



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

***Trichoderma* spp. no controle biológico da
podridão do colmo causada por
Macrophomina spp. em milho**

NERI ANTONIO BIAZUS JUNIOR

**Recife – PE
2024**

NERI ANTONIO BIAZUS JUNIOR

***Trichoderma* spp. no controle biológico da podridão do colmo causada por
Macrophomina spp. em milho**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador(a): Prof. Dr. Delson Laranjeira

Coorientador(a): Dra. Iwanne Lima Coelho e Prof^a. Dra. Solange Maria Bonaldo

**RECIFE-PE
FEVEREIRO
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B579

Biazus Junior, Neri Antonio

Trichoderma spp. no controle biológico da podridão do colmo causada por *Macrophomina* spp. em milho / Neri Antonio Biazus Junior. - 2024.
50 f. : il.

Orientador: Delson Laranjeira.

Coorientadora: Solange Maria Bonaldo.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2024.

1. Biocontrole. 2. Compostos orgânicos não voláteis. 3. Compostos orgânicos voláteis. 4. Podridão radicular. 5. *Trichoderma erinaceum*. I. Laranjeira, Delson, orient. II. Bonaldo, Solange Maria, coorient. III. Título

CDD 632

***Trichoderma* spp. no controle biológico da podridão do colmo causada por *Macrophomina* spp. em milho**

Neri Antonio Biazus Junior

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 23/02/2024

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

Profa. Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)

**RECFE-PE
FEVEREIRO
2024**

À minha família e amigos por todo apoio e incentivo.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao professor Delson pela orientação, ensinamentos, direcionamento profissional e pelos conselhos;

A Iwanne pela co-orientação, auxílio nos experimentos e análises, conselhos, inspiração como pessoa e profissional, obrigado por me ensinar sobre organização e seriedade no trabalho;

A Solange pela co-orientação, direcionamento profissional e acima de tudo por ter me inspirado e direcionado a seguir para a academia e pesquisa, demonstrando que podemos chegar muito longe por meio do conhecimento;

Aos integrantes da Clínica de Diagnose de Doenças em Plantas da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT/Campus Sinop/CODEX) pela disponibilização dos isolados;

A Ana Gabriele e Ingrid por me auxiliar nas análises filogenéticas;

A André pela amizade, auxílio nos experimentos, trocas de conhecimento e pelas conversas que auxiliaram na trajetória do desenvolvimento da dissertação;

A Keyla e Brendo pela amizade, conversas que permitiram chegar até o fim deste ciclo, além do auxílio nas disciplinas;

A Diego, Karina, José, Nágila e Julianne pelo auxílio nas atividades de casa de vegetação, avaliação e condução de ensaios;

A toda equipe do laboratório LAFSOL pelo acolhimento, conversas, conhecimentos repassados e auxílio no desenvolvimento dos experimentos para que este estudo pudesse ser realizado;

A Sandreildo pela disponibilidade de sementes crioulas de milho;

Aos integrantes do projeto BERSO do Departamento de Energia nuclear da Universidade Federal de Pernambuco pela disponibilidade do substrato utilizado nos ensaios;

A professora Rejane e Cícero pela disponibilidade para realização do sequenciamento;

Aos professores do Programa de pós-graduação em Fitopatologia (PPGF) por todo conhecimento repassado nestes dois anos;

A Maria Cecília pelo auxílio emocional, companherismo, correções, motivação e trazer emoção nesta trajetória;

A Maria Helena por motivar e trazer emoção nesta trajetória;

A meus pais pelo auxílio emocional e financeiro, além de sempre me motivar a continuar na trajetória acadêmica e pelos ensinamentos que me proporcionaram chegar até aqui.

SUMÁRIO

Sumário

CAPÍTULO I.....	10
1.1. MILHO.....	11
1.2. IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DO MILHO	12
1.3. DOENÇAS NO MILHO	14
1.4. PODRIDÃO POR <i>MACROPHOMINA</i>	15
1.5. <i>Macrophomina</i> spp.	16
1.6. CONTROLE DE <i>Macrophomina</i> spp. em milho	17
1.7. <i>Trichoderma</i> spp.	18
1.8. <i>Trichoderma</i> spp. COMO AGENTES BIOCONTROLADORES.....	19
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO II	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS	28
2.2. TESTE DE PATOGENICIDADE	29
2.3. TESTE DE ANTAGONISMO	29
2.3.1. SCREEN DE PAREAMENTO	29
2.3.2. SCREEN DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NÃO VOLÁTEIS (CONV's)	30
2.3.3. SCREEN DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COV's)	31
2.4. BIOCONTROLE <i>in vivo</i>	31
2.5. EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO.....	32
2.6. ANÁLISES FILOGENÉTICAS	33
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
3. RESULTADOS.....	34
3.1. PATOGENICIDADE.....	34
3.2. ANTAGONISMO.....	35
3.3. PAREAMENTO.....	35
3.4. COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COV's).....	38
3.5. COMPOSTOS ORGÂNICOS NÃO VOLÁTEIS (CONV's).....	38
3.6. BIOCONTROLE <i>in vivo</i>	40
3.7. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Macrophomina</i>	42
3.8. IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i>	43
4. DISCUSSÃO	44
5. REFERÊNCIAS.....	46
CAPÍTULO III.....	50
1. CONCLUSÕES GERAIS.....	51

RESUMO GERAL

As doenças incidentes na cultura do milho podem ocorrer em diversos órgãos, abrangendo raízes, colmos, folhas e espigas. No colmo ocorrem as podridões de colmo, que comprometem a translocação de água e nutrientes, acarretando na redução do enchimento de grãos e, no final do ciclo, ocasionando o tombamento das plantas, sendo relacionada à *Macrophomina phaseolina* Tassil. Pode acarretar ainda na redução do peso das espigas em até 40%. Com a ausência de produtos químicos registrados, a utilização de agentes biocontroladores é indispensável, entretanto ainda há poucos produtos registrados para este fitopatógeno. Com base nos dados objetivamos identificar as espécies de *Macrophomina* relacionadas a ocorrência de podridão de *macrophomina* em milho e selecionar cepas de *Trichoderma* spp. com potencial de biocontrole para essa doença. A identificação de espécies de *Macrophomina* foi realizada por meio de PCR utilizando primers de detecção, enquanto o potencial antagonista foi avaliado por meio de ensaios de pareamento, compostos orgânicos voláteis e compostos orgânicos não voláteis. Após a seleção quanto ao potencial antagonista, os isolados selecionados, foram submetidos ao ensaio de biocontrole *in vivo* por meio da infestação do solo com o fitopatógeno e utilização do agente biocontrolador na semeadura, sendo a avaliação foi realizada por meio da severidade da doença nas raízes. O isolado CFSB168 de *T. asperelloides* reduziu a severidade entre 3,00% e 10,50% para os isolados de *M. phaseolina*, entre 3,75% e 9,50% para os isolados de *M. pseudophaseolina* e de 3,50% e 6,25% para os isolados de *M. Euphorbiicola*. Enquanto os isolados de *T. erinaceum* CFS1017 reduziram entre 3,50% e 10,00% dos isolados CFS1039 e CFS1033 de *M. phaseolina*, entre 1,00% e 10,25% para os isolados CMM4131 e CMM4161 de *M. pseudophaseolina* e de 3,25% e 6,25% para os isolados CMM4134 e CMM2718 de *M. euphorbiicola*, quando utilizado o isolado CFS1018 as reduções na severidade ficaram entre 3,25% e 9,50% dos isolados de *M. phaseolina*, entre 2,75% e 9,00% para os isolados de *M. pseudophaseolina* e de 3,25% e 6,25% para os isolados de *M. euphorbiicola*. Diante destes resultados é possível concluir que estes isolados de *Trichoderma* apresentam potencial de biocontrole da podridão cinzenta do colmo causada por três espécies de *Macrophomina*.

Palavras-chaves: Biocontrole, compostos orgânicos não voláteis, compostos orgânicos voláteis, Podridão radicular, *Trichoderma erinaceum*, *Trichoderma asperelloides*.

GENERAL ABSTRACT

Diseases affecting corn crops can occur in various organs, including roots, stalks, leaves and ears. Stalk rot occurs in the stalk, which compromises the translocation of water and nutrients, resulting in a reduction in grain filling and, at the end of the cycle, causing the plants to topple over, and is related to *Macrophomina phaseolina* Tassil. It can also reduce the weight of the ears by up to 40%. With the absence of registered chemical products, the use of biocontrol agents is indispensable, but there are still few products registered for this phytopathogen. Based on this, we aimed to identify the species of *Macrophomina* related to the occurrence of *macrophomina* rot in maize and to select strains of *Trichoderma* spp. with biocontrol potential for this disease. The identification of *Macrophomina* species was carried out by PCR using detection primers, while the antagonistic potential was evaluated using pairing assays, volatile organic compounds and non-volatile organic compounds, after being selected for their antagonist potential, the selected isolates were submitted to the in vivo biocontrol test by infesting the soil with the phytopathogen and using the biocontrol agent when sowing, which was evaluated using the severity of the disease in the roots. *T. asperelloides* isolate CFSB168 reduced severity by between 3.00% and 10.50% for *M. phaseolina* isolates, between 3.75% and 9.50% for *M. pseudophaseolina* isolates and between 3.50% and 6.25% for *M. euphorbiicola* isolates. While *T. erinaceum* isolate CFS1017 reduced *M. phaseolina* isolates CFS1039 and CFS1033 by between 3.50% and 10.00%, *M. pseudophaseolina* isolates CMM4131 and CMM4161 by between 1.00% and 10.25% and *M. euphorbiicola* isolates CMM4134 and CMM2718 by between 3.25% and 6.25%. When isolate CFS1018 was used, the reductions in severity were between 3.25% and 9.50% for the *M. phaseolina* isolates, between 2.75% and 9.00% for the *M. pseudophaseolina* isolates and between 3.25% and 6.25% for the *M. euphorbiicola* isolates. In view of these results, it can be concluded that these *Trichoderma* isolates have potential for biocontrol of gray rot of the stalk caused by three species of *Macrophomina*.

Keywords: Biocontrol, non-volatile organic compounds, volatile organic compounds, root rot, *Trichoderma erinaceum*, *Trichoderma asperelloides*.

CAPÍTULO I**Introdução Geral**

Trichoderma spp. no controle biológico da podridão do colmo causada por Macrophomina spp. em milho

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. MILHO

A cultura do Milho (*Zea mays* L.) pertence à Ordem Poales, Família Poaceae, Tribo Maydeae, Gênero *Zea*, é uma planta monocotiledônea, anual, originária da América do Norte, com centro de origem genética no México e Guatemala (Lerayer, 2006; Gaut *et al.*, 2000). Apresenta sistema radicular fasciculado, o caule é um colmo ereto, podendo alcançar até 2 metros de altura, sendo considerada um planta monoica por apresentar os órgãos masculino e feminino na mesma planta (Magalhães; Durães, 2006).

Os grãos podem apresentar colorações variadas de acordo com os compostos presentes, variando de cores intensas como roxa, vermelha e azul por apresentarem uma maior concentração de fenólicos, até amarelo e laranja (Paes; Teixeira; Ribeiro, 2020).

A semente do milho é composta por três partes: pericarpo, endosperma e embrião. O pericarpo está localizado na parte mais externa da semente, enquanto o endosperma está envolto pelo pericarpo, sendo responsável pelo armazenamento do amido e outros carboidratos e, na parte mais externa, que está em contato com o pericarpo, tem grande importância no processo de germinação, visto que esta região é rica em proteínas e enzimas necessárias a este processo. O embrião, fica localizado ao lado do endosperma e nele estão os primórdios de todos os órgãos da planta (Paes, 2006;).

É uma planta mundialmente cultivada por apresentar grande adaptabilidade quanto ao clima e local de cultivo, pois pode ser cultivado entre as latitudes 58° Norte e 42° Sul sendo encontrado em regiões situadas abaixo do nível do mar e regiões com altitude superior a 2500m (Fancelli; Dourado Neto, 2004). A temperatura ideal de desenvolvimento do milho dentre o período da emergência a floração, está entre 24 e 30°C. (Magalhães; Durães, 2006).

Quanto à precipitação anual, considerando-se que esta é uma planta de ciclo médio, a cultura consome durante seu ciclo de 400 a 700mm de água, destes 40 a 50% é consumido durante a fase de embonecamento. Logo, o milho se adapta muito bem a regiões com precipitações entre 250 e 5000mm anuais, sendo que em valores mais baixos do que o utilizado pela planta é necessária a utilização de irrigação (Magalhães; Durães, 2006).

O milho é classificado comercialmente quanto ao ciclo, sendo considerado hiperprecoce (ciclo com até 110 dias), superprecoce (105 a 125 dias), precoce (115 a 130 dias), semiprecoce (120 a 145 dias), normal (125 a 140 dias) e tardia (acima de 145 dias). No Brasil, o cultivo ocorre em três épocas do ano: verão, outono e nos meses de maio a junho na região Nordeste

(Pereira Filho; Borghi, 2022).

Há diversas variedades de milho existentes no mundo, cada uma com sua especificidade e aplicação comercial, dentre as variedades tem-se o milho de silagem, milho doce, milho pipoca, milho branco e mini milho (Garcia *et al.*, 2006). Considerando o propósito de uso do grão, temos sua utilização para consumo *in natura*, na alimentação humana e animal, como matéria prima na indústria alimentícia, cervejeira, farmacêutica e de mineração (Silveira *et al.*, 2015).

1.2. IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DO MILHO

A importância socioeconômica do milho está relacionada com a influência e utilização desde a produção passando pela alimentação animal e chegando na indústria. Em 2006, a alimentação animal representava a maior parte do consumo do milho, cerca de 70%. Neste mesmo período o consumo direto na alimentação humana não tem grande representatividade, porém é fator importante em regiões de baixa renda, podendo estar presente na alimentação diária, como é o caso da região nordeste do Brasil, onde é utilizado como fonte de energia por muitas pessoas do semiárido, adicionalmente a população mexicana, a qual tem milho como base em sua culinária (Garcia *et al.*, 2006).

A produção mundial de milho na safra 2021/22 foi de 1217,30 milhões de toneladas e o Brasil encontra-se como terceiro maior produtor mundial com aproximadamente 116 milhões de toneladas, sendo as primeiras posições são ocupadas por Estados Unidos e China (USDA, 2022). Dados da CONAB (2022), apontam o consumo de 77.170,9 mil toneladas de milho, em abril de 2022 apenas no mercado interno. Nesse mesmo período, a parte que foi destinada à exportação alcançou aproximadamente 37 milhões toneladas. Esses valores superam os dados obtidos nas safras 19/20 e 20/21, demonstrando a grande importância do milho para a economia agrícola e industrial brasileira.

Dados do Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2022), mostram que em 2022 o valor bruto da produção (VBP) do milho foi de R\$ 150 bilhões, representando 12,63% do VBP brasileiro deste ano, ainda neste ano a cultura do milho superou os valores de VBP da bovinocultura, passando para segundo lugar no ranking de produtos com maior valor bruto de produção, sendo superado apenas pela cultura da soja.

Devido as estações de produção mundial divergirem, Brasil e Argentina têm vantagem em fornecer o milho para os países do hemisfério norte nos meses em que não há produção nestes países. No Brasil, esta vantagem é explicada devido a alteração na estação da produção, onde anteriormente era no verão e passando para o inverno, logo, com esta mudança, o milho não compete por espaços nos portos com a exportação da soja, ganhando força no mês de julho,

quando os embarques de soja diminuem, reduzindo em volume exportado no mês de fevereiro (Contini *et al.*, 2019). O IBGE (2022), aponta que a 1º e 2º safras de milho no país, representam 41,8% da produção agrícola brasileira de cereais, leguminosas e oleaginosas.

Na alimentação animal, o grão é utilizado para formulação de rações que serão destinadas a avicultura de corte ou de postura (produção de ovos), suinocultura e terminação de animais confinados na pecuária de corte. Podendo ser utilizado também para produção de silagem para pecuária leiteira, sendo complementada pela utilização de rações. Por sua diversificação nas formas de utilização para alimentação animal, o milho pode ser considerado estratégico para manutenção da produção de proteína animal no Brasil (Miranda *et al.*, 2021).

Quando utilizado para o consumo humano, pode ser empregado *in natura* ou processado. *In natura*, é consumido como pamonha, milho verde, sêmola, cuscuz e canjica (Garcia *et al.*, 2006). Os produtos processados passam pela indústria onde o grão é transformado em farinha, óleo, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais (Silveira *et al.*, 2015). Porém para obtenção destes subprodutos o grão passa por dois tipos de moagem, a via seca e a via úmida. Da moagem via seca são obtidas as farinhas, os floculados, o óleo entre outros subprodutos. Por meio da moagem via úmida são obtidos os amidos, xaropes de glicose, ingredientes para rações e o álcool combustível (Miranda *et al.*, 2021).

Além do aumento no consumo, a demanda crescente por essa *commodity* tem sido potencializada pelo uso nas indústrias alimentícia animal e energética com a produção de etanol. No Brasil, a utilização do milho como matéria prima para produção de etanol iniciou em 2012, com a implantação da primeira usina brasileira de etanol de milho no estado de Mato Grosso. Nove anos após a implantação da primeira indústria, em 2021, haviam 16 usinas de etanol de milho, nas quais algumas caracterizavam-se como “flex”, utilizando como matéria prima cana-de-açúcar e milho, enquanto outras atuam de maneira “full”, utilizando apenas milho como fonte (Neves *et al.*, 2021).

Na indústria de etanol, além do biocombustível produzido são obtidos coprodutos como DDG (Dried Distillers Grains ou Grãos secos de destilaria), DDGS (Grãos secos de destilaria com solúveis), WDG (Wet Distillers Grains, que são grãos úmidos de destilaria) e a eletricidade gerada por meio da biomassa produzida (Neves *et al.*, 2021). A utilização dos coprodutos DDG, DDGS e WDG na alimentação de ruminantes pode ser economicamente favorável aos produtores (Lima *et al.*, 2021), assim como o DDGS pode ser utilizado como fonte de proteína na alimentação de tilápia do nilo (Lewandowski *et al.*, 2017).

Embora o milho ainda seja utilizado para produção de silagem e forragem, os valores correspondente a este setor não são contabilizados pelo IBGE e CONAB, pois os dados

levantados são apenas referentes aos grãos (Miranda *et al.*, 2021). Dada a importância econômica em números desta cultura, a redução na produção influencia diretamente em diversos setores da economia brasileira, pois como visto anteriormente movimenta como matéria prima a indústria de etanol. Considerando somente o estado de Mato Grosso, a participação de compra do cereal na safra 2019/20 foi de 20,6% pelas indústrias, ou seja, a indústria está sendo o segundo maior destino de milho cultivado no estado (Vidal, 2020).

Apesar de na região centro-sul do Brasil o etanol de milho representar apenas 4,87% no ano 2019/20, no estado de Mato Grosso a produção de etanol de milho corresponde a 52% do etanol utilizado, com tendência de aumento desta participação ao ano (Nogueira Junior, 2022).

Na região Nordeste a cultura do milho está diretamente relacionada com a alimentação, estando os alimentos a base de milho estarem intrinsecamente associados ao festejo de São João (Santos; Mendonça; Shinohara, 2020). Devido a importância na alimentação brasileira, o milho está presente no Guia Alimentar para a população Brasileira, onde tem receitas incluindo este cereal nas três principais refeições (Brasil, 2014).

Estes dados demonstram a importância do controle de doenças do milho que possam reduzir a produção, principalmente ao se buscar por métodos com baixa toxicidade ao ser humano, como é o caso do controle biológico, pois ao gerar novas alternativas menos agressivas ao sistema produtivo e com maior eficiência para o controle de doenças em plantas de milho está sendo garantida a sustentabilidade do sistema produtivo e evitando reflexos negativos em setores ligados.

1.3. DOENÇAS NO MILHO

O Brasil apresenta em suas áreas produtoras condições ambientais que favorecem o desenvolvimento de doenças (Contini *et al.*, 2019). Logo, a cultura do milho assim como as demais plantas exploradas comercialmente, em sua maioria em monocultivos, pode apresentar patógenos que causam redução na produção desta cultura. Cota *et al.* (2013), relatam que mancha branca, cercosporiose, helmintosporiose (*Helminthosporium turcicum* Pass.), ferrugem polissora (*Puccinia polysora* Underw.), ferrugem tropical (*Physopella zae* (Mains) Cummins & Ramachar), ferrugem branca, enfezamento vermelho (*Spiroplasma kunkelii* Whitcomb), enfezamento pálido (*Maize bushy stunt*) e podridões de colmo (PC) e grãos ardidos são doenças que merecem destaque na cultura do milho. Como no Brasil o milho é produzido em sucessão a cultura da soja alguns patógenos são favorecidos, como alguns nematoides capazes de afetar ambas as culturas, como é o caso do *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) (Casa *et al.*, 2007; Contini *et al.*, 2019).

As doenças em milho podem ocorrer em diversos órgãos, abrangendo raízes, colmos, folhas e espigas. No colmo ocorrem as podridões de colmo (PC), que comprometem a translocação de água e nutrientes, acarretando na redução do enchimento de grãos e podendo ocasionar a morte prematura, quando no final do ciclo, ocasiona o tombamento das plantas, dificultando a colheita mecânica e expondo as espigas à podridão, por haver o contato com o solo (Casa *et al.*, 2007; Contini *et al.*, 2019).

As podridões de colmo estão geralmente associadas a *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.V. Wils., *Stenocarpella macrospora* Earle, *S. maydis* Berk, *Fusarium graminearum* Schewabe, *F. Verticillioides* (Sacc.) Nirenberg e *Macrophomina phaseolina* Tassil (Ribeiro *et al.*, 2005; Casela *et al.*, 2006). Destas, *Fusarium graminearum* Schewabe, *F. Verticillioides* (Sacc.) Nirenberg e *M. phaseolina* Tassil estão comumente presentes em solos, onde o sistema de cultivo adotado pode favorecer a ocorrência de doenças radiculares, ainda que nestes locais ocorre seleção da microbiota levando a baixa diversidade ecológica, assim o ambiente se torna favorável, facilitando a infecção das plantas por patógenos radiculares (Michereff *et al.*, 2005).

Vale ressaltar que as doenças de colmo são compostas por um grupo de fitopatógenos agressivos, apresentando alto potencial de redução da produtividade. Em adição apresentam difícil controle, em virtude da ausência de eficácia de aplicações foliares de fungicida, sendo necessária o uso de rotação de culturas ou resistência genética (Contini *et al.*, 2019).

Assim como os nematoides, o patógeno radicular *M. phaseolina* acaba beneficiando-se deste sistema de sucessão de culturas (soja/milho), correspondendo com aumento da quantidade de inóculo presente nas regiões produtoras. Em monitoramentos realizados por Costa *et al.* (2019) na região conhecida como MATOPIBA, que abrange os estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia, demonstraram que a podridão de *macrophomina* é uma das principais doenças que afetam as culturas da soja e do milho.

1.4. PODRIDÃO POR *MACROPHOMINA*

Em milho, a incidência de *Macrophomina* sp. pode variar de 9 a 100%, dependendo da região geográfica, da cepa patogênica e da cultivar. Dependendo da incidência, o cultivo pode apresentar redução no peso das espigas de até 40% (Costa *et al.*, 2019). Almeida *et al.* (2014) sugerem que a *M. phaseolina*, pode apresentar variação genética associada à rotação de culturas, demonstrando que o manejo de rotação não é eficiente para o controle da doença e ainda pode provocar aumento na severidade caso o clima apresente maiores temperaturas e déficit hídrico. Costa *et al.* (2019), relatam que em amostras coletadas na região do MATOPIBA a perda variou de acordo com o híbrido, apresentando perda média de 27%.

Estudos demonstram que isolados de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* provenientes da planta breço (*Trianthema portulacastrum* L.) e pega pinto (*Boerhavia diffusa* L.) são patogênicas ao milho verde, sendo tão agressivas quanto isolados de meloeiro (Lima, 2019), visto que há plantas daninhas que são hospedeiros alternativos. Dentre as plantas hospedeiras alternativas de *M. phaseolina* estão a jitrana (*Merremia aegyptia* (L.) Urb.), batata-salsa (*Ipomoea asarifolia* Roem. et Schult), tiririca (*Cyperus rotundus* L.), capim colchão (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.), grama-egípcia (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Beauv), mata-pasto (*Senna uniflora* (Mill.) Irwin et Barneby), malva selvagem (*Malva sylvestris* L.), capim-tapete (*Mollugo verticillata* L.), beldroega (*Portulaca oleracea* L.), vassourinha-de-botão (*Borreria verticillata* G. Mey) e malva-branca (*Waltheria indica* L.) (Sales Junior *et al.*, 2012). erva tostão (*B. diffusa*) e breço (*T. portulacastrum*) plantas consideradas hospedeiras alternativas de *M. pseudophaseolina* (Sales Junior *et al.*, 2020).

1.5. *Macrophomina* spp.

O fungo *Macrophomina* spp. pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes e família Botryosphaeraceae. Tem como características micélio superficial ou imerso de coloração hialina a marrom, ramificado e septado. Pequenos esclerócios negros, lisos e duros são formados (Crous *et al.*, 2006). *Macrophomina* sp. é um fungo polífago e cosmopolita, capaz de infectar mais de 500 espécies vegetais em regiões tropicais e subtropicais, entre essas estão culturas comerciais como soja, milho, sorgo, algodão (Kumar *et al.*, 2017). Nestas culturas a *Macrophomina* spp. causa doença denominada de podridão de *macrophomina* ou podridão cinzenta, os sintomas são observados nas raízes e nos caules das plantas. A expressão dos sintomas varia de acordo com a espécie e estágio da planta no momento da infecção (Costa *et al.*, 2019).

Descrita em 1947, a espécie tipo do gênero *Macrophomina* é a *M. phaseolina* (Phillips *et al.*, 2013). No Brasil o primeiro relato de *M. phaseolina* foi feito em 1935, foi observado em raízes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). A partir deste relato a gama de hospedeiros aumentou consideravelmente, passando a ser detectada em diversas culturas comerciais como girassol (*Helianthus annuus* L.), melão (*Cucumis melo* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), milho (*Zea mays* L.), soja (*Glycine max* L. Merrill), cenoura (*Daucus carota* L.) entre outras culturas (Urban; Dianese; Mendes, 2019; Farr; Rossman, 2023).

M. pseudophaseolina Crous, Sarr & Ndiaye, foi descrita em 2014, causando doenças em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), hibisco (*Hibiscus sabdarifa* L.) e quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) no Senegal (Sarr *et al.*, 2014).

Macrophomina euphorbiicola A. R. Machado, D. J. Soares & O. L. Pereira foi descrita em 2018, causando doenças em pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.) e mamona (*Ricinus communis* L.) no Brasil. Devido à ausência de esporulação, não foi possível a descrição morfológica de picnídios e estruturas reprodutivas (Machado *et al.*, 2019). Recentemente foi constatada causando doença em batata-doce (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) no Brasil (Mello *et al.*, 2021).

Na cultura do milho esta doença vem se tornando um grande problema em nível mundial, pois este fitopatógeno é habitante natural do solo, infecta os tecidos da casca e da medula causando necrose, seguido da formação de estruturas de sobrevivência chamadas de microescleródios, abundantemente distribuídos, e tornam os tecidos afetados acinzentados. Quanto mais cedo ocorre a infecção, maior será a perda causada pela doença (Costa *et al.* 2019).

Mesmo na ausência do hospedeiro, *Macrophomina* spp. pode sobreviver por longos períodos, por contar com estruturas de sobrevivência denominadas de microesclerócios (Ishikawa *et al.*, 2018). Inclusive em condições adversas como temperaturas elevadas e estresse hídrico, a disseminação deste fitopatógeno é realizada através de implementos agrícolas, vento, animais, sementes contaminadas e água de irrigação (Bianchini *et al.*, 1997). Athayde Sobrinho *et al.* (2006), demonstraram que *M. phaseolina* tem a capacidade de ser disseminada por meio de sementes contaminadas de feijão-caupi, por conta disso áreas onde não há a presença de espécies de *Macrophomina* podem ser contaminadas por meio de sementes.

1.6. CONTROLE DE *Macrophomina* spp. em milho

Não há produtos registrados para o controle químico de *Macrophomina* spp., e a indicação de controle biológico fica restrita a quatro produtos regulamentados pelo MAPA, a base de *T. harzianum* e *T. afroharzianum*. A partir desta informação, diversos estudos buscando alternativas de controle de *Macrophomina* spp. vêm sendo realizados.

Óleos essenciais podem ser uma alternativa de controle para *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*. Lima *et al.* (2019), desenvolveram estudos sobre o potencial do óleo essencial de cravo no controle destes fitopatógenos, obtendo resultados de até 100% de controle *in vitro*.

Sousa *et al.* (2021), concluíram que a utilização de fungicida a base de azoxistrobina e ciproconazol não influencia na severidade da doença e a resistência genética é a principal estratégia de manejo de *M. phaseolina*. A utilização de *Pseudomonas fluorescens* no controle *in vitro* de *M. phaseolina* demonstrou que esta bactéria tem potencial de uso como agente biocontrolador (Santos *et al.*, 2010).

A rotação reduz a quantidade de inóculo do patógeno nas áreas de cultivo, considerando que

os fungos causadores de podridões de colmo são necrotróficos, ou seja, são capazes de sobreviver em restos culturais dos hospedeiros, a partir disto a rotação irá reduzir os restos culturais de plantas hospedeiras (Berghetti *et al.*, 2020). Porém como algumas plantas daninhas são hospedeiras, o controle por meio da rotação de culturas é dificultado se não houver controle de plantas invasoras como breo (*Amaranthus viridis*) e pega pinto (*Boerhavia*).

Em 2019 foi apresentado o potencial dos metabólitos e proteínas produzidos por *T. arundinaceum* e *T. brevicompactum* no biocontrole *in vitro* de *M. phaseolina* (Cubilla-ríos *et al.*, 2019).

1.7. *Trichoderma* spp.

Trichoderma é um gênero de fungos pertencente a classe *Sordariomycetes* do filo *Ascomycota*, as espécies onde a fase sexuada é conhecida, tem-se como característica a formação de corpos de frutificação do tipo peritécio, os estromas podem apresentar coloração verde, amarelada, creme ou marrom, dependendo do substrato que foi colonizado. São fungos saprófitas e considerados componentes ativos da microbiota do solo, pois participam de inúmeros processos no solo. São considerados cosmopolitas, por serem encontrados em diversas áreas do mundo, sendo encontrados em regiões de clima frio, tropical e em regiões de condições extremas como o solo antártico e tanques de querosene (Meyer *et al.*, 2019).

A versatilidade deste gênero em ocupar diferentes habitats está relacionada com sua plasticidade genética, permitindo a sobrevivência em diversas localidades e em condições adversas e distintas (Zeilinger *et al.*, 2016). Outra característica que fornece esta versatilidade é o reconhecimento dos fatores ambientais por meio de proteínas que realizam a transdução de sinais e resultam na ativação ou repressão de genes, a alteração neste perfil de transcrição acarreta a produção de proteínas distintas, evidenciando a capacidade metabólica diversificada e capacidade de resposta destes organismos ao estímulo recebido (Kubicek; Komon-Zelazowska; Druzhinina, 2008; Zeilinger *et al.*, 2016).

Dentre as mais de 250 espécies de *Trichoderma* descritas até o momento, por meio de filogenia molecular, a maior parte é parasita de fungos ou decompositores de madeira em florestas tropicais e temperadas. A característica de parasitar fungos é considerada ancestral do gênero, sendo compartilhada pela maioria das espécies (Druzhinina *et al.*, 2011).

As espécies de *Trichoderma* que colonizam o solo, são mais restritas (Druzhinina *et al.*, 2011). Estas espécies são caracterizadas por fenótipos em comum, como a ampla distribuição geográfica, alta capacidade de parasitar outros fungos, rápido crescimento e agressiva colonização do solo, além de algumas destas espécies ainda realizarem interações benéficas

com plantas, ou seja, realizam interações que resultam na resistência a estresses abióticos, promovem o crescimento e podem induzir resistência a alguns fitopatógenos (Harman *et al.*, 2004). Então, espécies destes gênero vem sendo testadas e selecionadas com base no potencial de biocontrole de fitopatógenos e promoção de crescimento, ainda que as espécies com estas capacidades até o momento são pertencentes a um grupo delimitado como *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum* e *T. virens* (Woo *et al.*, 2014).

1.8. *Trichoderma* spp. COMO AGENTES BIOCONTROLADORES

Trichoderma spp. é utilizada principalmente no controle de fitopatógenos de solo, embora haja produtos recomendados para aplicações em sementes e parte aérea, a maioria dos produtos de *Trichoderma* são a base de *T. harzianum* e *T. asperelum*. A utilização destas duas espécies se dá pela facilidade de isolamento em meio artificial, além de serem ótimas competidoras no solo e resistirem a variações ambientais drásticas, apresentando também diversos mecanismos contra os fitopatógenos (Mukherjee *et al.*, 2013). Os mecanismos de ação de *Trichoderma* ocorrem por meio de antibiose, micoparasitismo e competição (Meyer *et al.*, 2019).

A antibiose é a interação entre os organismos onde uma população secreta metabólitos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento dos indivíduos de outra espécie (Bedendo *et al.*, 2011). Algumas espécies de *Trichoderma* são capazes de produzir metabólitos secundários, como antibióticos e enzimas hidrolíticas, que podem ser voláteis e não-voláteis, estes são capazes de inibir ou destruir propágulos de diferentes patógenos (Harman, 2000). Ainda outro método de inibição deste fungo é a competição por nutrientes e espaço, ou seja, a competência rizosférica avalia a capacidade da *Trichoderma* spp. de se estabelecer e competir com outros microrganismos, embora importante, não é considerada como o principal mecanismo de controle biológico, apenas como um fator complementar (Howell, 2003).

No micoparasitismo, por meio de estímulos químicos, o antagonista detecta o patógeno e cresce em sua direção, produzindo enzimas hidrolíticas que irão degradar a parede celular do patógeno. No caso do *Trichoderma* spp. a hifa se enrola na hifa ou estrutura de resistência/sobrevivência do patógeno, iniciando o processo de micoparasitismo. Após a penetração da parede celular do patógeno o fungo antagonista passa a utilizar o conteúdo celular como fonte de alimento, através de enzimas hidrolíticas como quitinases, glucanases e proteases, as quais desempenham papéis fundamentais no controle biológico (Samuels e Hebbbar, 2015).

No controle de fungos como *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Verticillium* sp. e *Fusarium* sp., a aplicação via

solo é recomendada, sendo também necessária a aplicação com intuito de atingir os restos culturais e as estruturas de sobrevivência destes fitopatógenos (Meyer *et al.*, 2019). Espécies de *Trichoderma* mostraram potencial de biocontrole de *M. phaseolina* isolado de feijão-caupi in vitro e in vivo (Oliveira *et al.*, 2021). A utilização de *Trichoderma* spp. como agente biocontrolador de *S. sclerotiorum* no feijão, soja e algodão tem apresentado excelentes resultados e produtos a base de *T. asperellum* reduziram em 90% o número de sementes infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara (Pommela, Ribeiro, 2009).

A utilização de *Trichoderma* spp. no tratamento de sementes, protege contra diversos fitopatógenos, podendo dispensar a utilização de produtos químicos. No feijão, o *T. asperellum* é utilizado para proteção contra fungos causadores do apodrecimento de grãos e doenças foliares veiculadas via semente, não sendo mais utilizado o controle químico nas sementes (Meyer *et al.*, 2019).

A utilização de *T. asperellum* apresenta potencial biocontrolador na cultura do arroz, seja ele irrigado, inundado ou de terras altas. Pesquisas realizadas no Brasil demonstram que a sua utilização foi benéfica frente a doenças como brusone (*Pyricularia grisea* Cooke ex Sacc.) e queima das bainhas (*Rhizoctonia solani* J.G. Kühn). No feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), *Trichoderma* spp. proporcionou proteção contra *Fusarium* e *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, apresentando 70% de micoparasitismo e morte dos escleródios de *S. sclerotiorum* no solo em uma única safra. Estudos realizados em cereais de inverno mostram que a utilização deste antagonista promoveu a uniformidade de desenvolvimento e redução na incidência de podridões, quando cultivada soja posteriormente aos cereais, foi observado redução na incidência de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary). Na bananeira, macieira e no meloeiro, *Trichoderma* spp. é considerado biocontrolador das principais doenças destes cultivos. No cacaueiro o biocontrole se restringe à doença vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora) (Meyer *et al.*, 2019). Assim, este trabalho objetivou i) Isolar e reconhecer espécies de *Macrophomina* patogênicas ao milho ii) selecionar isolados de *Trichoderma* antagonistas a *Macrophomina* spp. iii) avaliar o potencial de biocontrole de *Trichoderma* spp. a podridão de *Macrophomina* em milho e iv) reconhecer isolados de *Trichoderma* selecionados com potencial de biocontrole de *Macrophomina*.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa. 2. ed. UFV. 516 p. 2016.

ALMEIDA, A. M. R. *et al.* ***Macrophomina phaseolina* em soja**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2014. 55 p. (EMBRAPA Soja. Documentos, 346).

ATHAYDE SOBRINHO, C. *et al.* **Detecção de *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijão-caupi**. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 1.; REUNIÃO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 6., 2006, Teresina. Tecnologias para o agronegócio: anais. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2006.

BEDENDO, I. P.; MASSOLA JUNIOR, N. S.; AMORIM, L. Controle cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 367-388, 2011.

BERGHETTI, J. *et al.* Podridões de colmo estão associadas à precocidade de híbridos de milho. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 19, n. 4, p. 392-398, 2020.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI *et al.* **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica ceres, v. 2, p. 397, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia Alimentar para a População Brasileira / Ministério da Saúde**, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CASA, R T *et al.* Incidência de podridões de colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica** vol.33, pag.353-357. 2007.

CASELA, C.R. *et al.* **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2006. 14 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Circular técnica).

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: décimo primeiro levantamento**, Abril 2022, safra 2021/2022. Brasília, DF, 2022, 94 p. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/grãos>. Acesso em: 10 set. 2022.

CONTINI, E. *et al.* **Milho: caracterização e desafios tecnológicos**. Brasília: Embrapa, 2019. 45 p. (EMBRAPA. Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2).

COSTA, R. V. *et al.* ***Macrophomina phaseolina* em Milho Safrinha: Levantamento da Incidência e Perdas na Produtividade no Estado do Tocantins**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2019. 19 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 202).

COTA, L. V. *et al.* **Histórico e perspectivas das doenças na cultura do milho**. EMBRAPA Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2013.

CROUS, P. W. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, n. 1, p. 235-253, 2006.

CUBILLA-RÍOS, A.A. *et al.* Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. **Agronomía Mesoamericana**, p. 63-77, 2019.

DRUZHININA, I. S. *et al.* *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749, 2011.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungus-host distribution database**. Beltsville: United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, 2023. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>. Acesso em: 15 abr. 2023.

FANCELLI, A. L. Cultivo racional e sustentável requer maior conhecimento sobre planta do milho. **Visão Agrícola**, v. 13, n. 9, p. 20-23, 2015.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2.ed. Guaíba: Agropecuária, v. 1. 360p., 2004.

GAUT, B. S. *et al.* Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. In: SCIENCES, National Academy Of *et al.* **Variation and Evolution in Plants and Microorganisms: Toward a New Synthesis 50 Years after Stebbins**. Washington: The National Academy Press, 2000. Cap. 4. p. 187-210.

GARCIA, J. C. *et al.* **Aspectos econômicos da produção e utilização do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 12 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Circular técnica, 74).

HARMAN, G. E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

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

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, p. 4-10, 2003.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2022 (Tabela 5). Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados>. Acesso em: 29/10/2022.

ISHIKAWA, M. S.; RIBEIRO, N. R.; OLIVEIRA, E. C.; ALMEIDA, A. A.; BALBI-PEÑA, M. I. Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*). **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 4, p. 38-44, 2018.

KUBICEK, C. P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I. S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 10, p. 753, 2008

KUMAR, R.; SHRIVASTAVA, P.; YANDIGERI, M. S. In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: a potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 192-199, 2017.

LERAYER, A. **Guia do Milho: Tecnologia do campo a mesa**. São Paulo: Conselho de Informações Sobre Biotecnologia, 2006.

LEWANDOWSKI, V. *et al.* DDGS (grãos secos de destilaria com solúveis) como ingrediente na alimentação da tilápia do Nilo. **Sci. Agrar. Paraná**, Marechal Cândido Rondon, v. 16, p. 225-229, 2017.

LIMA, S. S. *et al.* UTILIZAÇÃO DE DDG E WDG NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES. **Zootecnia de precisão: desafios e aplicações**, v. 1, n. 1, p. 151-169, 2021.

LIMA, T. S. *et al.* **Potencial do óleo essencial de cravo da índia sobre fungos fitopatogênicos em sementes de milho**. 2019. 61 p. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Pombal, 2019.

LIMA, W. N. **DANINHAS FRENTE A LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS**. 2019. 39 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Rio Grande do Norte, Mossoró, 2019.

MACHADO, A. R. *et al.* Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 153, n. 1, p. 89-100, 2019.

MAGALHAES, P. C.; DURÃES, F. O.M. **Fisiologia da produção de milho**. Sete Lagoas, EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 10 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Circular técnica, 76).

MAIS SOJA. Uma nova “doença”?. **+SOJA**, 02/02/2021. Disponível em: <<https://maissoja.com.br/uma-nova-doenca/>>. Acesso em: 30/08/2022.

MAPA. **Valor bruto da produção agropecuária (VBP)**. 2022. (Dashboard VBP – Setembro/2022). Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-vbp>. Acesso em: 29/10/2022.

MELLO, J. F. *et al.* Identification and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with root and stem rot of sweet potato in Brazil. **Plant Pathology**, London, 2021.

MEYER, M. C. *et al.* **Trichoderma: uso na agricultura**. 1º ed. Brasília: EMBRAPA SOJA, 2019.

MICHEREFF, S. J. *et al.* Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E.G.T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**, Recife: Editora da Universidade Federal Rural de Pernambuco 2005, p. 1-18

MIRANDA, R. F. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DO *Colletotrichum gloeosporioides*, CAUSADOR DA ANTRACNOSE NO MAMOEIRO. 64 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2020.

MIRANDA, R. A. *et al.* **Sustentabilidade da cadeia produtiva do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2021. 28 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo: DOCUMENTOS, 261).

MUKHERJEE, P. K. et al. (Ed.). **Trichoderma: biology and applications**. CABI, 2013. 327 p.

MYCOBANK. **Mycobank** database: fungal databases, nomenclature & species banks. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2023. Disponível em: <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>. Acesso em: 05 abr. 2023.

NEVES, M. F. *et al.* Etanol de milho: Cenário atual e perspectivas para a cadeia no Brasil. 1º ed. Ribeirão Preto, São Paulo, UNEM, 2021.

NOGUEIRA JUNIOR, E. C. **Setor de etanol de milho no Brasil: condicionantes e estratégias competitivas**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

OLIVEIRA, L. G. *et al.* POTENCIAL DE BIOCONTROLE *Trichoderma* spp CONTRA *Macrophomina phaseolina* DE FEIJÃO-CAUPI. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 26, n. 2, 2021.

PAES, M. C. D.; TEIXEIRA, F. F.; RIBEIRO, E. P. **Variabilidade de cor e compostos fenólicos em acessos de milho pigmentados**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2020. 19 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 233).

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos químicos e tecnológicos de grão de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Circular técnica, 75).

PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E. **Cultivares de milho para safra 2022/2023**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2022. 27 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Documentos 272).

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas - uma visão empresarial. In: BETTIOL W.; MORANDI, M. A. R. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio ambiente, p. 241-244, 2009.

PHILLIPS, A. J. L. *et al.* The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.76, n. 1, p. 51-167, 2013.

RIBEIRO, N. A. *et al.* Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1003-1009, 2005.

RODRIGUES, J. *et al.* ***Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum* feijoeiro**. 2010. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2010.

SALES JUNIOR, R. *et al.* Pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in Cowpea. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 33, p. 395-401, 2020.

SALES JUNIOR, R. *et al.* Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, p. 195-198, 2012.

SAMUELS, G. J.; HEBBAR, P. K. Developing *Trichoderma*-Based Products for Application in Agriculture. In: SAMUELS, G. J.; HEBBAR, P. K. (Ed.). *Trichoderma: identification and agricultural applications*. Saint Paul: **American Phytopathological Society**. p. 7-34, 2015.

SANTOS, M. C. L.; MENDONÇA, C. M.; SHINOHARA, N. K. S. Milho e o São João: Identidade Gastronômica. **Revista Contexto da Alimentação: Comportamento, Cultura e Sociedade**, São Paulo, v. 8, n. 1, 2020.

SANTOS, K. M. *et al.* Novel specific primers for rapid identification of *Macrophomina* species. **European journal of plant pathology**, v. 156, n. 4, p. 1213-1218, 2020.

SANTOS, P.J.C. *et al.* Utilização de *Pseudomonas fluorescens* no controle biológico de *Macrophomina phaseolina*. EMBRAPA Soja-Documents (INFOTECA-E), 2010.

SARR, M. P. *et al.* Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 53, n. 2, p. 250-268, 2014.

SILVEIRA, D. C. *et al.* Caracterização agromorfológica de variedades de milho crioulo (*Zea mays* L.) na região noroeste do Rio Grande do Sul. **Rev. Ciência e Tecnologia**, Rio Grande do Sul, v. 1, p. 01-11, n. 1, 2015.

SOUSA, C. W. A. *et al.* Resistência de híbridos e aplicações de fungicida para o controle da podridão de carvão do milho. **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 52. ed., Brasília, DF Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2021.

SWEHLA, A.; PANDEY, A. K.; NAIR, R. M. Bioactivity of *Trichoderma harzianum* isolates against the fungal root rot pathogens with special reference to *Macrophomina phaseolina* causing dry root rot of mungbean. **Indian Phytopathology**, v. 73, n. 4, p. 787-792, 2020.

URBEN, A. F.; DIANESE, J. C.; MENDES, M. A. S. (org.). **Fungos em plantas no Brasil**. 2. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019. 978 p.

USDA, United States Department of Agriculture. **World Agricultural Production**. Out., 2022. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 29/10/2022.

VIDAL, M. F. **Produção e mercado de etanol**. ETENE, 2020, 10 p. (ETENE: Caderno Setorial ETENE).

WOO, S. L. *et al.* *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014.

ZEILINGER, S.; GRUBER, S.; BANSAL, R.; MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma*—Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016.

CAPÍTULO II

**Potencial antagônico de *Trichoderma erinaceum* e *Trichoderma asperelloides* a
podridão cinzenta do colmo**

**Submissão: Crop protection
Artigo completo**

1. INTRODUÇÃO

O Milho (*Zea mays*) é produzido de acordo com o propósito de uso, o grão pode ser direcionado para o consumo *in natura* na alimentação humana, sendo utilizado como matéria prima na indústria alimentícia, cervejeira, farmacêutica e de mineração (Silveira *et al.*, 2015). Há 12 anos está ocorrendo o aumento no consumo desta commodity devido a sua utilização na produção do etanol, havendo indústrias onde se utiliza somente o milho como matéria prima para este biocombustível (Neves *et al.*, 2021).

Devido a sua importância como commodity, ocorre a busca pela redução de danos causados por doenças, dentre as principais doenças limitantes à produção do milho está a podridão de colmo, doença associada a *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.V. Wils., *Stenocarpella macrospora* Earle, *Stenocarpella maydis* Berk, *Fusarium graminearum* Schewabe, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg e *Macrophomina phaseolina* Tassil (Ribeiro *et al.*, 2005; Casela *et al.*, 2006). Destas *F. graminearum*, *F. verticillioides* e *M. phaseolina* estão comumente presentes em solos, onde o sistema de cultivo adotado pode favorecer a ocorrência das doenças radiculares, visto que nestes locais ocorre seleção da microbiota levando a baixa diversidade ecológica, proporcionando o ambiente se torna favorável, facilitando a infecção das plantas por patógenos radiculares (Michereff *et al.*, 2005).

Em monitoramentos realizados pela Costa *et al.* (2019) na região conhecida como MATOPIBA, que abrange os estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia, demonstraram que a podridão de *macrophomina* é uma das principais doenças que afetam as culturas da soja e do milho (Costa *et al.*, 2019). Este patógeno acaba se beneficiando do sistema de sucessão de culturas (soja/milho), resultando no aumento do inóculo presente nas regiões produtoras. Em cultivos comerciais a redução no peso das espigas pode chegar a 40%, quando relacionando dados de diferentes híbridos a perda média foi de 27% (Costa *et al.*, 2019).

Além de ser a principal doença em áreas produtoras brasileiras, no panorama mundial há dificuldade no controle deste fitopatógeno por ser habitante natural do solo e devido a sua capacidade de produzir estruturas de resistência denominadas de microesclerócios, infectar os tecidos da casca e da medula e a ampla gama de hospedeiros incluindo plantas invasoras como *Trianthema portulacastrum* L., *Ipomea asarifolia* Roem. et Schult, *Cyperus rotundus* L., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., estas são hospedeiras de *M. phaseolina* (Sales Junior *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2019; Lima, 2019), outras plantas invasoras como *Boerhavia diffusa* L. e *T. portulacastrum* são hospedeiras de *M. pseudophaseolina* (Sales Junior *et al.*, 2020).

Com base na ampla gama de hospedeiros alternativos e no Brasil a ausência de produtos

regulamentados para o controle químico devido a baixa eficiência na utilização de fungicidas a base de azoxistrobina e ciproconazol no controle de *M. phaseolina* (Sousa *et al.*, 2021).

A indicação é a utilização de controle biológico, porém, no Brasil, há sete produtos regulamentados pelo Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento – MAPA, a base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma afroharzianum*, enquanto há seis produtos com mix de agentes biocontroladores e três produtos com base em *Bacillus velezensis* e *Bacillus amyloliquefaciens*. A partir desta informação diversos estudos buscando alternativas de controle de *Macrophomina* spp. vem sendo realizados. No entanto, ainda existem muitos isolados potenciais do gênero fúngico *Trichoderma*, que podem atuar como agentes de biocontrole. É crucial conduzir estudos para identificar e selecionar os isolados mais promissores em termos desse potencial. O presente estudo foi conduzido com intuito de realizar a triagem de isolados de *Trichoderma* com potencial biocontrolador de podridão de *Macrophomina* na cultura do milho. Os resultados deste estudo irão contribuir com o avanço do controle biológico da podridão de *Macrophomina* na cultura do milho, por meio da identificação de espécies de *Trichoderma* que apresentam potencial antagônico a este fitopatógeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados de *Macrophomina* foram obtidos através do isolamento direto e indireto realizado em plantas de milho e soja que apresentavam sintomas de podridão de *macrophomina*, provenientes de cultivos comerciais de 5 municípios do estado de Mato Grosso, totalizando 19 isolados, adicionalmente foram cedidos 54 isolados de *Trichoderma*, 2 isolados de *M. pseudophaseolina* e 2 isolados de *Macrophomina euphorbicola* foram cedidos pela coleção fungos de solos do laboratório Fungos de solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O isolamento direto consistiu na observação e retirada de estruturas do fitopatógeno de plantas doentes, estas estruturas foram depositadas em placas de petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubadas para crescimento, após 3 dias de crescimento as colônias formadas foram repicadas para outro placa contendo BDA e este processo de repicagem se repetiu até a purificação da colônia. Enquanto o isolamento indireto se da por meio da obtenção de fragmentos com 5 x 5 mm retirados da intersecção do tecido sintomático e tecido sadio, estes fragmentos serão desinfestados em álcool 70% e posteriormente em hipoclorito 1%, após a desinfestação retira-se o excesso de hipoclorito em água destilada

esterilizada sendo depositada em placas de petri contendo BDA, com 3 dias de crescimento repete-se os passos utilizados para purificação da colônia no isolamento direto (Alfenas; Mafia, 2016).

2.2. TESTE DE PATOGENICIDADE

O teste de patogenicidade foi realizado em plantas de milho crioulo “Batité” (*Zea mays*), por meio do teste do palito infestado em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Santos *et al.*, 2020). O solo foi esterilizado em autoclave à 121°C durante 2 horas, aguardando 7 dias de volatilização em bancada para realizar o plantio do milho. A inoculação foi realizada 15 dias após a emergência das plantas e a avaliação foi realizada 15 dias após a inoculação.

A colonização do palito ocorreu com o corte de palitos em 20mm de comprimento medidos a partir da ponta, posteriormente os palitos foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 1 hora e após 24 horas repetiu-se a esterilização. Após a esterilização, em placas de Petri contendo meio BDA e um disco de 5mm de diâmetro do patógeno depositado no centro da placa e os palitos foram depositados nas bordas do crescimento da colônia, as placas foram vedadas e acondicionadas em BOD a $\pm 30^{\circ}\text{C}$, pelo período de 15 dias.

Após o período de colonização os palitos foram retirados e depositados em placas de Petri estéreis, para reduzir a umidade, por 7 dias. Então após a secagem foi realizada a inoculação nas plantas de milho, o palito foi inserido a 20mm de altura, marcados a partir do nível do solo.

A patogenicidade foi confirmada por meio da presença de sintomas necróticos no colmo das plantas de milho, iniciando o sintomas no local de inserção do palito. No teste de patogenicidade foram testados os 19 isolados provenientes do estado de Mato Grosso, além de 15 isolados cedidos pela Coleção Maria Menezes (CMM) da UFRPE.

2.3. TESTE DE ANTAGONISMO

2.3.1. SCREEN DE PAREAMENTO

O screen de pareamento para verificar o potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* sobre os isolados de *M. phaseolina* (CFS1033) e *M. pseudophaseolina* (CMM4131) foi realizado utilizando discos de 5mm retirados do crescimento dos isolados com 5 dias de crescimento (Oliveira *et al.*, 2021). Os discos foram depositados em extremidade opostas na placa de Petri contendo BDA, em uma extremidade o patógeno e na outra o isolado do agente biocontrolador. A avaliação foi realizada utilizando a escala de Bell *et al.* (1982) adaptada por Rodrigues (2010) (Equação 1).

A partir dos dados de crescimento micelial foi possível calcular a porcentagem de

inibição do crescimento micelial por meio da fórmula descrita por Asran-amal *et al.* (2010).

Equação 1:

$$\%inibição = \left[\frac{(CTest. - CTrat.)}{CTest} \right] \times 100$$

Sendo:

Ctest: Crescimento da testemunha;

Ctrat: Crescimento do Tratamento n.

2.3.2. SCREEN DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NÃO VOLÁTEIS (CONV's)

A obtenção dos compostos orgânicos não voláteis ocorreu por meio do cultivo dos isolados, selecionados no screen de pareamento, em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio Batata dextrose (BD) durante 5 dias com agitação de 150 rpm a 28°C, após a obtenção os CONV's foram filtrados em membrana milipore (0,45 µm) e adicionados 10 mL de CONV's filtrados em 60 mL de meio Batata Dextrose Ágar (BDA) a $\pm$ 45°C, então o meio de cultura contendo os compostos foi vertido e após solidificação os isolados foram repicados no centro da placa de Petri. Mensurações diárias dos diâmetros da colônia compuseram a avaliação, quanto menor o diâmetro do patógeno maior o efeito dos CONV's do biocontrolador sobre o patógeno (Miranda, 2020). Os dados obtidos foram submetidos a fórmula de porcentagem de inibição de crescimento de Abbott (1925) (Equação 2).

Equação 2:

$$PIC = \left(\frac{D_{tn} - D_t}{D_{tn}} \right) \times 100$$

PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%);

D_{tn} = diâmetro (cm) da testemunha negativa;

D_t = diâmetro (cm) do tratamento.

A área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) foi calculada através da equação adaptada, de Campbell e Madden (1990):

Equação 3:

$$AACCM = \sum \left(\frac{Y_{i+n1} + Y_i}{2} \right) \times (X_{i+1} - X_i)$$

Sendo:

Y_i = Crescimento micelial (cm) em “i” observação;

X_i = Tempo (dias) da “i” observação;

n = Número total de observações.

2.3.3. SCREEN DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COV's)

O screen de COV's consistiu em posicionar dois fundos de placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, em um dos fundos foi repicado o agente biocontrolador, enquanto no outro fundo foi repicado o patógeno, as placas controle contendo apenas o patógeno em um dos fundos. A avaliação consiste na mensuração diária dos diâmetros das colônias do patógeno, neste caso quanto menor for o diâmetro do crescimento do patógeno maior o controle exercido pelos COV's do biocontrolador (Miranda, 2020).

2.4. BIOCONTROLE *in vivo*

O ensaio de biocontrole *in vivo*, foi realizado em dois períodos, período 1 (de 04/08/2023 até 07/10/2023) e período 2 (de 31/10/2023 até 20/12/2023), na casa de vegetação da UFRPE, Recife, Pernambuco. Utilizando os isolados de *Trichoderma* selecionados nos ensaios de Screen, os patógenos utilizados foram 2 isolados de *M. phaseolina* (CFS1033 e CFS1039), 2 isolados de *M. pseudophaseolina* (CMM4131 e CMM4161) e 2 isolados de *Macrophomina euphorbicola* (CMM2718 e CMM4134). O milho crioulo “Batité” foi utilizado em ambas as etapas dos ensaios de biocontrole.

O substrato utilizado foi preparado por meio da adição de 1 parte de composto obtido do Departamento de energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, misturado a 5 partes do solo, após a mistura o solo foi autoclavado a 121°C por 2 h, sendo acondicionado em bancada para volatilização de compostos produzidos na autoclavagem durante 7 dias, após este período foi realizada a infestação do solo com os isolados de *Macrophomina*.

O preparo dos inóculos dos patógenos e dos agentes biocontroladores consistiu no cultivo dos isolados em saquinhos de polipropileno contendo 30 gramas de arroz esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos, cada saquinho equivale a quantidade de inóculo suficiente para infestação de um vaso contendo 3kg de solo. Após a esterilização foram adicionados 2 discos miceliais de cada isolado, retirados de colônias com 7 dias de crescimento, após vedação estes saquinhos foram acondicionados em BOD a $\pm 30^\circ\text{C}$ sendo durante 10 dias para posterior trituração e infestação dos vasos por meio da homogeneização do inóculo no solo.

A infestação do solo com os isolados de *Macrophomina* ocorreu 10 dias antes do plantio do milho e inoculação dos isolados de *Trichoderma*. A inoculação de *Trichoderma* consistiu na adição de 3 g de arroz colonizado abaixo da semente, sendo separado da semente por uma fração de solo. A restrição hídrica, iniciou 20 dias após a emergência das plantas (DAE) e consistiu em irrigar as plantas somente quando apresentassem sinais de déficit hídrico, ou seja, quando iniciavam o enrolamento das folhas, prosseguindo até o dia da avaliação 45 DAE.

A avaliação integrou a lavagem das raízes para observação dos sintomas como necroses e microesclerócios, além do plaqueamento dos fragmentos necróticos para confirmação da presença de *Macrophomina* nestes sintomas, sendo observado o crescimento diariamente até a identificação da presença ou ausência do patógeno.

2.5. EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO

Os isolados foram cultivados em meio BDA durante 7 dias a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12h. O crescimento micelial foi raspado da superfície e seguiu-se o protocolo de extração de DNA descrito por Pinho *et al.*, (2013). Posteriormente as amostras de DNA foram ajustadas para concentração de 25 ng para então ser realizado a amplificação por meio da PCR.

Para os isolados de *Macrophomina* foi realizada a detecção das espécies por meio da utilização de detecção das regiões TEF-1 α com os primers de detecção propostos por Santos *et al.* (2020), presentes na tabela 1.

Tabela 1

Primers baseados em TEF-1 α utilizados na detecção de *M. phaseolina* (MpTefF e MpTefR), *M. pseudophaseolina* (MsTefF e MsTefR) e *M. euphorbiicola* (MeTefF e MeTefR).

Primer	Sequência do primer
MpTefF	5'-AAACACACTTTTCGCACTCCTGC-3'
MpTefR	5'-TATGCTCGCAGAGAAGAACACGA-3'
MsTefF	5'-GGCACACTTTTCGCGCTTCTGTA-3'
MsTefR	5'-TGTGCTCGCTGGGAAGAACATGA-3'
MeTefF	5'-AAGCATACTTTTCGTGCTCCTGC-3'
MeTefR	5'-AAAGGAACATGAGTGGCCAAAAA-3'

Enquanto para os isolados de *Trichoderma* selecionados como biocontroladores da podridão cinzenta do colmo foi realizado a extração, PCR e posterior sequenciamento. Os primers utilizados para reação de PCR dos isolados de *Trichoderma* foram das regiões ITS1

(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), *rpb2*-5F (5'- 3'), *rpb2*-7Cr (5'- 3') e *ef1-α*R (5'- 3'), *ef1-α*F (5'- 3')

As ciclagens térmicas da PCR foram realizadas em SimpliAmp™ Thermo Cycler (Thermo Scientific, Waltham, USA) com desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55 a 56°C por 45 seg (55°C para *rpb2* e 56°C para ITS e *teflα*) e 72°C por 1 min seguido da extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram corados com SYBR® green (Thermo Scientific, Waltham, USA) e visualizados em gel de agarose a 1,5%.

Os produtos da PCR com resultados positivos foram purificados com acetato de amônio e etanol. As sequências gênicas foram obtidas por eletroforese capilar em sequenciador automático ABI3500, utilizando polímero POP7 e BigDye terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os mesmos conjuntos de iniciadores utilizados na amplificação por PCR.

2.6. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequências gênicas foram montadas em contigs, editadas usando MEGA 7 e as sequências consenso comparadas com as sequências referências de *Trichoderma* ex-tipo recuperadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As regiões utilizadas na PCR e sequenciamento foram ITS, *tef1-α* e *rpb2*.

A filogenia foi inferida comparando-se os agrupamentos filogenéticos individuais e concatenados (lôcus ITS, *tef1-α* e *rpb2*) por Análise de Máxima Verossimilhança - MV no portal CIPRES (<https://www.phylo.org>). As análises de ML foram estimadas com a ferramenta RAxML-HPC2 on XSEDE, modelo GTR GAMMA, e a melhor topologia de árvore atrelada aos valores de Bootstrap em 1000 pseudoreplicatas.

As árvores enraizadas com *Protocrea farinosa* (CBS121551) foram visualizadas utilizando a ferramenta FigTree Versão 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>), os isolados utilizados na análise filogenética estão expostos na tabela 2.

Tabela 2

Espécies de *Trichoderma* e *Protocrea* utilizados na análise filogenética.

Espécies	Nº do isolado	NCBI número de acesso		
		ITS	RPB	TEF
<i>Protocrea farinosa</i>	CBS 121551	MH863119	EU703935	EU703889
<i>T. hainanense</i>	HMAS 248837*	KY687920	KY687976	KY688033
<i>T. helicelixii</i>	CBS 133499*	NA	KJ665278	KJ665517
<i>T. hirsutum</i>	HMAS 248834*	KY687916	KY687972	KY688029

<i>T. hunanense</i>	HMAS 248841*	NR_154571	KY687980	KY688039
<i>T. longisporum</i>	HMAS 248843*	KY687926	KY687982	KY688043
<i>T. pinicola</i>	KACC 48486 *	MH050354	MH025993	MH025981
<i>T. simplex</i>	HMAS 248842*	KY687925	KY687981	KY688041
<i>T. asperellum</i> TRS744		kp009370	KP009072	KP008927
<i>T. asperellum</i>	CBS 433.97*	MH021852.1	-	AY376058.1
<i>T. asperellum</i>	CEN1464	MK714908	-	MK696666
<i>T. asperellum</i>	CGMCC 6422	KF425754	KF425755	KF425756
<i>T. asperellum</i>	GJS 91-162	FJ442224	FJ442774	FJ463285
<i>T. asperellum</i>	TRS705	kp009366	KP009068	KP009011
<i>T. erinaceum</i>	TV228	KP263692	-	-
<i>T. erinaceum</i>	UOC 31G10- 2	KJ381061	-	-
<i>T. erinaceum</i>	CEN1420	MK714900	MK696819	MK696658
<i>T. erinaceum</i>	CEN1421	MK714901	MK696820	MK696659
<i>T. erinaceum</i>	DAOM 230019*	DQ083009	EU248603	AY750880
<i>T. asperelloides</i>	GJS 04-111*	-	GU198281	GU198294
<i>T. asperelloides</i>	GJS 04-217	DQ381957	-	DQ381958
<i>T. asperelloides</i>	GJS 04-187	JN133553	JN133560	JN133571
<i>T. orientale</i>	GJS 04-316*	NA	JN175520	JN175576
<i>T. albolutescens</i>	CBS:119286*	MH863056	FJ860517	FJ860609
<i>T. polysporum</i>	CBS 820.68*	MH859230	DQ087238	AF400989

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes à porcentagem de inibição e severidade foram submetidos à análise de variância e a diferença estatística entre os tratamentos com agente biocontrolador e o controle foi quantificada pelo teste de Scott-Knott com grau de significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

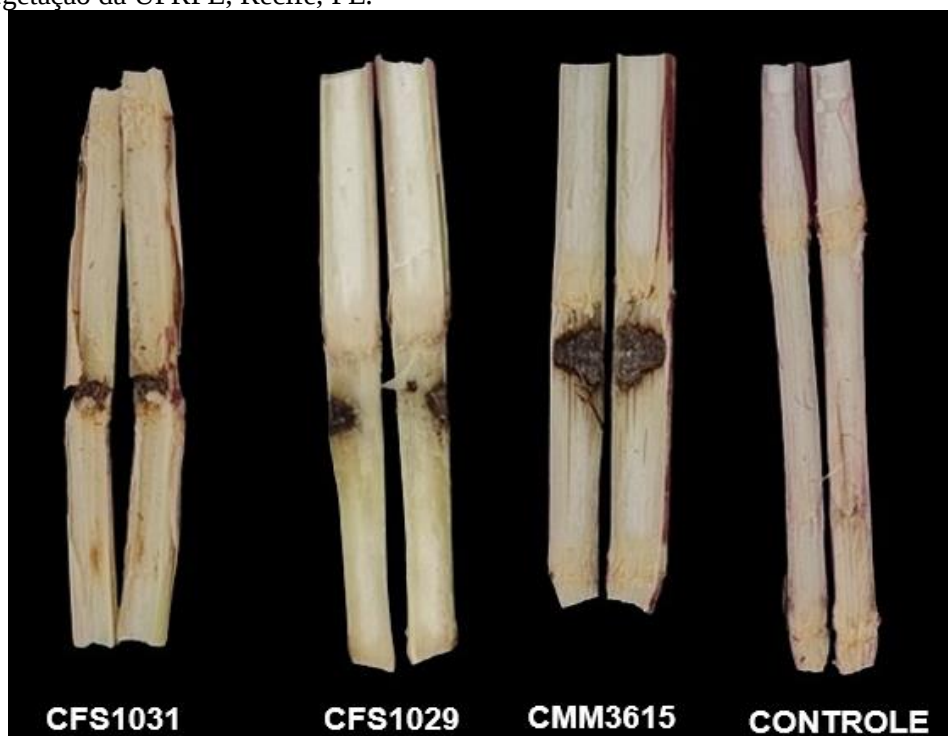
3.1. PATOGENICIDADE

Segundo o teste de patogenicidade realizado, os isolados considerados patogênicos foram aqueles que apresentaram sintomas de necrose no caule, na região em torno de onde foi realizada a inserção do palito infestado com o patógeno, conforme Figura 1. Com isso, dos 34 isolados de *Macrophomina* testados, 33 isolados são patogênicos ao milho, sendo que todos os isolados provenientes de áreas produtoras do estado de Mato Grosso foram patogênicos ao

milho, confirmando a importância deste patógeno para a cultura.

Figura 1

Sintomas causados por *Macrophomina*, aos 45 dias após emergência das plantas, no ensaio de patogenicidade em plantas de milho crioulo Batité (*Zea mays*) pelo método de inoculação via palito, em casa de vegetação da UFRPE, Recife, PE.



3.2. ANTAGONISMO

O potencial antagonístico de isolados de *Trichoderma* spp. aos patógenos *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* foi demonstrado em três ensaios de screen, sendo: pareamento, compostos orgânicos voláteis (COV's) e compostos orgânicos não voláteis (CONV's).

3.3. PAREAMENTO

No ensaio de pareamento de pareamento os isolados de *Trichoderma* CFSB168, CFS1017, CFS1018 e CFSI376 expressam as maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial do isolado CMM4131 com 47,44%, 45,97%, 42,85% e 41,75% respectivamente (Tabela 3). Enquanto para o isolado CFS1033 as maiores porcentagens de inibição foram expressas pelos isolados CFS1017 (53,24%), CFS1018 (45,93%), CFSB168 (44,01%), e CFS236 (42,86%) (Tabela 4).

Tabela 3

Médias de porcentagem de inibição de crescimento micelial de *Macrophomina pseudophaseolina* (CMM4131) frente aos isolados de *Trichoderma*, obtidas no ensaio de pareamento, com avaliação realizada 3 dias após a montagem do ensaio. Diferentes letras subscritas ao lado dos valores de porcentagem indicam diferenças significativas.

Isolados	Inibição do crescimento micelial (%)
B168	47,44 ^a
1017	45,97 ^a
1018	42,85 ^a
I376	41,75 ^a
13	36,69 ^b
156	35,92 ^b
180	35,86 ^b
H367	35,53 ^b
148	35,15 ^b
152	34,30 ^b
14	33,14 ^b
157	33,14 ^b
172	32,85 ^b
25	32,81 ^b
16	32,81 ^b
187	32,81 ^b
234	32,79 ^b
22	32,74 ^b
176	32,66 ^b
147	32,36 ^b
E236	32,31 ^b
21	31,95 ^b
149	30,80 ^c
529	30,79 ^c
17	30,76 ^c
G139	30,39 ^c
169	30,36 ^c
151	29,95 ^c
170	29,61 ^c
24	29,20 ^c
158	29,20 ^c
L314	29,14 ^c
476	28,78 ^c
231	28,76 ^c
230	28,75 ^c
233	27,97 ^c
183	27,97 ^c
217	27,94 ^c
181	27,58 ^c
236	27,23 ^c
177	27,23 ^c
165	26,76 ^c
227	26,42 ^c

155	26,33 ^c
226	26,03 ^c
F258	26,02 ^c
225	25,63 ^c
149	24,51 ^c
173	24,02 ^c
182	22,40 ^d
229	16,88 ^e
I432	16,17 ^e
160	15,73 ^e

Tabela 4

Médias de porcentagem de inibição de crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (CFS1033) frente aos isolados de *Trichoderma*, obtidas no ensaio de pareamento, com avaliação realizada 3 dias após a montagem do ensaio. Diferentes letras subscritas ao lado dos valores de porcentagem indicam diferenças significativas.

Isolado	Inibição do crescimento micelial (%)
CFS1017	53,24 ^a
CFS1018	45,93 ^b
CFSB168	44,00 ^b
CFS236	42,85 ^b
CFSG139	39,72 ^c
CFS234	39,37 ^c
CFS157	38,96 ^c
CFS231	38,60 ^c
CFS147	38,21 ^c
CFS187	37,86 ^c
CFS172	37,46 ^c
CFS225	37,45 ^c
CFS176	35,91 ^c
CFSE236	35,87 ^c
CFS148	35,50 ^c
CFS226	34,73 ^c
CFSH367	34,36 ^d
CFS177	34,34 ^d
CFS233	33,97 ^d
CFS152	33,97 ^d
CFS183	33,58 ^d
CFS217	32,44 ^d
CFS169	32,04 ^d
CFS476	32,04 ^d
CFSI376	32,04 ^d
CFS156	31,65 ^d
CFS24	31,63 ^d
CFS22	30,88 ^d
CFS16	30,50 ^d
CFS25	30,49 ^d
CFS181	30,10 ^d
CFS21	30,09 ^d
CFS229	30,09 ^d
CFS230	30,08 ^d
CFS173	29,73 ^d

CFS17	29,33 ^d
CFS227	28,94 ^d
CFS151	28,56 ^e
CFS14	28,17 ^e
CFS158	27,81 ^e
CFS182	27,38 ^e
CFS160	27,37 ^e
CFS529	26,99 ^e
CFS15	26,99 ^e
CFS155	26,23 ^e
CFS170	25,47 ^e
CFS149	25,46 ^e
CFSF258	25,06 ^e
CFS13	25,06 ^e
CFSL314	23,96 ^e
CFSI432	20,05 ^f

3.4. COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COV's)

Os isolados CFSB168, CFS1017, CFS1018, CFSI376 e CFS236 foram selecionados no screen de pareamento, sendo submetidos ao screen de COV's onde o isolado de *Trichoderma* sp. (CFS1017) demonstrou efeito de seus compostos com a maior porcentagem de inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* em 19,57% e *M. pseudophaseolina* em 22,44%; enquanto o isolado de *Trichoderma* (CFS1018) apresentou potencial equiparado e não diferindo do isolado CFS1017 quando utilizado no controle de *M. pseudophaseolina* com 20,07% de inibição do crescimento micelial (Tabela 5).

Tabela 5

Porcentagem de inibição do crescimento micelial (%) dos isolados de *Macrophomina pseudophaseolina* (CMM4131) e *Macrophomina phaseolina* (CFS1033) pelos compostos orgânicos voláteis dos isolados de *Trichoderma*. Diferentes letras subscritas ao lado dos valores de porcentagem indicam diferenças significativas.

Isolado de <i>Trichoderma</i>	Inibição de <i>M. pseudophaseolina</i> (CMM4131)	Inibição de <i>M. phaseolina</i> (CFS1033)
CFS1017	22,44 ^a	19,57 ^a
CFS1018	20,07 ^a	13,72 ^b
CFS236	4,81 ^b	2,66 ^c
CFSB168	2,68 ^b	2,44 ^c
CFSI376	0,00 ^c	0,55 ^c

3.5. COMPOSTOS ORGÂNICOS NÃO VOLÁTEIS (CONV's)

O teste dos efeitos dos compostos orgânicos não voláteis dos isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial de *M. phaseolina* (Figura 2) e *M. pseudophaseolina* (Figura 3),

demonstrou que apenas o isolado CFSB168 apresenta compostos com potencial de biocontrole para ambos os isolados testados, visto que inibiu 60,95% do crescimento micelial de *M. pseudophaseolina* e 31,01% do crescimento micelial de *M. phaseolina*, enquanto os demais isolados do biocontrolador apresentaram inibição inferior a 16% para *M. pseudophaseolina* e abaixo de 4% para *M. phaseolina* (Tabela 6).

Figura 2

Influência dos CONV's sobre o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (CFS1033), 2 dias de crescimento. Na prancha estão as placas referentes aos tratamentos A – Controle negativo (ausência de CONV's), B – CONV's do isolado CFS1018, C – CONV's do isolado CFSB168, D – CONV's do isolado CFS236, E – CONV's do isolado CFS1017 e F – CONV's do isolado CFSI376.

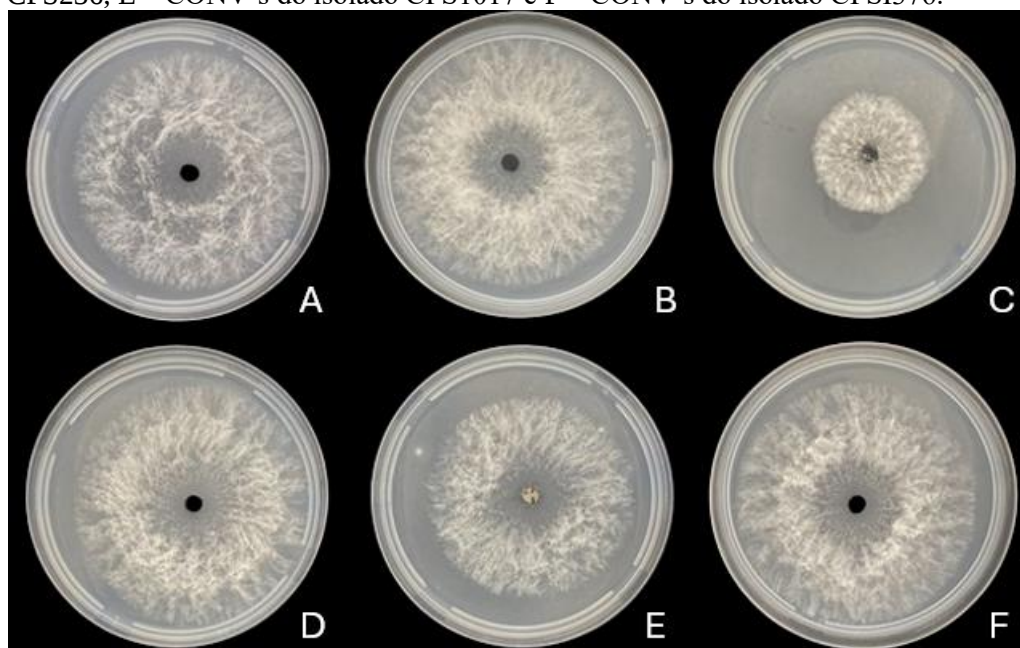


Figura 3

Influência dos CONV's sobre o crescimento micelial de *Macrophomina pseudophaseolina* (CMM4131), 2 dias de crescimento. Na prancha estão as placas referentes aos tratamentos A – Controle negativo (ausência de CONV's), B – CONV's do isolado CFS1018, C – CONV's do isolado CFSB168, D – CONV's do isolado CFS236, E – CONV's do isolado CFS1017 e F – CONV's do isolado CFSI376.

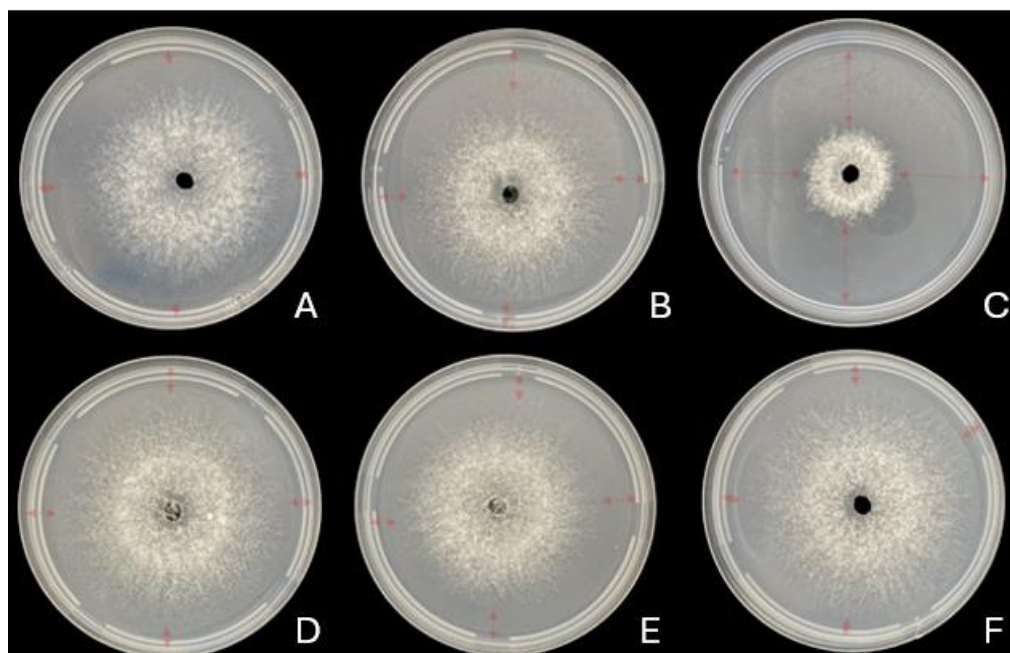


Tabela 6

Porcentagem de inibição do crescimento micelial (%) dos isolados de *Macrophomina pseudophaseolina* (CMM4131) e *Macrophomina phaseolina* (CFS1033) pelos compostos orgânicos não voláteis dos isolados de *Trichoderma*. Diferentes letras subscritas ao lado dos valores de porcentagem indicam diferenças significativas.

Isolado de <i>Trichoderma</i>	Inibição de <i>M. pseudophaseolina</i> (CMM4131)	Inibição de <i>M. phaseolina</i> (CFS1033)
CFSB168	60,95 ^a	31,01 ^a
CFS1017	15,11 ^b	0,00 ^b
CFS1018	13,47 ^b	3,25 ^b
CFSI376	10,63 ^c	0,69 ^b
CFS236	6,98 ^c	0,00 ^b

3.6. BIOCONTROLE *in vivo*

Os isolados CFS1017 e CFS1018 foram selecionados pelo seu potencial no ensaio de COV's, enquanto o isolado CFSB168 foi selecionado nos ensaios de CONV's pelo seu potencial.

No ensaio de biocontrole 1 todos os isolados de *Trichoderma* influenciaram na severidade da doença dos isolados de *M. phaseolina*, entretanto apenas o isolado CFS1018 apresentou menor eficiência na redução da severidade do isolado CFS1033, porém, ainda há redução de 4,50% em relação ao controle inoculado, enquanto os demais isolados reduziram em no mínimo 10% a severidade para o isolado CFS1033 e 9,5% para o isolado CFS1039, no ensaio 2 de biocontrole observou-se que os isolados CFSB168, CFS1018 e CFS1017 reduziram em 3%, 3,25% e 3,75%, respectivamente, a severidade do isolado CFS1033. Enquanto para o

isolado CFS1039 houve redução de 4% da severidade pelo isolado de *Trichoderma* CFS1017 e 6% para os demais isolados testados (Tabela 7).

Tabela 7

Efeito da utilização de isolados de *Trichoderma* sobre a severidade de podridão carvão causada pelos isolados de *Macrophomina phaseolina* (CFS1033 e CFS1039) em plantas de milho crioulo Batité sobre condições de casa de vegetação. Diferentes letras subscritas ao lado dos valores de porcentagem indicam diferenças significativas.

Tratamentos	CFS1033 severidade (%)		CFS1039 severidade(%)	
	I Test	II Test	I Test	II Test
Controle inoculado	10,50 ^a	3,75 ^a	9,50 ^a	6,00 ^a
CFS1018	5,00 ^b	0,50 ^b	0,00 ^b	0,00 ^c
CFS1017	0,50 ^c	0,25 ^b	0,00 ^b	2,00 ^b
CFSB168	0,00 ^c	0,75 ^b	0,00 ^b	0,00 ^c
Controle Sem inoculação	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^c

Os isolados de *M. pseudophaseolina* CMM4131 e CMM4161 demonstraram a severidade afetada por todos os isolados de *Trichoderma*, sendo no ensaio 1 reduzida a severidade do isolado CMM4131 em 8% pelo isolado do biocontrolador CFS1017 e 8,5% pelos demais isolados. Enquanto a severidade do isolado CMM4161 foi reduzida em 9% pelo isolado CFS1018, 9,5% pelo isolado CFSB168 e 10,25% pelo isolado CFS1017, enquanto no ensaio 2 a severidade do isolado CMM4131 em 1% pelo isolado do biocontrolador CFS1017 e 2,75% pelos demais isolados. A severidade do isolado CMM4161 foi reduzida em 3,75% pelo isolado CFSB168 e 4,5% pelos demais isolados (Tabela 8).

Tabela 8

Efeito da utilização de isolados de *Trichoderma* sobre a severidade de podridão carvão causada pelos isolados de *Macrophomina pseudophaseolina* (CMM4131 e CMM4161) em plantas de milho crioulo Batité sobre condições de casa de vegetação. Diferentes letras subscritas ao lado dos valores de porcentagem indicam diferenças significativas.

Tratamentos	CMM4131 severidade (%)		CMM4161 severidade(%)	
	I Test	II Test	I Test	II Test
Controle inoculado	8,50 ^a	2,75 ^a	10,25 ^a	4,50 ^a
CFS1017	0,50 ^b	1,75 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b
CFS1018	0,00 ^b	0,00 ^b	1,25 ^b	0,00 ^b
CFSB168	0,00 ^b	0,00 ^b	0,75 ^b	0,75 ^b
Controle Sem inoculação	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b

No ensaio de biocontrole 1 de *M. euphorbiicola* o isolado CMM2718 apresentou redução na sua severidade em 6,25% por todos os isolado de *Trichoderma*, enquanto a severidade do isolado CMM4134 foi reduzida em 3,25% pelo isolado CFS1017 e CFS1018 e

em 3,5% pelo isolado CFSB168. No segundo ensaio o isolado CMM2718 apresentou redução de 3,75% quando utilizado o CFS1017 e 4,50% quando utilizado os demais isolados, entretanto a redução na severidade do isolado CMM4134 foi superior com 5,75% de redução quando utilizado o isolado CFS1017 e 6% para os demais (Tabela 9).

Tabela 9

Efeito da utilização de isolados de *Trichoderma* sobre a severidade de podridão carvão causada pelos isolados de *Macrophomina euphorbiicola* (CMM2718 e CMM4134) em plantas de milho crioulo Batité sobre condições de casa de vegetação. Diferentes letras subscritas ao lado dos valores de porcentagem indicam diferenças significativas.

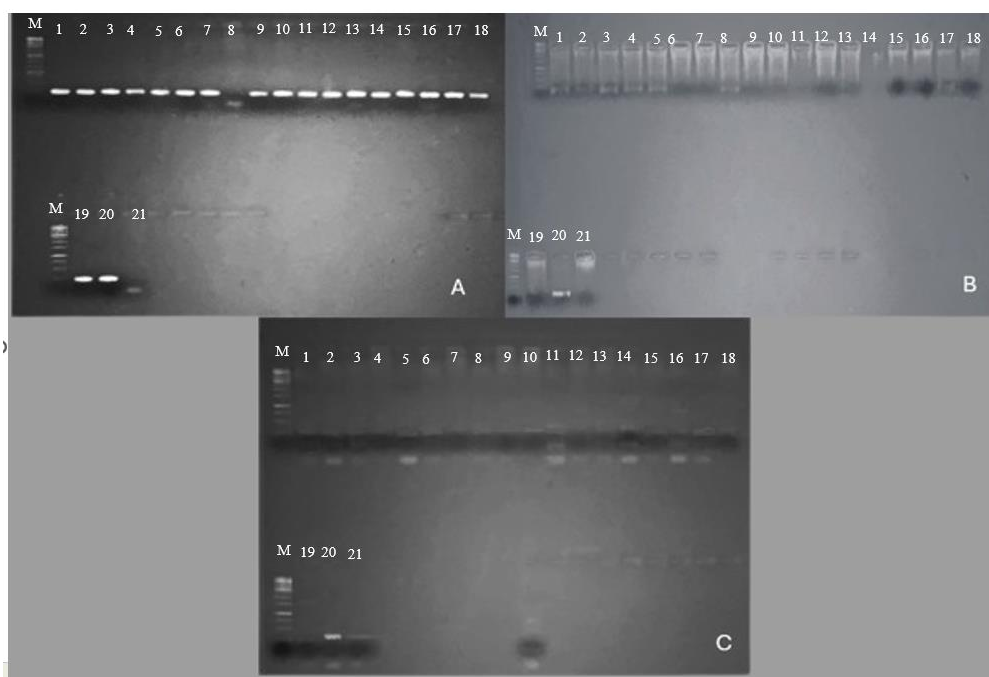
Tratamentos	CMM2718 severidade (%)		CMM4134 severidade(%)	
	I Test	II Test	I Test	II Test
Controle inoculado	6,25 ^a	4,50 ^a	3,50 ^a	6,00 ^a
CFS1017	0,00 ^b	0,00 ^b	0,25 ^b	0,25 ^b
CFS1018	0,00 ^b	0,00 ^b	0,25 ^b	0,00 ^b
CFSB168	0,00 ^b	0,75 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
Controle Sem inoculação	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b

3.7. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Macrophomina*

Todos os isolados obtidos de regiões produtivas de Mato Grosso demonstraram ser de *M. phaseolina*, visto que amplificaram apenas quando utilizado os primers de detecção desta espécie, apenas o isolado CFS1030 não amplificou para nenhuma das espécies, podendo indicar nova espécie (Figura 4).

Figura 4

Deteção de *Macrophomina phaseolina* (A), *Macrophomina euphorbiicola* (B) e *Macrophomina pseudophaseolina* (C), sendo M o marcador de DNA, de 1 a 19 são os isolados submetidos a detecção sendo CFS1023, CFS1024, CFS1025, CFS1026, CFS1027, CFS1028, CFS1029, CFS1030, CFS1031, CFS1032, CFS1033, CFS1034, CFS1035, CFS1036, CFS1037, CFS1038, CFS1039, CFS1040 E CFS1041 respectivamente, linha 20 refere-se ao controle positivo de cada espécie, enquanto 21 é o controle negativo da reação de PCR.



3.8. IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma*

As espécies dos isolados de *Trichoderma* selecionados com potencial biocontrolador foram submetidas a análise filogenética de máxima verossimilhança e os isolados CFS1017 e CFS1018 foram classificados como *T. erinaceum*, e o isolado CFSB168 foi classificado como *T. asperelloides* (figura 5).

Figura 5

Árvore de máxima verossimilhança – MV de espécies de *Trichoderma* baseada nas regiões gênicas ITS, *tef1-α* e *rpb2*, enraizada com *Protocrea farinosa* (CBS121551).

Os isolados selecionados no ensaio de pareamento apresentaram inibição de 42,85% a 53,24%, estes dados corroboram com outros trabalhos encontrados na literatura onde isolados

de *Trichoderma* apresentaram entre 20,22% e 76,8% de inibição frente o isolado de *M. phaseolina* (Khan, *et al.* 2019; Khaledi e Taheri, 2016).

Ainda no ensaio de pareamento foi possível observar a sobreposição das colônias após 5 dias, podendo indicar o micoparasitismo, sendo que após realizar a penetração o BCA passa a utilizar o conteúdo celular como fonte de nutrientes, ocorrendo a descoloração da colônia do fitopatógeno, sendo está descoloração observada quando a colônia foi sobreposta (Figura 6) (Samuels e Hebbar, 2015).

Figura 6

Placas do teste de pareamento, a esquerda no momento da avaliação e à direita 5 dias após a avaliação, demonstrando a sobreposição da colônia de *Macrophomina phaseolina* (CFS1033) pelo isolado de *Trichoderma erinaceum* (CFS1017).



O potencial antibiótico destes isolados foi aferido nos ensaios de COV's e CONV's. Os compostos, sendo eles voláteis ou não voláteis, atuam inibindo ou destruindo propágulos de diferentes patógenos (Harman, 2000). Estes compostos orgânicos são secretados por meio do metabolismo de cada isolado, sendo alterada a produção de acordo com a interação, podendo haver mais de 130 compostos produzidos (Bedendo *et al.*, 2011; Sridharan *et al.*, 2021). Foi relatado na interação entre *T. erinaceum* e *Pythium ultimum* o alceno (Z)-5-amino-5-(1,1,2-trihydroxybuta-1,3-dienyloxy) pentane-6,7,8,9-tetraol, composto que apresentou inibição significativa no crescimento do patógeno (Siebatcheu *et al.*, 2023).

Outro efeito destes compostos é a alteração morfológica e redução na formação dos microesclerócios (Sridharan *et al.*, 2021). Além disso, os compostos podem atuar como promotores de crescimento de plantas, havendo ainda a possibilidade de serem utilizados consorciados ao isolado de *Trichoderma* (Sridharan *et al.*, 2020).

Assim, os isolados de *Trichoderma erinaceum* (CFS1017 e CFS1018) testados neste presente estudo apresentaram inibição do crescimento micelial semelhante aos encontrados por

Sridharan *et al.* (2021) ao avaliar *T. longibrachiatum* sobre o crescimento micelial de *M. phaseolina*, ou seja, 19,57% a 22,44%.

A baixa severidade encontrada no ensaio *in vivo* deve-se ao período de avaliação (45 dias após a emergência das plantas), visto que os sintomas evoluem conforme o patógeno avança no processo de infecção por meio da colonização do tecido do hospedeiro, atingindo maior severidade no final do ciclo, resultados com baixa severidade também foram obtidos por Souza *et al.* (2022), ao realizar testes de metodologias de inoculação com o patógeno *M. phaseolina* em feijão caupi. Apesar disso foi possível verificar a alta capacidade dos isolados testados como BCA's de *Macrophomina*, uma vez que utilizados no biocontrole de *M. phaseolina* reduziram de 53 a 100% os sintomas, enquanto para *M. pseudophaseolina* reduziram de 87,8 a 100% e os sintomas de *M. euphorbiicola* foram reduzidos entre 92 a 100%.

A alta porcentagem de inibição dos sintomas nas raízes de milho, principalmente quando tratadas com os isolados de *T. erinaceum*, pode ser explicada pela produção do Alkeno (Z)-5-amino-5-(1,1,2-trihydroxybuta-1,3-dienyloxy)pentane-6,7,8,9-tetraol, relatado por Siebatcheu *et al.* (2023), entretanto é necessário realizar a extração e verificar a presença deste Alkeno nos metabólitos dos isolados utilizados neste estudo e posteriormente testar o Alkeno isolado no controle dos patógenos.

O potencial destes isolados no biocontrole está embasado na capacidade de competir por espaço e nutrientes, uma vez que, ao estar próximo da semente, a qual foi semeada em um solo infestado com o patógeno, irá competir por espaço no solo, possivelmente chegando na semente e então iniciando a interação a qual irá promover o desenvolvimento da planta e a ativação dos mecanismos de defesa. Quando iniciar a interação com o fitopatógeno serão liberados compostos orgânicos voláteis e não voláteis, os quais apresentam atividade antimicrobiana, dificultando assim a realização da infecção pelo patógeno.

Com base nisso, nosso estudo demonstra o potencial de utilização de *Trichoderma erinaceum* e *Trichoderma asperelloides* no biocontrole de *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola* em plantas de milho.

5. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. Method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 8, p. 265-267, 1925.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa. 2. ed. UFV. 516 p. 2016.

ASRAN-AMAL, A. *et al.* In vitro antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 153-157, 2010.

BEDENDO, I. P.; MASSOLA JUNIOR, N. S.; AMORIM, L. Controle cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 367-388, 2011.

BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 367-388.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1990.

CASELA CR *et al.* **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Circular técnica).

COSTA, R. V. *et al.* **Macrophomina phaseolina em Milho Safrinha: Levantamento da Incidência e Perdas na Produtividade no Estado do Tocantins**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2019. 19 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 202).

HARMAN, G. E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, p. 4-10, 2003.

KHALEDI, N.; TAHERI, P. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Plant Protection Research**, Vol. 56, n. 1, p. 21-31, 2016.

KHAN, M. R. *et al.* Management of root-rot disease complex of mungbean caused by *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* through soil application of *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 119, p. 24-29, 2019.

LIMA, W. N. **DANINHAS FRENTE A LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS**. 2019. 39 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Rio Grande do Norte, Mossoró, 2019.

MEYER, M. C. *et al.* **Trichoderma: interações e estratégias**. 1º ed. Brasília: EMBRAPA SOJA, 2019.

MICHEREFF, S. J. *et al.* Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E.G.T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo**

de patógenos radiculares em solos tropicais, Recife: Editora da Universidade Federal Rural de Pernambuco 2005, p. 1-18

MIRANDA, R. F. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DO *Colletotrichum gloeosporioides*, CAUSADOR DA ANTRACNOSE NO MAMOEIRO. 2020. 64 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2020.

NEVES, M. F. *et al.* Etanol de milho: Cenário atual e perspectivas para a cadeia no Brasil. 1º ed. Ribeirão Preto, São Paulo, UNEM, 2021.

OLIVEIRA, L. G. *et al.* POTENCIAL DE BIOCONTROLE *Trichoderma* spp. CONTRA *Macrophomina phaseolina* DE FEIJÃO-CAUPI. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 26, n. 2, 2021.

PINHO, D. B. *et al.* An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. **Mycotaxon**, v. 122, n. 1, p. 333-345, 2013.

RIBEIRO, Noel Alves *et al.* Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1003-1009, 2005

RODRIGUES, J. *et al.* ***Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum* feijoeiro**. 2010. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2010.

SALES JUNIOR, R. *et al.* Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, p. 195-198, 2012. DOI: 10.1590/S1806-66902012000100024. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rca/a/gSyrVLyMmVvyKPVLDWtcZ3x/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 30/03/2023.

SALES JUNIOR, R. *et al.* Pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in Cowpea. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 33, p. 395-401, 2020. DOI: 10.1590/1983-21252020v33n212rc. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcaat/a/NbsffLTmZnnLWX9Zzxx9rxc/abstract/?lang=en>. Acesso em: 30/03/2023.

SAMUELS, Gary J. *et al.* *Trichoderma*: identification and agricultural applications. APS Press, 2015.

SANTOS, K. M. *et al.* Novel specific primers for rapid identification of *Macrophomina* species. **European journal of plant pathology**, v. 156, n. 4, p. 1213-1218, 2020.

SIEBATCHEU, E. C. *et al.* Secondary metabolites from an endophytic fungus *Trichoderma erinaceum* with antimicrobial activity towards *Pythium ultimum*. **Natural Product Research**, v. 37, n. 4, p. 657-662, 2023.

SILVEIRA, D. C. *et al.* Caracterização agromorfológica de variedades de milho crioulo (*Zea mays* L.) na região noroeste do Rio Grande do Sul. **Rev. Ciência e Tecnologia**, Rio Grande do Sul, v. 1, p. 01-11, n. 1, 2015.

SOUSA, C. W. A. *et al.* Resistência de híbridos e aplicações de fungicida para o controle da podridão de carvão do milho. **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 52. ed., Brasília, DF Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2021.

SOUZA, E. M. DA S. *et al.* Inoculation methods and aggressiveness of *Macrophomina phaseolina* isolates in cowpea. **Ciência Rural**, v. 52, n. 6, p. e20210072, 2022.

SRIDHARAN, A. P. *et al.* Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. **Microbiological research**, v. 236, p. 126436, 2020.

SRIDHARAN, A. P. *et al.* Metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 inhibits soil borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* by triggering amino sugar metabolism. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 104714, 2021.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

1. CONCLUSÕES GERAIS

- Os isolados de *T. erinaceum* CFS1017 e CFS1018 junto com o isolado de *T. asperelloides* CFSB168 apresentam potencial de biocontrole a três espécies de *Macrophomina* patogênicas ao milho.
- *T. erinaceum* (CFS1017 e CFS1018) produz COV's com potencial antimicrobiano para *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*.
- *T. asperelloides* (CFSB168) apresenta CONV's com potencial antimicrobiano a *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*.