde
A 160	6	35	12,33 bcde
<i>Ta. 85</i>	7	25	12,33 bcde



Ta. 85	6	25	14,00	cde
Ta. 85	5,2	30	14,00	cde
A 160	7	35	15,33	def
Ta. 85	6	20	16,00	ef
A 160	5,2	20	20,67	fg
A 160	5,2	25	21,67	gh
A 160	5,2	30	23,00	ghi
A 160	7	25	25,00	ghij
A 160	6	25	27,00	hijk
A 160	7	20	28,33	ijk
A 160	6	20	29,00	jk
A 160	7	30	29,33	jk
A 160	6	30	31,33	k
ESx			0,46	
CV			0,45	

Médias com letras diferentes diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ , de acordo com o teste de Tukey).

Em contraste, Castellanos (2000) observou um encurtamento do intervalo entre gerações desse fungo em plantas de batata quando as temperaturas excederam 30 °C. Isso pode ser devido à reação do patógeno às altas temperaturas, garantindo sua multiplicação e preservação. Independentemente do pH, a maior inibição do crescimento de *A. solani* foi observada a 35 °C, diferindo significativamente dos controles (exceto nos níveis de pH mencionados anteriormente).

Isso significa que a inibição observada nessas interações se deve principalmente ao efeito do pH e da temperatura (5,2 e 6, e 35 °C) sobre o crescimento do patógeno, e não ao antagonismo da cepa Ta. 85. Esta é mais uma razão pela qual ensaios de campo são necessários (Ibarra-Medina *et al.*, 2010) para verificar a eficácia das cepas observadas *in vitro*. A literatura consultada não revelou resultados referentes ao efeito antagônico de *Trichoderma* em interações pH-temperatura. Entretanto, Petrişor *et al.* (2016), usando cepas de *Trichoderma* spp., observaram um maior efeito inibitório no crescimento de *R. solani* em condições de pH 5,5 e 30°C, sem mencionar o efeito em outras condições. Segundo Martínez *et al.* (2013b), temperaturas entre 25 e 30 °C estão associadas ao maior crescimento de diferentes estirpes de *T. asperellum*, embora estas possam crescer até 35 °C.

Essa resposta está mais relacionada ao isolado do que à espécie desse antagonista. Os mesmos autores relataram que as estirpes de *T. asperellum* não são exigentes quanto ao pH do substrato; elas podem crescer em pH de 5,5 a 8,5, embora os valores ótimos estejam entre 5,5 e 6,5, ou seja, em um ambiente ligeiramente ácido. Isso torna necessário testar o antagonismo sob diferentes condições de pH e temperatura para determinar a plasticidade ecológica das estirpes com base em sua atividade de controle e nas condições de crescimento do fitopatógeno.

O agente causal da requeima se desenvolve em temperaturas entre 10 e 35 °C e pH de 4,5 a 7,5 (MINAG, 2016). Portanto, para alcançar uma inibição estável do crescimento do patógeno, é necessário selecionar cepas de *Trichoderma* que expressem antagonismo dentro dessas faixas.

Analisando os resultados obtidos com a cepa Ta.85, destaca-se sua ampla plasticidade ecológica, demonstrando seu potencial como agente eficaz no controle de *A. solani* *in vitro*.

*Micoparasitismo*

Nas interações hifais, observou-se penetração, granulação, lise e vacuolização das células hifais de *A. solani*, causadas pelo antagonista (Fig. 4), com predominância dos três últimos (Tabela 7). Isso evidencia a excreção, por essa cepa, de enzimas extracelulares com atividade lítica, como quitinases e glucanases, entre outras; conforme relatado por Hidalgo e Caicedo (2020) em experimentos de expressão enzimática com diversas cepas de *T. asperellum*, incluindo a cepa *Ta.* 85. Cabe ressaltar também que essa cepa apresentou o maior número de interações hifais no micélio de *A. solani* em pH ligeiramente ácido e altas temperaturas (30 e 35 °C).

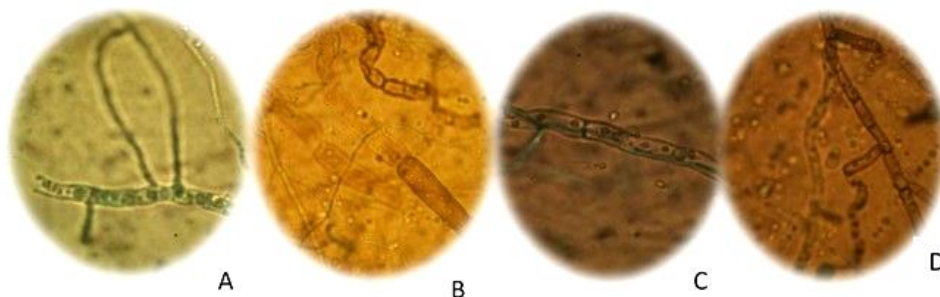


Figura 4. Interações hifais de cepas de *T. asperellum* em isolados de *A. solani*. A: pH 6 – Temp. 25°C: Granulação; B: pH 6 – Temp. 30°C: Lise; C: pH 5,2 – Temp. 25°C: Micoparasitismo; e D: pH 7 – Temp. 30°C: Vacuolização.

Tabela 7. Influência das interações pH-temperatura na atividade micoparasitária da cepa *Ta.* 85 de *T. asperellum* contra *A. solani*.

pH	Temperaturas (°C)			
	20	25	30	35
5,2	GV	GLP	GLP	GVLP
6	GV	GV	GVLP	GVLP
7	GV	GL	GV	GV

Legenda: G: Granulação, V: Vacuolização, L: Lise, P: Parasitismo

A cepa *Ta.* 85 destacou-se em todos os aspectos avaliados. Embora a avaliação da atividade antagonista *in vitro* tenha sido utilizada com resultados positivos para a seleção de cepas promissoras por diversos autores (Ibarra-Medina *et al.*, 2010; Reyes, 2011; Pérez, 2013), os resultados obtidos precisam ser corroborados em campo.

**Conclusões**

1. Os isolados de *T. asperellum* apresentam especificidade em sua capacidade inibitória contra o patógeno em condições *in vitro*. As melhores cepas, no geral, são *Ta.* 85, *Ta.* 25, *Ta.* 12 e *Ta.* 1.
2. As cepas de *T. asperellum* apresentaram diferenças em seu antagonismo em diferentes valores de pH e temperatura.



3. O antagonismo das cepas de *Trichoderma* e *Alternaria* é afetado ou influenciado; isso é mais pronunciado em pH 6, e a melhor cepa é *Ta. 85*.
4. As interações hifais revelaram a presença de enzimas antagonistas extracelulares com atividade lítica nas hifas do patógeno, onde predominaram a granulação, a lise e a vacuolização.
5. A cepa *Ta. 85* foi a mais promissora para o controle de *A. solani*, exibindo todos os mecanismos diretos.

## Referências bibliográficas

1. Akemi C, Takeo C, Castro J. Estabilização de 6 pentil alfa pirona com adição de adjuvantes tecnológicos. XIV Sicite – Utfrpr. 2015; 1: 1-4.
2. Andrade-Hoyosa P, Rivera-Jiménez M. N, Landero-Valenzuela N, Silva-Rojas H. V, Martínez-Salgado S. J, Romero-Arenas O. Beneficios ecológicos y biológicos del hongo cosmopolita *Trichoderma* spp. en la agricultura: una perspectiva en el campo mexicano. Revista Argentina de Microbiología. 2023; 55: 366-377
3. Bell K, Wells D, Markam R. In vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. Phytopathology. 1982; 72(4): 379-382.
4. Betancourth C. G, Sañudo B. S, Flórez C. C, Castro B. C, Arteaga F. B, Lagos E. M. Vulneración del cultivo de papa ante problemas sanitarios emergentes en. 1ª ed.- San Juan de Pasto: Editorial Universidad de Nariño, 2020. ISBN: 978-9 58-5123-15-1
5. Claudia SalazCai M., Idrees M., Zhou Y., Zhang C., Xu J. First report of green mold disease caused by *Trichoderma hengshanicum* on *Ganoderma lingzhi*. Mycobiology. 2020; 48(5): 427-430.  
doi: 10.1080/12298093.2020.1794230
6. Cortés-Hernández, Fabiola del Carmen; Alvarado-Castillo, Gerardo; Sánchez-Viveros, Gabriela. *Trichoderma* spp., una alternativa para la agricultura sostenible: una revisión. Revista Colombiana de Biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. 2023; vol. XXV, núm. 2: 73-87  
DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v25n2.111384>
7. Chet I, Harman G. E, Baker R. *Trichoderma hamatum*: Its Hyphal Interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Microb. Ecol. 1981; 7: 29-38.
8. Hernández O, Castillo D, Herrera R, Fuentes E, Drouaillet E, Santillán A. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. Investigación y Ciencia. 2016; 24(67): 5-11.
9. Hidalgo R. y Caicedo I. M. “*Trichoderma*: hongo fungicida usado en tratamientos foliares del suelo y el control de diversas enfermedades producidas por hongos”. Revista Caribeña de Ciencias Sociales. 2020. ISSN: 2254-7630.
10. Hollingshead K. Control of *Alternaria solani* Resistance to Boscalid, Fluopyram, and Chlorothalonil. A thesis submitted to the faculty of Brigham Young University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. 2015; 1-50.
11. Infante D, Reyes Y, Gonzalez N, Martínez B. Molecular identification of thirteen isolates of *Trichoderma* spp. and evaluation of their pathogenicity towards *Rhizoctonia solani* Kühn. Biotecnología aplicada. 2013; 30: 23-28.
12. Infante D, Reyes Y, Peteira B, Martínez B. Variabilidad fisiológica y patogénica de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. Métodos en Ecología y Sistemática. 2015; 10(3): 41-59.

13. Konappa N., Arakere U.C., Krishnamurthy S., Chowdappa S., Jogaiah S. Exploring the potential role of Trichoderma as friends of plants foes for bacterial plant pathogens. In Biopesticides. Woodhead Publishing. 2022; pp. 383-399. DOI:10.1016/B978-0-12- 823355-9.00002-X
14. Martínez B, Solano T. Antagonismo de Trichoderma spp. frente a Alternaria solani (ELLIS Y MARTIN) JONES Y GROUT. Rev. Protección Veg. 1995; 10: 221-225.
15. Martínez B, Infante D, Reyes Y. Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. 2013; 28(1): 1-11.
16. Matas-Baca, M. A., Flores-Córdova, M. A., Pérez-Álvarez, S., Rodríguez-Roque, M. J., Salas-Salazar, N. A., Soto-Caballero, M. C., & Sánchez-Chávez, E. Trichoderma fungi as an agricultural biological control in Mexico. Revista Chapingo Serie Horticultura. 2023; 29(3), 79-114. doi: 10.5154/r.rchsh.2022.11.015
17. Meyer M. C, Mazaro S. M, da Silva J. C. Trichoderma: su uso en la agricultura. Embrapa Brasilia, DF. 1ª edición, 2022. ISBN: 978-65-89957-14-0
18. Pérez S. Variabilidad cultural, patogénica y genética del agente causal del tizón temprano (Alternaria solani Sor) del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en Cuba. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. 2003.
19. Pérez J, Milanés P, Bernal A, Leiva M, García G, Lobato P, et al. Antagonismo “in vitro” de Trichoderma harzianum sobre aislados camagüeyanos de Bipolaris oryzae y Sarocladium oryzae. Centro Agrícola. 2013; 40(3): 29-36.
20. Pérez N. Control biológico de Alternaria porri (Ellis) Cif. en cebolla con Trichoderma spp. p. 89-107. En: L Gomero y Milagros Tazza (eds.), Innovación de Tecnologías Ecológicas para el Agro en América Latina. 2001; Resultados del Primer Congreso Latinoamericano. RAP-AL, Lima, Perú.
21. Romero T, López-Pérez A, Ramírez-Lepe M, Cuervo-Parra A. Modelado cinético del micoparasitismo por Trichoderma harzianum contra Cladosporium cladosporioides aislado de frutos de cacao (Theobroma cacao). Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia. 2015; 31(3): 32-45.
22. Saavedra Rojas, D. Principales enfermedades que afectan el cultivo de papa (Solanum tuberosum L.) en la sierra - Alto Piura. Revista Latinoamericana De Ciencias Agrarias. 2023; 1(1): 3-14.
23. Samaniego G, Ulloa S, Herrera S. Hongos del suelo antagonistas de Phymatotrichum omnivorum. Rev. Mex. Fitopatología. 1989; 8: 86-95.
24. Samuels G, Lodge J. Three species of Hypocrea with stipitate stromata and Trichoderma anmorphs. Mycologia. 1996; 88: 302-315.
25. Villamil E, Viteri E, Villegas W. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de Moniliophthora roreri Cif & Par en Theobroma cacao L. Bajo Condiciones de Campo. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 2015; 68(1): 7441-7450.

