



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle
de mofo-branco e promoção de crescimento em alface**

LINCON RAFAEL DA SILVA

Brasília – DF

2020

LINCON RAFAEL DA SILVA

**Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle
de mofo-branco e promoção de crescimento em alface**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia

Orientadora

Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello

Brasília - Distrito Federal - Brasil

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, L. R.

Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle de mofo-branco e promoção de crescimento em alface / Lincon Rafael da Silva

Brasília, 2020.

155p.

Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Universidade de Brasília, Brasília, DF.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma*, Compostos Orgânicos Voláteis.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle de mofo branco e promoção de crescimento em alface

A todos os brasileiros, principalmente aos mais pobres e honestos, que financiaram por meio dos seus impostos, os meus estudos e, infelizmente, não puderam fazer o mesmo por seus descendentes.

Dedico

Agradecimentos

À Jesus Cristo, meu fiel companheiro, pela vida, saúde e todas as conquistas alcançadas até hoje.

À Universidade de Brasília, juntamente com o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela feliz oportunidade de me tornar um Agrônomo Doutor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por todo o suporte financeiro e instalações para a execução deste trabalho, e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello, pela imensa dedicação, paciência, companheirismo e conhecimentos passados.

Aos colaboradores Dra. Marília de Castro Rodrigues Pappas, Dra. Maria Cléria Valadares-Inglis, Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes e Dr. Daniel Nogoceke Sifuentes pela dedicação para que todas as etapas deste trabalho fossem concluídas.

Aos professores doutores: Luís Eduardo Bassay Blum, Cleber Furlanetto, Adalberto Côrrea Café Filho, Danilo Batista Pinho, Juvenil Enrique Cares, Carlos Hidemi Uesugi, Renato de Oliveira Resende, Alice Kazuko Inoue Nagata, Robert Miller, Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, José Carmine Dianese por todos conhecimentos passados.

Às minhas tias, Fátima e Ducha, pelo amor, carinho e companheirismo desde o falecimento da minha mãe.

Ao meu pai José Vieira “Zé Beth” e meus irmãos Wender, Renato, Getúlio e Renan, pelo incentivo e compreensão durante os meus estudos e aos demais familiares.

Aos companheiros do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Sobretudo, a amizade de Irene Martins, João Batista e Eustáquio, pelos conselhos nos momentos difíceis e diversão diária. A todos estudantes que fizeram parte do laboratório durante essa trajetória. Esse laboratório foi a minha segunda casa.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia da UnB, por fazerem da minha estadia em Brasília mais alegre. Em especial ao Ramon, Caio, Luciane, Polly e Jefferson.

Às pessoas especiais que estiveram mais próximas em diferentes momentos dessa caminhada: Gustavo, Érica, Sofya, Carlão, Bruna, Paulo Henrique e Ana Beatriz.

Aos meus eternos amigos e companheiros de todas as horas, “Os Guerreirinhos”.

Muito Obrigado!!!

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello**. Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle de mofo-branco e promoção de crescimento em alface

LINCON RAFAEL DA SILVA

TESE APROVADA em 25/09/2020 por:

Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum

Universidade de Brasília
(Examinador Interno)

Dr. Fernando Campos de Assis Fonseca

Universidade Paulista
(Examinador Externo)

Dr. Luciano Paulino da Silva

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Examinador Externo)

Dr. Danilo Batista Pinho

Universidade de Brasília
(Examinador Suplente)

Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Orientadora Presidente)

Sumário

Lista de Tabelas	iv
Lista de Figuras	v
Resumo Geral	viii
General Abstract	ix
Introdução Geral	1
Revisão de literatura, justificativa e objetivos	4
Aspectos gerais do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	4
Mofa-branco da alface	7
Controle biológico de fitopatógenos	9
Aspectos gerais de <i>Trichoderma</i> spp. e seu potencial como agente de biocontrole	11
Compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas.....	15
RNA-Seq no controle de fitopatógenos	18
Espectrometria de massa no controle de fitopatógenos	20
Justificativa	24
Objetivo geral	25
Objetivos específicos	25
Referências.....	26
Capítulo 1. Alterações morfológicas e proteicas em <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> após exposição aos compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp.	37
Resumo	37
Introdução	37
Material e Métodos	39
Origem e manutenção das linhagens.....	39
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp.....	40
Largura de hifas de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp.	40
Análise comparativa do perfil proteico de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 por MALDI-TOF <i>Biotyper</i>	41
Coleta dos COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	41
Análises químicas dos COVs coletados	42
Análises estatísticas.....	42
Resultados	43
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp.....	43
Largura de hifas de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp.	44
Análise comparativa do perfil proteico de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 por MALDI-TOF	45
Análises químicas dos COVs coletados	47
Discussão	48
Conclusão.....	51
Agradecimentos	51
Capítulo 2. Inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por compostos orgânicos voláteis emitidos por <i>Trichoderma</i> spp. em fases distintas de desenvolvimento	56
Resumo	56

Introdução	56
Material e Métodos	58
Origem e manutenção das linhagens	58
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp. em fase de crescimento micelial (CM)	58
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp. em fase de esporulação (ES)	59
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp. em pareamento com o patógeno (PP)	59
Quantificação dos esporos produzidos pelas linhagens de <i>Trichoderma</i> em fase ES	60
Análises estatísticas	60
Resultados	60
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp. em fase de crescimento micelial (CM)	60
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp. em fase de esporulação (ES)	61
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos COVs de <i>Trichoderma</i> spp. em pareamento com o patógeno (PP)	63
Discussão	66
Conclusão	69
Agradecimentos	69
Referências	69
Capítulo 3. Respostas transcricionais de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> exposto aos compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma azevedoi</i>	74
Resumo	74
Introdução	74
Material e Métodos	77
Origem e manutenção das linhagens	77
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	78
Extração de RNA de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	78
RNA-Seq	79
Inibição da germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 por COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	79
Análises de dados	80
Resultados	81
Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	81
Extração de RNA	82
RNA-Seq	82
Inibição da germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 por COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	87
Discussão	88
Conclusão	98
Agradecimentos	99
Referências	99

Capítulo 4. Compostos orgânicos voláteis emitidos por <i>Trichoderma azevedoi</i> promovem o crescimento de plantas de alface e retardam os sintomas de mofo-branco	110
Resumo	110
Introdução	110
Material e Métodos	112
Origem e manutenção das linhagens	112
Coleta dos COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	112
Análises químicas dos COVs coletados	113
Promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em meio Murashige & Skoog, mediada por COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	114
Experimento de captura de CO ₂	115
Promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em solo, mediada por COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	115
Inibição da germinação miceliogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 por COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241 em fase de crescimento micelial	116
Inibição da germinação miceliogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 por COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241 em fase de esporulação	117
Avaliação da severidade de mofo-branco em plantas de alface inoculadas com micélio de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 exposto por três vezes aos COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	117
Análises estatísticas	118
Resultados	119
Análises químicas dos COVs coletados	119
Promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em meio Murashige & Skoog, mediada por COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	121
Experimento de captura de CO ₂	122
Promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em solo mediada por COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	122
Inibição da germinação miceliogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 por COVs de <i>T. azevedoi</i> CEN1241 em fase de crescimento micelial	125
Inibição da germinação miceliogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 mediada por compostos orgânicos voláteis de <i>T. azevedoi</i> CEN1241 em fase de esporulação	125
Avaliação da severidade de mofo-branco em plantas de alface inoculadas com <i>S. sclerotiorum</i> CEN1147 exposto por três vezes aos compostos orgânicos voláteis de <i>T. azevedoi</i> CEN1241	125
Discussão	128
Conclusão	132
Agradecimentos	133
Referências	133
Conclusões Gerais	139
Anexos	140

Lista de Tabelas

Capítulo 1. Alterações morfológicas e proteicas em *Sclerotinia sclerotiorum* após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp.

- Tabela 1.** Linhagens utilizadas nos experimentos. 39
- Tabela 2.** Ação dos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial e largura de hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147. 43
- Tabela 3.** Valores de massas proteicas diferenciais de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma koningiopsis* CEN1386 e *Trichoderma azevedoi* CEN1241, identificadas por MALDI-TOF/MS. 46

Capítulo 2. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma* spp. em fases distintas de desenvolvimento

- Tabela 1.** Valores médios de área abaixo do crescimento micelial (AACCM) de *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto aos COVs emitidos por *Trichoderma* spp. em diferentes fases de desenvolvimento: crescimento micelial (CM), esporulação (ES), pareado com o patógeno (PP) e esporulação das linhagens de *Trichoderma*. 66

Capítulo 3. Respostas transcricionais de *Sclerotinia sclerotiorum* exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi*

- Tabela 1.** Números de leituras curtas de sequenciamento geradas no experimento de RNA-Seq e mapeadas contra o genoma de referência de *S. sclerotiorum* usando o programa STAR. Contagens por amostra do número total de leituras usadas no mapeamento e mapeadas uma única vez. 83
- Tabela 2.** Transcritos DE selecionados pela potencial função biológica relacionada ao processo de inibição por COVs de *Trichoderma azevedoi* CEN1241 descrevendo o código de cada transcrito, a anotação por similaridade de sequência, expressão relativa entre grupos tratamento e controle (logFC) e possível função biológica. 86
- Tabela 3.** Inibição da germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* CEN1147 por compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241. 88

Capítulo 4. Compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma azevedoi* promovem o crescimento de plantas de alface e retardam os sintomas de mofo-branco

- Tabela 1.** Compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma azevedoi* CEN1241 em ng/24h. 120
- Tabela 2.** Valores médios de Massa Fresta Total (MFT), Comprimento de Parte Aérea (CPA), Comprimento de Raiz (CRA) e Largura da Folha Expandida (LFE) de alface cultivada em meio Murashige & Skoog por 14 dias em atmosfera compartilhada com *Trichoderma azevedoi* CEN1241. 124
- Tabela 3.** Valores médios de Massa Fresca Total (MFT), Massa Seca Total (MST), Comprimento de Parte Aérea (CPA), Comprimento de Raiz (CRA) e Largura de Folha Expandida (LFE) de alface cultivada em solo por 21 dias em atmosfera compartilhada com *Trichoderma azevedoi* CEN1241. 124
- Tabela 4.** Inibição micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após três exposições aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241. 126
- Tabela 5.** Severidade de mofo-branco em plantas de alface após três exposições (Expos.) aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241. 128

Lista de Figuras

Revisão de literatura, justificativa e objetivos

- Figura 1.** *Sclerotinia sclerotiorum*. A: Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar sem a presença de escleródios, B: Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar com a presença de escleródios, C: Escleródios maduros de variados tamanhos e formas, D: Escleródio germinado carpogenicamente com a presença de apotécios maduros. 5
- Figura 2.** Sintomas de mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de alface. A: Início de murcha da camada mais externa da planta, B: Planta com aspecto marrom, viscoso e podre, seguido pelo desenvolvimento do micélio branco cotonoso, C: Planta morta com sintomas de necrose e murcha generalizada, D: Planta sadia. 8
- Figura 3.** *Trichoderma azevedoi* CEN1241. A: Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar, B: Hifas sem a presença de conidióforos, C: Hifas com conidióforos maduros liberando conídios, D: Conídios ovóides e globosos. 11
- Figura 4.** Descrição da técnica de MALDI-TOF: A amostra é misturada com uma matriz sobre uma placa de metal condutora. Depois da cristalização da matriz junto com a amostra, a placa metálica é introduzida no espectrômetro de massas, onde é bombardeada com breves pulsos de laser. As moléculas desorvidas e ionizadas são aceleradas por meio de um campo elétrico e entram em um tubo metálico submetido a vácuo (tubo de voo, por onde as moléculas passam) até atingirem o detector. Os íons com tamanho menor (m/z) viajam mais rapidamente pelo tubo de voo do que os de tamanho maior. Desse modo, os analitos ou substâncias das amostras, separados por TOF formam espectros de acordo com sua razão m/z (massa/carga) e com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada (analito). Para a identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados (Goulart & Resende, 2013). 21
- Capítulo 1. Alterações morfológicas e proteicas em *Sclerotinia sclerotiorum* após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp**
- Figura 1.** Diagrama do experimento de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma*.... 40
- Figura 2.** Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: *T. koningiopsis* CEN1386, B: *T. peberdyi* CEN1389, C: *T. asperelloides* CEN1397, D: *T. azevedoi* CEN1241, E: *T. longibrachiatum* CEN1399, F: *T. lentiforme* CEN1416, G: Controle. . 44
- Figura 3.** Hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: *T. koningiopsis* CEN1386, B: *T. peberdyi* CEN1389, C: *T. asperelloides* CEN1397, D: *T. azevedoi* CEN1241, E: *T. longibrachiatum* CEN1399, F: *T. lentiforme* CEN1416, G: Controle. As barras micrométricas correspondem a 50 µm. 44
- Figura 4.** Distribuição de massas detectadas por MALDI-TOF/MS de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma koningiopsis* CEN1386 e *Trichoderma azevedoi* CEN1241, por área do pico, onde o raio de cada círculo é proporcional à intensidade do sinal. 45
- Figura 5.** Quantidade total (média ± EP) das classes químicas dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma azevedoi* CEN1241 por 24 horas. As barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P≤0,05). 48

Capítulo 2. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma* spp. em fases distintas de desenvolvimento

- Figura 1.** Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em fase de crescimento micelial. A: *T. koningiopsis* CEN1386, B: *T. peberdyi* CEN1389, C: *T. asperelloides* CEN1397, D: *T. longibrachiatum* CEN1399, E: *T. azevedoi* CEN1241, F: *T. lentiforme* CEN1416..... 61
- Figura 2.** Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em fase de esporulação. A: *T. koningiopsis* CEN1386, B: *T. peberdyi* CEN1389, C: *T. asperelloides* CEN1397, D: *T. longibrachiatum* CEN1399, E: *T. azevedoi* CEN1241, F: *T. lentiforme* CEN1416..... 62
- Figura 3.** Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em fase de esporulação. A: *T. koningiopsis* CEN1386, B: *T. peberdyi* CEN1389, C: *T. asperelloides* CEN1397, D: *T. azevedoi* CEN1241, E: *T. longibrachiatum* CEN1399, F: *T. lentiforme* CEN1416, G: Controle..... 63
- Figura 4.** Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em pareamento com o patógeno. A: *T. koningiopsis* CEN1386, B: *T. peberdyi* CEN1389, C: *T. asperelloides* CEN1397, D: *T. longibrachiatum* CEN1399, E: *T. azevedoi* CEN1241, F: *T. lentiforme* CEN1416. 64
- Figura 5.** Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em pareamento com o patógeno. A: *T. koningiopsis* CEN1386, B: *T. peberdyi* CEN1389, C: *T. asperelloides* CEN1397, D: *T. azevedoi* CEN1241, E: *T. longibrachiatum* CEN1399, F: *T. lentiforme* CEN1416, G: Controle (*S. sclerotiorum* x BDA). H: Controle (*S. sclerotiorum* x *S. sclerotiorum*). 65

Capítulo 3. Respostas transcricionais de *Sclerotinia sclerotiorum* exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi*

- Figura 1.** Metodologia de inibição da germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147. A: Escleródios expostos aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241, B: Controle..... 80
- Figura 2.** Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147. A: Tratamento exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241, B: Controle..... 82
- Figura 3.** Análise de Componentes Principais dos transcritos considerados diferencialmente expressos ($\log FC \geq 2$ ou ≤ -2 e $FDR \leq 0,05$) entre os grupos controle e tratamento, segundo resultados do pacote edgeR. 84
- Figura 4.** Enriquecimento de termos GO realizado com pacote FUNC por categoria (processo biológico, componente celular e função molecular) de todos os transcritos diferencialmente expressos ($\log FC \geq 2$ ou ≤ -2 e $FDR \leq 0,05$) entre os grupos controle e tratamento, segundo o pacote edgeR. No eixo x, está representado z-score (diferença relativa ao número de leituras de sequenciamento); no eixo y, o logaritmo negativo do p-value ajustado (FDR neste caso). A área dos círculos é proporcional ao número de genes do termo GO indicado, e a cor corresponde à categoria. A linha amarela mostra o limite para a indicação dos termos GO.. 85

Figura 5. Expressão relativa de 25 transcritos DE ($\log FC \geq 2$ ou ≤ -2 e $FDR \leq 0,05$) selecionados pela potencial função biológica. O tamanho dos pontos indica os valores de \log de <i>fold change</i> e a cor dos mesmos indica a expressão relativa mais baixa (<i>down</i>) ou mais alta (<i>up</i>) no tratamento conforme legenda.	87
Figura 6. Germinação carpogênica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> CEN1147. A: Escleródios expostos aos compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma azevedoi</i> CEN1241, B: Controle.....	88
Capítulo 4. Compostos orgânicos voláteis emitidos por <i>Trichoderma azevedoi</i> promovem o crescimento de plantas de alface e retardam os sintomas de mofo-branco	
Figura 1. Metodologia de promoção de crescimento em saco de tecido voal preenchido com solo para plantas de alface em atmosfera compartilhada com <i>Trichoderma azevedoi</i> CEN1241.....	116
Figura 2. Plantas de alface em atmosfera compartilhada com <i>Trichoderma azevedoi</i> CEN1241 por 14 dias em meio Murashige e Skoog. A: Plantas controle sem KOH, B: Plantas sem KOH e expostas aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de CEN1241, C: Comparativo lado a lado de plantas não expostas e expostas aos COVs, D: Plantas controle na presença de KOH, E: Plantas na presença de KOH e expostas aos COVs, F: Comparativo lado a lado de plantas não expostas e expostas aos COVs.	121
Figura 3. Teor de clorofila e carotenoides de folhas de alface cv. “Elisa” em atmosfera compartilhada com <i>Trichoderma azevedoi</i> CEN1241 por 14 dias. A: clorofila A, B: clorofila B, C: clorofila total, D: carotenoides. As barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	122
Figura 4. Plantas de alface em atmosfera compartilhada com <i>Trichoderma azevedoi</i> CEN1241 por 21 dias em solo. A: Plantas controle, B: Plantas expostas aos compostos orgânicos voláteis de CEN1241.....	123
Figura 5. Germinação miceliogênica de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> CEN1147. A: Escleródios expostos aos compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma azevedoi</i> CEN1241 em fase de crescimento micelial, B: Controle, C: Escleródios expostos aos compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma azevedoi</i> CEN1241 em fase de esporulação, D: Controle.	125
Figura 6. Severidade de mofo-branco em plantas de alface após sete dias de inoculação com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> CEN1147. A: Inoculação com micélio da primeira geração do patógeno exposto aos COVs de <i>Trichoderma azevedoi</i> CEN1241, B: Inoculação com micélio da segunda geração do patógeno exposto aos COVs de CEN1241 C: Inoculação com micélio da terceira geração do patógeno exposto aos COVs de CEN1241, D: Controle positivo, E: Controle negativo.....	127

Resumo Geral

SILVA, Lincon Rafael. **Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle de mofo-branco e promoção de crescimento em alface.** 2020. 155p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília-DF.

Sclerotinia sclerotiorum é um patógeno capaz de infectar mais de 400 espécies de plantas e produzir estruturas de sobrevivência, os escleródios, o que dificulta o seu controle. Entre as culturas afetadas, inclui-se a alface (*Lactuca sativa* L.), cuja produção é fortemente limitada com a presença desse patógeno, pois as plantas doentes murcham e, em seguida, apodrecem, perdendo o seu valor comercial. O uso de fungos do gênero *Trichoderma* tem se mostrado uma opção de controle para o mofo-branco. Algumas espécies de *Trichoderma* são produtoras de uma diversidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) capazes de promover o crescimento de plantas e inibir fitopatógenos. Compreender a interação entre antagonista-patógeno e antagonista-planta, é essencial para o estabelecimento de agentes de controle biológico efetivos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma ampla análise da interação de *S. sclerotiorum* CEN1147 com COVs de *Trichoderma* spp., incluindo avaliação das respostas transcricionais e do perfil proteico do patógeno, além dos efeitos dos COVs na promoção de crescimento e no controle do mofo-branco em plantas de alface. Todos os ensaios basearam-se na resposta do patógeno ou das plantas a exposição aos COVs, através da metodologia de placa de Petri invertida. Para tanto, foram realizadas avaliações morfológicas e microscópicas do patógeno, análises de perfil proteico usando espectrometria de massas e expressão gênica diferencial a partir de RNA-Seq, quantificação de severidade da doença e avaliações de parâmetros agronômicos das plantas de alface. Após as avaliações iniciais, os melhores resultados foram obtidos com *T. azevedoi* CEN1241, com maior inibição micelial e efeito inibitório na produção de proteínas diferenciais presentes no tratamento controle de *S. sclerotiorum*. Após exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, aproximadamente 840 transcritos foram identificados em *S. sclerotiorum* como diferencialmente expressos entre os grupos controle e tratamento. Destacam-se 25 transcritos que foram divididos em oito categorias funcionais, relacionadas com produção de melanina, parede celular, defesa, respiração celular, transporte transmembrana, patogenicidade, incompatibilidade vegetativa e resposta ao estresse. Além disso, os COVs de *T. azevedoi* CEN1241 foram capazes de reduzir a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*. Demonstrou-se também que esses COVs promoveram o crescimento das plantas e aumentaram o teor de clorofila e carotenoides, e a partir da segunda geração de *S. sclerotiorum* exposto *in vitro* aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, os sintomas do mofo-branco foram retardados e a severidade da doença diminuída. Os resultados indicam a complexidade dos eventos que ocorrem durante o controle biológico por *Trichoderma* e reforçam o potencial de COVs emitidos por *Trichoderma* para aplicação biotecnológica no controle de *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: controle biológico, MALDI-TOF, RNA-Seq, *Sclerotinia sclerotiorum*.

General Abstract

SILVA, Lincon Rafael. **Volatile organic compounds of *Trichoderma* spp. in the control of white mold and growth promotion in lettuce.** 2020. 155p. Thesis (Doctorate degree in Phytopathology) - University of Brasília, Brasília-DF.

Sclerotinia sclerotiorum is a pathogen capable of infecting more than 400 species of plants and producing survival structures, the sclerotia, which makes it difficult to control. Among the affected crops, lettuce (*Lactuca sativa* L.), which production is strongly limited by the presence of this pathogen, as the diseased plants wither and then rot, losing their commercial value. The use of fungi of the genus *Trichoderma* has proven to be a control option for white mold. Some species of *Trichoderma* are producers of a variety of volatile organic compounds (VOCs) capable of promoting plant growth and inhibiting phytopathogens. Understanding the interaction between antagonist-pathogen and antagonist-plant is essential for the establishment of effective biological control agents. Given the above, the objective of this work was to carry out a wide analysis of the interaction of *S. sclerotiorum* CEN1147 with *Trichoderma* spp. VOCs, including evaluation of transcriptional responses and the protein profile of the pathogen, in addition to the effects of VOCs on growth promotion and the control of white mold on lettuce plants. All tests were based on the response of the pathogen or plants exposure to VOCs, using the inverted Petri dish methodology. Therefore, morphological and microscopic evaluations of the pathogen, protein profile analysis using mass spectrometry and differential gene expression using RNA-Seq, disease severity quantification and agronomic parameters evaluations of lettuce plants were performed. After the initial evaluations, the best results were obtained with *T. azevedoi* CEN1241, with the greatest mycelial inhibition and inhibitory effect on the production of differential proteins present in the control treatment of *S. sclerotiorum*. After exposure to *T. azevedoi* CEN1241 VOCs, approximately 840 transcripts were identified in *S. sclerotiorum* as differentially expressed between the control and treatment groups. Twenty-five transcripts were highlighted and divided into eight functional categories, related to melanin production, cell wall, defense, cell respiration, transmembrane transport, pathogenicity, vegetative incompatibility and stress response. In addition, *T. azevedoi* CEN1241 VOCs were able to reduce *S. sclerotiorum* carpogenic germination. It was also demonstrated that these VOCs promoted plant growth and increased chlorophyll and carotenoids content, and from the second generation of *S. sclerotiorum* exposed *in vitro* to *T. azevedoi* CEN1241 VOCs, white mold symptoms were delayed and disease severity decreased. The results indicate the complexity of the events that occur during biological control by *Trichoderma* and reinforce the potential of VOCs emitted by *Trichoderma* for biotechnological application in the control of *S. sclerotiorum*.

Keywords: biological control, MALDI-TOF, RNA-Seq, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Introdução Geral

O fungo de solo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary tem sido relatado causando a doença mundialmente conhecida como mofo-branco, em diversas culturas agrícolas (Derbyshire et al., 2017). Esse patógeno infecta folhas, flores, frutos e caules das plantas hospedeiras, induzindo doenças que podem se desenvolver durante o período vegetativo à pós-colheita (Agrios, 2005; Krause-Sakate et al., 2016). O primeiro relato desse fungo foi no ano de 1861 infectando plantas de girassol (Purdy, 1979).

Sclerotinia sclerotiorum produz estruturas de sobrevivência, as quais são um aglomerado de hifas de coloração escura, geralmente arredondadas, alongadas ou de formato irregular com tamanho aproximado de 2-20 x 2-30 mm, denominadas escleródios. Essas estruturas podem permanecer viáveis no solo por até 10 anos (Choi et al., 2017), podendo infectar mais de 400 espécies de plantas, incluindo a alface (Fernando et al., 2004; Derbyshire et al., 2017).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é cultivada o ano inteiro, porém é durante o inverno e a primavera que as condições climáticas são mais favoráveis à cultura. Temperaturas entre 16 e 25 °C e umidade relativa entre 60 a 80% são consideradas ideais para o cultivo (Maldonado et al., 2014). Nessas condições, o mofo-branco tem trazido grande preocupação aos agricultores, uma vez que as plantas doentes murcham e, em seguida, apodrecem e perdem o valor comercial. As perdas na cultura da alface podem chegar a mais de 50% da produção (Clarkson et al., 2014).

Dentre algumas medidas de controle do mofo-branco, cita-se o controle biológico. O controle biológico é a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos. Entre os diversos agentes de biocontrole existentes, fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os mais amplamente estudados, por apresentarem grande potencial para a supressão de fitopatógenos e promoção de crescimento das plantas, devido aos seus diversos mecanismos de ação (Zeng et al., 2012; Carvalho et al., 2015; Srivastava et al., 2016; Haddad et al., 2017; Wonglom et al., 2020).

Os mecanismos de ação de *Trichoderma* envolvem a competição por espaço e nutrientes, o hiperparasitismo que envolve a produção de enzimas líticas, indução de resistência, promoção de crescimento de plantas e antibiose, por meio da produção de compostos não voláteis e compostos orgânicos voláteis (COVs) (Machado et al., 2012; Kottb et al., 2015; Chen et al., 2016; González & Fuentes, 2017). De acordo com Bae et al. (2016) e Nieto-Jacobo et al. (2017), os COVs além de estarem relacionados com o

controle de doenças de plantas, também são considerados promotores de crescimento dos vegetais.

O potencial de *Trichoderma* tem sido melhor comprovado pela presença física do fungo, tanto na interação antagonista-patógeno ou antagonista-planta. Porém, os COVs possuem características importantes que também justificam o uso de *Trichoderma* na agricultura. Na interação entre antagonista-patógeno, compreender molecularmente as diferenças no perfil dos transcritos e as modificações proteicas no patógeno, pode contribuir para o estabelecimento de agentes de biocontrole mais efetivos e específicos, além de informações do comportamento molecular do patógeno quando exposto ao antagonista.

Pesquisas abordando as alterações em nível molecular da interação *S. sclerotiorum* x *Trichoderma* têm sido restritas a compreender o comportamento do agente de biocontrole ou da planta presente na condição experimental (Steindorff et al., 2014; Shaw et al., 2016). Até o presente, apenas um estudo molecular da interação COVs de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum* foi realizado (Ojaghian et al., 2019). Novos conhecimentos dessas interações poderão contribuir para melhor compreensão do potencial dos COVs de *Trichoderma* spp. no controle de doenças de plantas.

O desenvolvimento de novos métodos de sequenciamento de DNA de alto desempenho (Sequenciamento de Nova Geração), proporcionou um avanço metodológico nas pesquisas de controle biológico de doenças de plantas, permitindo a amostragem de perfis completos de expressão de RNA de organismos, denominado RNA-Seq (Hall, 2007; Wang et al., 2009; Amselem et al., 2011). A espectrometria de massa (*Mass Spectrometry* - MS) é outra ferramenta que têm contribuído para novas descobertas do perfil proteico de microrganismos fitopatogênicos (Liu et al., 2015; Li et al., 2018).

Na técnica de MS, diferentes abordagens baseadas em vários sistemas de ionização, análise e detecção têm sido desenvolvidas. Um dos métodos mais utilizados é a ionização por dessorção a laser assistida por matriz, MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, TOF (*Time Of Flight*), que permite determinar a massa da amostra baseando-se na velocidade de migração dos íons (Chalupová et al., 2013). Analisar a diversidade e modificações quantitativas dessas proteínas em diferentes condições experimentais pode

gerar informações úteis para alcançar métodos mais eficientes no controle das doenças de plantas (Billon-Grand et al., 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação de *S. sclerotiorum* CEN1147 com compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. e os efeitos destes na promoção de crescimento e no controle do mofo-branco em plantas de alface.

Revisão de literatura, justificativa e objetivos

Aspectos gerais do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary (1884), pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Leotiomycetes, Ordem Helotiales, Família Sclerotinaceae e ao Gênero *Sclerotinia* (Mycobank, 2020a), foi relatado pela primeira vez em 1861, infectando plantas de girassol (Purdy, 1979). Esse fungo pode infectar mais de 400 espécies de plantas e várias delas são de grande interesse econômico, incluindo alface, alfafa, algodão, batata, canola, cenoura, ervilha, feijão, girassol, lentilha, morango, mostarda, soja, tomate, entre outras (Fernando et al., 2004; Derbyshire et al., 2017).

A doença causada por *S. sclerotiorum* é conhecida como mofo-branco, podridão-de-esclerotinia ou murcha-de-esclerotinia. Esse patógeno infecta folhas, flores, frutos e caules das plantas hospedeiras, induzindo a doença que pode se desenvolver durante o período vegetativo à pós-colheita. As epidemias são desencadeadas por temperaturas amenas entre 10 e 20 °C, alta umidade e molhamento foliar. Nessas condições, a doença pode afetar culturas em regiões de clima temperado, subtropicais ou ainda em regiões tropicais com altitude elevada, desde a fase inicial de desenvolvimento da planta (Agrios, 2005; Krause-Sakate et al., 2016).

Em regiões de clima mais seco, a ocorrência do mofo-branco, antes considerada esporádica, vem causando epidemias, principalmente devido aos seguintes fatores: expansão agrícola; uso de sementes infectadas e/ou infestadas; emprego de irrigação, que oferece a umidade necessária ao desenvolvimento da doença; monocultivo e sucessão de culturas com espécies suscetíveis.

Na fase assexuada, é comum que *S. sclerotiorum* produza estruturas de sobrevivência, as quais são constituídas por um aglomerado de hifas. Tais estruturas, denominadas escleródios, possuem forma geralmente arredondada, alongada ou irregular e tamanho aproximado de 2-20 x 2-30 mm (Figura 1), formados por três camadas: casca, córtex e medula, cada uma composta por uma espessa camada de hifas. A parte interna constitui-se de carboidratos e proteínas, enquanto a casca é composta por células cujas paredes contêm melanina (Le Torneau, 1979; Arseniuk & Macewicz, 1994; Butler et al., 2009).

A melanina é um pigmento de cor escura que confere proteção ao fungo contra condições ambientais adversas, como radiação solar, altas temperaturas, metais tóxicos,

enzimas líticas e microrganismos antagônicos. Dessa forma, o fungo permanece viável no solo por até 10 anos (Krause-Sakate et al., 2016, Choi et al., 2017).

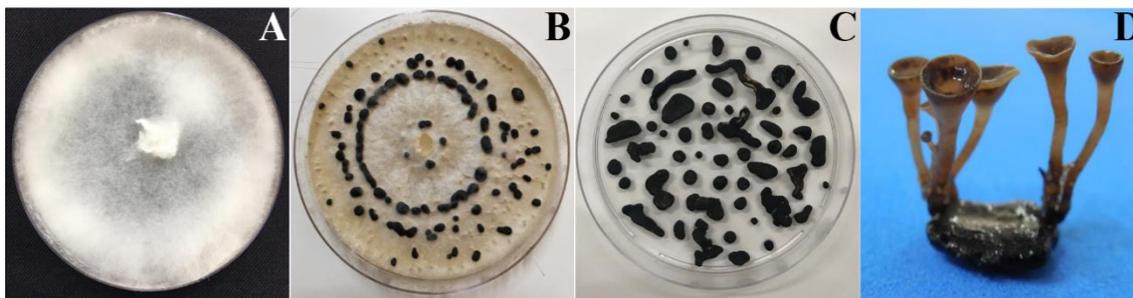


Figura 1. *Sclerotinia sclerotiorum*. **A:** Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar sem a presença de escleródios, **B:** Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar com a presença de escleródios, **C:** Escleródios maduros de variados tamanhos e formas, **D:** Escleródio germinado carpogenicamente com a presença de apotécios maduros.

A temperatura ótima para a formação das estruturas de sobrevivência está em torno de 8 e 16 °C (Dillard et al., 1995). A germinação dos escleródios presentes no solo é responsável pelo aumento da severidade da doença no campo, ano após ano.

Os escleródios de *S. sclerotiorum* podem germinar de duas maneiras: germinação miceliogênica e carpogênica (Le Torneau, 1979). Na germinação miceliogênica, há formação de um novo micélio que irá infectar o hospedeiro, enquanto na germinação carpogênica, inicia-se o ciclo sexual do patógeno, com a formação de um corpo de frutificação denominado apotécio. Este possui forma achatada, medindo aproximadamente 10 mm de diâmetro, semelhante a uma taça (Figura 1), onde são gerados os ascósporos elipsoides e hialinos, com dimensões de 4-6 x 9-14 µm (Wendland et al., 2016). Os fatores mais importantes para germinação carpogênica são temperatura e umidade. As condições de temperatura favoráveis variam entre 10 e 20 °C. Os escleródios podem permanecer viáveis no solo devido ao sombreamento e à presença de matéria orgânica, condições estas que modificam a temperatura na camada superficial do solo (2-3 cm). Nessa parte do solo, os escleródios viáveis dão origem aos apotécios, em média 1-10 apotécios/escleródio, os quais podem permanecer liberando ascósporos por 14 dias em condições de baixa temperatura e alta umidade (Zeng et al., 2012).

Segundo Wu et al. (2007) e Töfoli (2014) a germinação carpogênica ocasiona maior quantidade de doença no campo, onde em média, 1-20 apotécios são capazes de gerar até 2.000.000 de ascósporos que, disseminados no ambiente, aumentam os danos às culturas. A disseminação de *S. sclerotiorum* pode ocorrer por ejeção dos ascósporos na área de cultivo, por escleródios misturados às sementes durante o plantio, pelo uso de mudas e implementos agrícolas contaminados com o fungo, tanto em forma de

escleródios como de micélio (Adams & Ayers, 1979; Botelho et al., 2013; Krause-Sakate et al., 2016).

O progresso da doença está diretamente relacionado ao genótipo da planta, ao espaçamento de plantio, ao tipo de solo e até mesmo a quantidade de água no solo, sendo esta de maior importância na formação de apotécios a partir dos escleródios (Coley-Smith & Cooke, 1971). O longo período de sobrevivência dos escleródios no solo é o fator que mais dificulta o controle de *S. sclerotiorum*, pois é praticamente impossível eliminar o patógeno uma vez estabelecido em determinada área (Zeng et al., 2012; Cardoso et al., 2015).

Práticas de manejo das culturas visando à redução do inóculo, tais como uso racional da irrigação e densidades de plantio adequadas, de modo a evitar a formação de microclimas favoráveis ao patógeno, são fundamentais para o controle da doença. Entre as medidas de controle recomendadas, citam-se, ainda, rotação de culturas com espécies não hospedeiras, uso do sistema de plantio direto, bem como aplicação de produtos biológicos e fungicidas sintéticos para tratamento de sementes e pulverizações de parte aérea (Peltier et al., 2012). Além dessas medidas, podem-se utilizar genótipos de plantas com resistência parcial (Grau et al., 1982; Cardoso et al., 2015; Derbyshire & Denton-Giles, 2016; Meyer et al., 2016; Spitzer et al., 2017).

Atualmente existem vários fungicidas sintéticos registrados para o controle do mofo-branco, com diferentes ingredientes ativos, como tiofanato metílico, procimidona, fluazinam, fluopyram, dimoxistrobina + boscalida, carbendazim, iprodiona, isofetamida, carboxanilida + dimetilditiocarbamato, cloreto de benzalcônio, ciprodinil, dentre outros (Derbyshire & Denton-Giles, 2016; Meyer et al., 2017; Adapar, 2020).

O uso de fungicidas sintéticos é influenciado pela necessidade de resultado rápido para impedir o avanço da doença no campo, bem como pela facilidade de aplicação, quando comparado com outros métodos de controle. Entretanto, tal prática tem levado à seleção de isolados resistentes do patógeno, resultando em uma redução da eficiência deste método de controle (Mao et al., 2018). Alternativamente, o controle biológico vem assumindo papel importante no controle de doenças, especialmente as causadas por patógenos de solo que produzem estruturas de sobrevivência, incluindo *S. sclerotiorum* (O'Brien, 2017; Fatouros et al., 2018).

Dentre as inúmeras culturas afetadas por *S. sclerotiorum* está a cultura da alface. A suscetibilidade da alface ao mofo-branco, o fato de ser consumida *in natura* e as folhas serem uma das principais partes infectadas, torna-se ainda mais importante o uso

de produtos biológicos no controle deste patógeno, de forma a reduzir o número de aplicações de fungicidas sintéticos na cultura. Visto que estes quando usados repetidas vezes, deixam resíduos nas plantas e no solo.

Mofobranco da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea, da família das Asteraceas, cultivada mundialmente. Essa hortaliça folhosa possui diversas qualidades nutricionais importantes para o consumo humano, como vitaminas e sais minerais (Armas et al., 2017). De acordo com o Anuário Brasileiro de Horti & Fruti (2019), o Brasil produziu em 2018, aproximadamente 575.529 toneladas de alface em uma área de 86.856 hectares, distribuídas em aproximadamente 670.000 agricultores. Os maiores polos da cultura, são Ibiúna e Mogi das Cruzes em São Paulo, seguidos de Teresópolis, no Rio de Janeiro, Mário Campos e Caeté, em Minas Gerais.

A alface é a folhosa mais consumida no Brasil e pode ser cultivada o ano inteiro principalmente em estufas como uma monocultura com até cinco colheitas por ano, porém, é durante o inverno e a primavera que as condições climáticas são mais favoráveis à cultura. Temperaturas entre 16 e 25 °C e umidade relativa entre 60 a 80% são consideradas ideais para o cultivo (Maldonado et al., 2014). Nessas condições, a planta pode ser afetada por diversos fitopatógenos limitantes à produção comercial, a exemplo de *Botrytis cinerea*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* e *S. sclerotiorum* (Van Beneden et al. 2009; Tófoli et al., 2014; Vàsquez et al., 2017).

Entre essas doenças, o mofobranco, causado pelo fungo *S. sclerotiorum*, tem trazido grande preocupação aos agricultores, uma vez que as plantas doentes murcham e, em seguida, apodrecem. O fungo possui alta capacidade de produzir enzimas líticas como pectinases, celulasas, hemicelulasas, xilanases, proteases e glicosidades, que facilitam a degradação da parede celular e a colonização interna do hospedeiro (Choi et al., 2017; Seifbarghi et al., 2017; Ranjan et al., 2018).

As perdas na cultura da alface podem chegar a mais de 50% da produção, principalmente em viveiros de mudas, onde ocasionam o *damping off* ou tombamento de plântulas (Clarkson et al., 2014). De modo geral, a infecção por *S. sclerotiorum* também pode viabilizar a ocorrência de bactérias e fungos oportunistas e acelerar o processo de morte das plantas.

O sintoma inicial do mofo-branco na alface é a murcha da camada mais externa das folhas, geralmente observada à medida que a cultura se aproxima da maturidade (Figura 2). Antes das folhas murcharem, surge no caule uma área encharcada, consequência do crescimento do patógeno. Quando a infecção ocorre por ascósporos, o fungo cresce a partir das folhas em direção às raízes. À medida que a folha é colonizada pelo fungo, sua base apodrece, fazendo com que as folhas caiam e suas pontas toquem o solo ou apoiem-se nas folhas abaixo. As folhas internas geralmente permanecem úmidas o suficiente para que o fungo as invada completamente, reduzindo-as a uma massa viscosa. Com o progresso da doença, a coroa (cabeça da alface) desenvolverá um aspecto marrom-esverdeado e encharcado, seguido pelo desenvolvimento de um micélio branco cotonoso com a presença ou não de escleródios. Os escleródios quando presentes são brancos durante o seu aparecimento e pretos em estádios avançados da doença (Krause-Sakate et al., 2016).

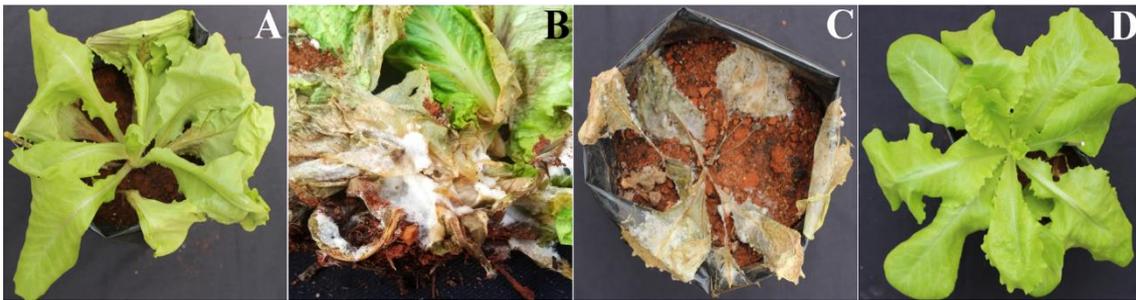


Figura 2. Sintomas de mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de alface. **A:** Início de murcha da camada mais externa da planta, **B:** Planta com aspecto marrom, viscoso e podre, seguido pelo desenvolvimento do micélio branco cotonoso, **C:** Planta morta com sintomas de necrose e murcha generalizada, **D:** Planta sadia.

Dentre algumas medidas de controle do mofo-branco mais específicas para a cultura da alface, podem ser destacadas: plantio em solos leves e drenados, evitando-se as baixadas e áreas sujeitas ao acúmulo de umidade; aração profunda, com o objetivo de enterrar os escleródios presentes no solo; adoção de canteiros elevados; plantio de mudas e/ou sementes saudáveis e certificadas; adoção de espaçamento adequado ao tipo de alface cultivada, de forma a permitir a circulação de ar entre as plantas e a redução dos níveis de umidade; adubação equilibrada, lembrando que o excesso de nitrogênio torna os tecidos mais tenros e a folhagem mais densa, condições que favorecem o desenvolvimento da doença; uso de cultivares mais eretas, uma vez que estas não possibilitam o acúmulo de umidade entre as plantas, em comparação às cultivares “repolhudas”; realização da rotação de cultura com espécies não suscetíveis; eliminação

de plantas voluntárias suscetíveis (plantas daninhas); redução das regas em períodos críticos e favoráveis à doença; adoção de um esquema de irrigação de forma que as plantas possam estar mais secas no final do dia; eliminação de restos culturais; limpeza e desinfestação dos implementos agrícolas; limpeza e higienização de sistemas hidropônicos com solução à base de cloro (Töfoli et al., 2014; Krause-Sakate et al., 2016).

No sistema de manejo integrado para controle do mofo-branco também podem ser utilizados fungicidas sintéticos, cujas aplicações devem ser iniciadas sete dias após o transplante, repetindo-se a cada 10 dias (máximo de três aplicações/ciclo). Entretanto, apenas os fungicidas iprodiona e procimidona, pertencentes à classe das dicarboxamidas, possuem registro para o controle do mofo-branco na cultura da alface no Brasil (Adapar, 2020). Além disso, a crescente preocupação sobre os efeitos negativos dos defensivos agrícolas no ambiente, dos seus resíduos nos alimentos, dos riscos para a saúde humana durante a aplicação e, em algumas situações, o uso inadequado destes produtos, vem aumentando o interesse pelo controle biológico como alternativa ao controle químico do mofo-branco em alface, sobretudo com o uso de fungos do gênero *Trichoderma*. Com o uso desse antagonista há relatos de redução da incidência dessa doença em 50% em casa de vegetação (Chitrampalam, 2008).

Controle biológico de fitopatógenos

Um dos fatores limitantes para o aumento da produtividade das culturas agrícolas é a ocorrência de doenças, principalmente de causa fúngica. Os prejuízos decorrentes de ataques de fitopatógenos em média ficam em torno de 25% na produção global dos alimentos (Lugtenberg et al., 2015) e, em certos casos, resultam na perda total da cultura, gerando graves implicações financeiras em nível local, regional ou nacional e na pior das hipóteses, levar à fome e conseqüentemente perda de vidas (O'Brien, 2017). Essas implicações têm favorecido o aumento de pesquisas na busca de novos métodos de controle de doenças de plantas, a exemplo o controle biológico (Srivastava et al., 2016).

O controle biológico consiste na supressão da doença pela aplicação de um agente de biocontrole, geralmente um fungo, bactéria, levedura, vírus, ou a mistura desses na planta e/ou no solo, para prevenir a infecção pelo patógeno ou o estabelecimento do mesmo na hospedeira. Sanford (1926) sugeriu o controle da sarna da batata (*Streptomyces scabies*) por adubação verde e propôs dois conceitos para controle biológico de doenças: a) microrganismos saprofíticos podem controlar a atividade de agentes patogênicos nas plantas e b) o equilíbrio microbiano do solo pode ser mudado com alteração das condições

do solo. Sanford & Broadfoot (1931) demonstraram que a infecção de plantas de trigo por *Ophiobolus graminis* em solo esterilizado poderia ser completamente suprimida por ação antagonista de várias espécies de fungos e bactérias individualmente coinoculadas. Entre os anos de 1932 e 1934, Weindling relatou o parasitismo exercido por *Trichoderma* spp. contra fungos de solo, introduzindo a técnica de pareamento de culturas e iniciou, junto com colaboradores, uma série de experimentos sobre o controle de *R. solani* e outros patógenos usando *T. lignorum*.

Segundo Cook & Baker (1983), o controle biológico de doenças de plantas envolve a redução da densidade do inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, pelo uso de um ou mais organismos, realizado naturalmente ou por meio da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista ou, ainda, pela introdução em massa de um ou mais organismos antagonistas. Um conceito menos abrangente se refere ao uso proposital de organismos introduzidos ou residentes (excluindo o uso de plantas resistentes), para suprimir as atividades e/ou a população de um ou mais patógenos de plantas (Pal & Gardener, 2006).

Diversos estudos apontam para a eficiência do controle biológico de doenças de plantas. Mukherjee et al. (1995) mostraram que *Glodadium virens* foi capaz de colonizar, penetrar e esporular no interior dos escleródios de *S. rolfsii*. Casals et al. (2010) concluíram que a combinação de água quente, *Bacillus subtilis* e bicarbonato de sódio podem controlar a podridão parda de pós-colheita em pêssegos e nectarinas. Abraham et al. (2013) conseguiram reduzir as lesões de *Phytophthora meadii* em *Hevea brasiliensis* usando como agente de biocontrole a bactéria *Alcaligenes* sp. Chen et al. (2016) mostraram eficiência de *T. gamsii* no controle de diversos patógenos de solo da planta *Panax notoginseng*.

O agente de controle biológico eficiente deve reunir as seguintes características: ser geneticamente estável e efetivo em baixas concentrações, possuir amplo espectro de ação, passível de produção em larga escala, de fácil aplicação e manuseio, e não produzir substâncias tóxicas às plantas (Sharma et al., 2009). Um dos maiores problemas enfrentados com o biocontrole é a falta de consistência na supressão da doença em nível de campo, devido às diferenças no genótipo dos organismos alvo e também às condições ambientais que podem ser divergentes em relação ao local onde o agente de biocontrole foi isolado e onde é utilizado (O'Brien, 2017).

Entre os diversos agentes de biocontrole existentes, fungos do gênero *Trichoderma* têm sido amplamente estudados pelo fato de apresentarem grande potencial

para o controle de fitopatógenos e promoção de crescimento das plantas, devido aos seus diversos mecanismos de ação (Zeng et al., 2012; Srivastava et al., 2016; Haddad et al., 2017; Wonglom et al., 2020).

Aspectos gerais de *Trichoderma* spp. e seu potencial como agente de biocontrole

Trichoderma Persoon (1794) pertence ao Reino Fungi; Filo Ascomycota; Ordem Hypocreales; Família Hypocreaceae; Gênero: *Hypocrea* (Teleomorfo) e *Trichoderma* (Anamorfo) (Mycobank, 2020b). O gênero *Trichoderma* compreende um grande número de espécies que se reproduzem assexuadamente, presentes em solos de regiões de clima temperado e tropical e são capazes de estabelecer relações benéficas com as plantas (Machado et al., 2012; Nieto-Jacobo et al., 2017).

As espécies de *Trichoderma* são caracterizadas pelo rápido crescimento das colônias, as quais apresentam tufo ou pústulas de coloração geralmente esverdeadas, conidióforos ramificados e conídios formados nas extremidades de fiáldes (Figura 3). Os conídios são globosos ou ovóides, possuem coloração verde, verde-amarelada ou hialina, com tamanho aproximado de 2,0 x 4,0 μm (Chaverri & Samuels, 2003; Chaverri et al., 2015). Em alguns casos pode haver a formação de clamidósporos, originados pela modificação de hifas. Os clamidósporos possuem parede mais espessa e tem a função de proteger o fungo de condições ambientais adversas (Rifai, 1969; Bisset, 1984; Samuels 1996).

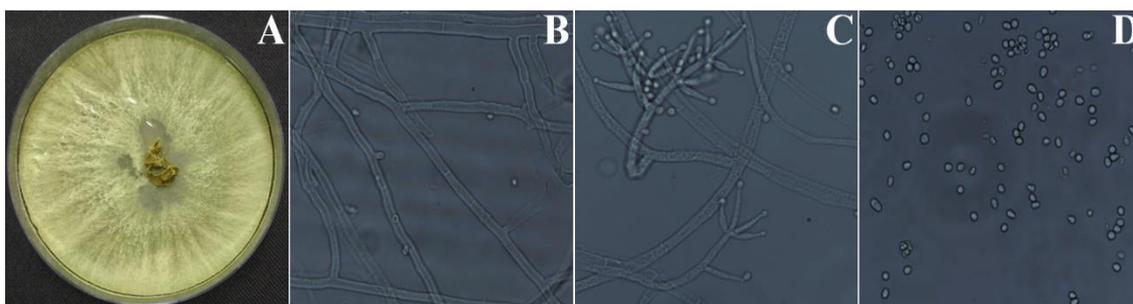


Figura 3. *Trichoderma azevedoi* CEN1241. **A:** Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar, **B:** Hifas sem a presença de conidióforos, **C:** Hifas com conidióforos maduros liberando conídios, **D:** Conídios ovóides e globosos.

Esses fungos também colonizam madeira, onde a fase sexual *Hypocrea* é frequentemente encontrada. Entretanto, muitas linhagens não possuem ciclo sexual conhecido (Harman et al., 2004a). Embora os limites filogenéticos para as fases assexuada e sexuada nem sempre se correlacionem perfeitamente em outros grupos de fungos, as espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Hypocrea* em sua maioria agrupam-se em clados

bem resolvidos, com todas as espécies compartilhando um único ancestral comum (Robbertse et al., 2017).

Embora os caracteres morfológicos continuem sendo utilizados para a identificação de *Trichoderma* spp., existem dificuldades e controvérsias na definição segura das espécies desse gênero (Robbertse et al., 2017). Atualmente os estudos de identificação desse gênero são feitos com o uso de sequenciamento de regiões genômicas, usando marcadores moleculares como o espaçador interno transcrito (ITS), fragmentos de genes que codificam para o alongamento da tradução (TEF), endoquitinase (chi18-5, previamente conhecido como ech42), subunidade II da RNA polimerase (RPB2), actina (ACT) e calmodulina (CAL1) (Hatvani et al., 2014; Inglis et al., 2020). Combinações dessas regiões têm fornecido um diagnóstico preciso da identidade das espécies e, assim, permitido contornar os problemas de identificação baseadas apenas na morfologia.

Chaverri et al. (2015) reavaliando a identidade de algumas espécies comerciais de *T. harzianum* comumente usada no controle biológico, através da combinação de dados morfológicos, ecológicos, biogeográficos e filogenéticos (regiões ACT, CAL1, ITS, RPB2 e TEF1), concluíram que nenhuma das linhagens comerciais de *Trichoderma* pertencem à espécie *T. harzianum*. A correta identificação das espécies é fundamental para o uso de agentes de biocontrole, pois os mecanismos de ação podem ser diferentes entre as espécies e/ou linhagens utilizadas, sendo que a eficiência dos mesmos pode ser aumentada pela combinação de linhagens de diferentes espécies.

Estudos sobre *Trichoderma* spp. vem confirmando a capacidade desses fungos para o controle de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, tais como: *F. oxysporum*, *R. solani*, *Stromatinia cepivora*, *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum*, entre outros (Alvarado-Marchena & Rivera-Méndez, 2016; Srivastava et al., 2016; Nagamani et al., 2017; O'Brien, 2017). O potencial de controlar patógenos de solo deve-se em grande parte à habilidade de colonizar escleródios, microescleródios, esporos e clamidósporos, que de maneira geral, são alvos difíceis de serem atingidos por fungicidas sintéticos. Isso pode também estar relacionado à ocorrência natural do fungo na maioria dos solos agricultáveis.

Diversos produtos à base de *Trichoderma* spp. são comercializados mundialmente como Vinevax TM, Trichozam, Trichosil, Trichodermus WP, Trichodermil, Trichodermax, Trianum, Trichobiol WP, Trichomax, Quality WG, Nicoderma, Ecotrich ES, Lycomax, Bioderma, Bio Traz, Esquive, SoilGard 12, Trifender, Tricodamp entre outros (Bettiol et al., 2012; Adapar, 2020). O produto pode ser aplicado de várias maneiras: misturado ao substrato ou incorporado ao solo; em pulverizações foliares;

através da água de irrigação, por exemplo via pivô central; inoculado às sementes antes do plantio; aplicado especificamente no sulco antes do plantio ou por imersão de mudas em soluções do produto. A escolha do método de aplicação deve ser avaliada de modo a contribuir para maior eficiência do fungo.

Os diversos mecanismos de ação contra os fitopatógenos e o fato de não serem patogênicos às plantas, são características que tornam as espécies do gênero *Trichoderma* atraentes como agentes de controle de biológico (Haddad et al., 2017; Marques et al., 2018). Os mecanismos de ação das espécies de *Trichoderma* envolvem a competição por espaço e nutrientes, o hiperparasitismo que envolve a produção de enzimas líticas, indução de resistência, promoção de crescimento e antibiose, por meio da produção de compostos secundários (Machado et al., 2012; Kottb et al., 2015; Chen et al., 2016; González & Fuentes, 2017).

A competição é considerada um dos mecanismos mais eficientes para o controle das doenças, devido à agressividade de muitas espécies de *Trichoderma* e ao fato de muitos fungos fitopatogênicos serem sensíveis à falta de alguns nutrientes (Benítez et al., 2004). *Trichoderma* spp. multiplicam-se rapidamente, colonizando a rizosfera, antes do patógeno, utilizando os recursos disponíveis, tais como fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio, ferro, água, luz, espaço, entre outros (Machado et al., 2012).

Trichoderma spp. exercem também o hiperparasitismo, sendo capazes de detectar a presença de hifas de outros fungos e crescerem em sua direção, respondendo a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira. Em muitos casos o hiperparasita é capaz de enrolar-se fortemente em toda a extensão do patógeno, penetrando as hifas e digerindo seu conteúdo (Consolo et al., 2012; Machado et al., 2012).

Zeng et al. (2012) mostraram o potencial de uso de *T. harzianum* no controle do mofo-branco na cultura da soja. Foi obtida uma redução de 43,1% na severidade da doença e 38,5% na produção de escleródios de *S. sclerotiorum*. Carvalho et al. (2015) avaliaram em condições de campo, a eficiência de diversos isolados de *Trichoderma* para o manejo de *S. sclerotiorum* em duas safras de feijão, obtendo redução no número médio de apotécios por metro quadrado de solo. Os isolados mais eficazes foram capazes de reduzir de 46 a 62% a germinação dos apotécios. Haddad et al. (2017) avaliaram *in vitro* a inibição da germinação de *S. sclerotiorum*, por 120 linhagens de *Trichoderma* spp., das quais 22 resultaram em 100% de inibição do patógeno. Além disso, nove linhagens mostraram a capacidade do fungo em proteger a soja durante a fase de germinação da

semente e de crescimento das plantas. As melhores linhagens foram identificadas como *T. koningiopsis*, *T. asperelloides*, *T. atroviride* e *T. virens*.

Indução de resistência é um mecanismo de controle biológico indireto, pois a planta responde ao ataque dos patógenos por meio da ativação de mecanismos de defesa que podem ser previamente desencadeados pela presença de *Trichoderma* próximo às raízes das plantas. A ativação destes mecanismos pode promover a produção de fitoalexinas, lignina adicional, quitinases, glucanases, e compostos fenólicos (Romeiro, 2007; Nawrocka et al., 2018). Esses compostos estão envolvidos nas rotas de percepção dos patógenos e nas rotas de sinalização bioquímica da planta, proporcionando capacidade à planta em perceber sinais a pontos distantes de onde está iniciando o processo de infecção pelo patógeno (Barros et al., 2010).

De acordo com Harman et al. (2004b) e Romeiro (2007), *Trichoderma* sp. pode produzir eliciadores de resistência como serinoproteinases, xilanases, glucanases, peroxidases e glucanases. Recentemente foi demonstrado que *T. virens* expressa dois genes da endopoligalacturonase, *tvpg1* e *tvpg2*, durante a interação com as raízes das plantas. O gene *tvpg2* desempenha um papel regulatório no gene *tvpg1* e no desencadeamento da resposta imune da planta a *B. cinerea* (Sarocco et al., 2017).

Trichoderma spp., ao se estabelecerem na rizosfera podem estimular o crescimento das plantas (González & Fuentes, 2017; Jalali et al., 2017). A promoção de crescimento tem sido relacionada à produção de hormônios e metabólitos secundários, maior eficiência no uso de alguns nutrientes, aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes (Machado et al., 2012; Chen et al., 2016; Estrada-Rivera et al., 2019). As plantas mantêm uma interação complexa com suas populações rizosféricas que é crucial para a assimilação de nutrientes e ao seu desenvolvimento. Essas associações mutuamente benéficas são possíveis porque plantas e microrganismos podem comunicar-se uns com os outros por meio de vários mecanismos de sinalização. Os vegetais são capazes de sentir e responder a população bacteriana e fúngica que habita a rizosfera e a seus produtos como auxinas, citocininas e lactonas (Ortíz-Castro et al., 2009).

Diversos estudos têm mostrado a capacidade de *Trichoderma* em promover o crescimento de plantas. No trabalho de Souza Pedro et al. (2012), 54 isolados de *Trichoderma* spp. causaram aumentos significativos na produção de matéria seca das plantas de feijão, com incremento de até 57,81%. Ozdemir et al. (2016) mostraram que a aplicação *T. harzianum* em plantas de alface promoveu maior teor de clorofila nas folhas, pigmento fotossintético que está relacionado diretamente com a produção de biomassa

vegetal. Além disso, o tratamento com *T. harzianum* foi capaz de proporcionar maior tempo de prateleira em relação ao tratamento controle. Sousa et al. (2018) obtiveram aumento de 54% na matéria seca e um incremento de 35% de parte aérea e raiz avaliando a promoção de crescimento de arroz com o uso de *T. asperellum* combinado com silício (Si). Níveis mais elevados de ácido salicílico e jasmônico também foram encontrados em plântulas tratadas com Si e *T. asperellum*, individualmente.

Outro mecanismo de ação de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole é a antibiose, que é definida como a interação na qual um ou mais compostos orgânicos tóxicos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (Stadnik & Bettiol, 2000). Esses compostos podem ser voláteis ou não voláteis. Tais compostos, incluindo os compostos orgânicos voláteis (COVs), são capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos. Segundo Bae et al. (2016) e Nieto-Jacobo et al. (2017) os COVs além de estarem relacionados com o controle de doenças de plantas, também são considerados promotores de crescimento dos vegetais.

O potencial de *Trichoderma* tem sido melhor comprovado pela presença física do fungo, tanto na interação antagonista-patógeno ou antagonista-planta. Porém como já mencionado, os COVs possuem características importantes que também justificam o uso de *Trichoderma* na agricultura. No mês de setembro do ano de 2020 se fizemos uma busca na plataforma *Web of Science*, por “*Trichoderma*”, encontraremos 18251 trabalhos sobre o tema. Ao refinar a busca para “*Volatile organic compounds*” esse número é reduzido a 158 trabalhos. Diante disso, esse mecanismo de ação necessita ser melhor estudado, visando à compreensão dos fatores envolvidos na redução da doença e na promoção de crescimento de plantas.

Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas

Os COVs são compostos hidrofóbicos e possuem baixa massa molecular com aproximadamente 20 átomos de carbono. Tais características lhes conferem a capacidade de evaporar facilmente à temperatura ambiente, atravessar as membranas celulares com facilidade e serem liberados no ar ou no solo na ausência de uma barreira de difusão (Pichersky et al., 2006; Siddiquee et al., 2012; Hung et al., 2013).

Esses compostos pertencem a diferentes classes químicas, que incluem principalmente compostos de origem terpênica e derivados de ácidos graxos, os quais podem ser de diferentes classes químicas como os álcoois, as cetonas, as lactonas,

compostos aromáticos e ésteres (Schenkel et al., 2015). A biossíntese dos COVs é altamente dependente da disponibilidade de carbono, nitrogênio, enxofre e de energia fornecida pelo metabolismo primário (Kaddes et al., 2019).

Os COVs estão envolvidos em diferentes processos biológicos e apresentam potencial para aplicações biotecnológicas na agricultura (Druzhinina et al., 2011; Jalali et al., 2017). Através dos COVs, os fungos são capazes de interagir com as plantas e se defenderem de predadores (Chen et al., 2016; Kaddes et al., 2019). Considerando que aproximadamente 340 espécies e milhares de linhagens de *Trichoderma* vivem no planeta Terra (Bisset et al., 2015; Wang & Zhuang, 2019), e que o perfil dos COVs é diferente entre as espécies e/ou linhagens (Lee et al., 2016; Zeilinger et al., 2016), existe um enorme potencial para encontrar novos compostos bioativos desses fungos que poderão contribuir para uma agricultura mais sustentável.

Alguns estudos já visam isolar compostos bioativos no intuito de desenvolver novos produtos para o controle de doenças de plantas (Spiteller, 2015). No estudo de Cai et al. (2013) foi caracterizado o composto harzianolide de *T. harzianum* SQR-T037. Tanto o harzianolide purificado, quanto o extrato bruto do composto, aumentou a atividade de algumas enzimas relacionadas à defesa ao estresse oxidativo. Os resultados mostraram que o harzianolide promoveu significativamente o crescimento de plântulas de tomate em até 2,5 vezes em comparação com o controle. Os autores também mostraram que harzianolide contribuiu para prevenir a infecção causada por *S. sclerotiorum*. As reduções das lesões nas folhas foram de 28,5 e 30,7% na concentração de 1 ppm e 0,1 ppm, respectivamente.

Recentemente, Nawrocka et al. (2018) demonstraram que os COVs Z-3-hexanal, Z-3-hexenol e E-2-hexenal, aliados ao ácido salicílico e a compostos β -ciclocitrais de *T. atroviride* TRS25 estão relacionados com a regulação positiva dos genes de resistência induzida como PR1, PR4 e PR5 em plantas de pepino. Também mostraram que houve maior deposição de calose e lignina que protegeram as plantas contra a infecção causada por *R. solani*. Adicionalmente, tornaram os órgãos das plantas mais flexíveis, o que contribuiu para melhor absorção de água e nutrientes.

Nos últimos anos, o número de trabalhos mostrando a eficiência dos COVs de microrganismos no controle biológico tem aumentado devido principalmente aos avanços alcançados na caracterização dos perfis químicos desses compostos que foi impulsionada com o uso das técnicas analíticas para identificação de COVs (Chen et al., 2016; Nieto-Jacobo et al., 2017; Guo et al., 2019).

Lee et al. (2016) identificaram vários terpenos derivados de *Trichoderma* que são promotores de crescimento em plantas. A exposição de *Arabidopsis thaliana* a esses compostos aumentaram de 31 a 56% a biomassa vegetal e de 82 a 89% o teor de clorofila, em comparação com as plantas não expostas aos COVs de *Trichoderma*. Além disso, os autores observaram que essas mudanças mediadas pelos COVs são espécie-específicas e dependem da linhagem de *Trichoderma* utilizada.

Outro estudo envolvendo COVs de *Trichoderma* spp. sob o desenvolvimento de *A. thaliana* mostrou que os COVs atuam em diferentes sistemas de defesa e desenvolvimento das plantas (Jalali et al., 2017). A presença de COVs de *Trichoderma* induziu o crescimento das plantas, resultando em maior área foliar, mais raízes laterais e plantas com tonalidade verde mais escuro. As plantas expostas por 14 dias aos COVs de *T. koningii*, acumularam menos peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sob estresse salino. Esses resultados podem refletir o possível papel dos COVs desta linhagem na proteção de plantas contra o dano oxidativo sob o estresse salino.

Os COVs derivados de *T. gamsii* YIM PH30019 apresentaram atividade antagonista contra fungos fitopatogênicos que ocorrem em *Panax notoginseng* como *Epicoccum nigrum*; *Fusarium flocciferum*; *Phoma herbarum*; *Scytalidium lignicola* (Chen et al., 2016). A linhagem estudada também melhorou a emergência das plântulas e aumentou a tolerância das plantas às doenças transmitidas pelo solo em condições de campo.

Apesar de já existirem estudos na literatura para identificar e elucidar os mecanismos de ação dos COVs de *Trichoderma* sobre alguns fitopatógenos, ainda existem poucos resultados mostrando qual ou quais dos COVs estão envolvidos nestas interações, se para a ação é necessária toda mistura de COVs ou somente alguns compostos chave. Responder essa questão não é fácil, uma única linhagem de *Trichoderma* pode emitir dezenas de COVs, por exemplo, em uma das linhagens de *Trichoderma* estudada em nosso laboratório foram identificados 59 COVs com potencial de ação contra patógenos (Dados não publicados). O perfil e a eficiência dos COVs podem variar de acordo com o patógeno a ser antagonizado (Abraham et al., 2013). Isso demonstra novamente a necessidade de novos estudos sobre esse mecanismo de ação de *Trichoderma* spp.

Além disso, estudos moleculares, a exemplo da análise transcritômica e espectrometria de massa, podem contribuir no entendimento desse mecanismo, auxiliando no entendimento de como os COVs agem e protegem a planta contra a

infecção por fitopatógenos e como estes respondem à ação dos COVs. A identificação de transcritos e proteínas diferencialmente expressas quando os patógenos entram em contato com os COVs de *Trichoderma* podem auxiliar a desvendar as rotas metabólicas envolvidas nessas defesas e os principais compostos envolvidos nas mesmas. Até a execução desse estudo, apenas um trabalho mostrou respostas moleculares em *S. sclerotiorum* após exposição aos COVs de *Trichoderma*, porém os resultados obtidos foram limitados (Ojaghian et al., 2019). Novos conhecimentos dessas interações poderão contribuir para melhor compreensão do potencial dos COVs de *Trichoderma* spp. para agricultura.

RNA-Seq no controle de fitopatógenos

Compreender os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre determinado agente de biocontrole e fitopatógeno é crucial para o estabelecimento de agentes de controle biológico efetivos. Uma das formas de se atingir esse objetivo é explorando o perfil de expressão do RNA, por meio da análise do transcrito (Steindorff et al. 2014; Perazzolli et al., 2016; Qiu et al., 2016).

A transcritômica refere-se ao estudo das moléculas de RNA, formadas a partir do processo de transcrição (DNA → RNA), que codificam as proteínas a serem traduzidas. Esses RNAs são denominados RNAs mensageiros (mRNA) e o conjunto de mRNAs é denominado transcrito (Faleiro et al., 2011).

A análise transcritômica de fitopatógenos pode auxiliar na compreensão da patogênese fúngica em nível molecular permitindo, potencialmente, a caracterização de genes expressos em diferentes estágios da infecção ou em diferentes condições experimentais, além de gerar bancos de dados que estão aumentando o nível de informações sobre os fitopatógenos, suas hospedeiras e colaborando para um maior entendimento da relação entre esses e os agentes de biocontrole (Imam et al., 2016; Qin et al., 2017).

O desenvolvimento de novos métodos de sequenciamento de DNA de alto desempenho, chamado de sequenciamento de nova geração, proporcionou um avanço metodológico importante que permite a obtenção de milhões de sequências curtas simultaneamente a um custo acessível. Esse avanço originou uma grande mudança metodológica permitindo a amostragem de perfis completos de expressão de RNA de organismos, denominado RNA-Seq (Hall, 2007; Wang et al., 2009).

O grande número de sequências geradas por RNA-Seq permite a quantificação dos transcritos sequenciados. Assim, além do dado qualitativo, que é a sequência em si, também são gerados dados quantitativos de contagem de cada transcrito, possibilitando a realização de análises comparativas entre amostras, identificando genes diferencialmente expressos (Hall, 2007; Ji & Sadreyev, 2018). Devido à alta cobertura de sequenciamento, essa técnica permite a quantificação dos níveis de expressão gênica mesmo em transcritos que apresentem níveis mais baixos de expressão, além de descobertas sobre *splicing* alternativo, detecção de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e mutações somáticas (Shendure & Hanlee, 2008).

A análise de similaridade com sequências de bancos de dados permite a inferência de função ou anotação funcional desses transcritos. Além disso, esse método permite a montagem dos transcritos sem a utilização de genoma de referência, o que favorece os estudos para organismos pouco estudados (Grabherr et al., 2011). Quando há um genoma de referência disponível, o mapeamento das sequências do RNA-Seq localiza fisicamente os transcritos no genoma (Wang et al., 2009).

A disponibilidade de um genoma de referência da espécie estudada é extremamente valiosa na qualidade da análise de RNA-Seq. O mapeamento dos transcritos obtidos experimentalmente no genoma aprimora a capacidade de análise, permitindo a inferência dos transcritos completos dos genes expressos a partir da posição de mapeamento das sequências curtas, geradas pelo sequenciamento de nova geração. O genoma de *S. sclerotiorum* foi sequenciado em 2011 (Amselem et al., 2011) e está disponível na plataforma MycoCosm, do *Joint Genome Institute* do Departamento de Energia dos EUA (JGI-DOE). Recentemente, Derbyshire et al. (2017), com a combinação das ferramentas de sequenciamento em tempo real de molécula única PacBio (*Pacific Biosciences*), que gera sequências longas, e sequenciamento *Illumina*, geraram um genoma de referência mais completo para *S. sclerotiorum*. Utilizando essa versão aprimorada do genoma de referência, identificaram uma série de novos genes que codificam proteínas efetoras.

Steindorff et al. (2014), utilizando a técnica de RNA-Seq para comparar a expressão gênica de *T. harzianum* TR274 crescido em meio mínimo (TM) suplementado com glicose 2% ou com 0,5% de parede celular inativada de *S. sclerotiorum*, identificaram 297 genes diferencialmente expressos nos micélios cultivados por 12, 24 e 36 horas, sob essas duas condições. Os resultados mostraram uma distribuição similar do conjunto de genes expressos entre 24 e 36 horas, com a maioria das alterações detectadas

entre 12 e 24 horas após o crescimento de TR274 na presença de *S. sclerotiorum* inativada. A anotação funcional desses genes identificou diversos processos biológicos e funções moleculares requeridas durante o crescimento de TR274. Foram identificados genes que codificam proteínas com funções transportadoras, atividade hidrolítica, aderência, desenvolvimento de apressório e patogênese.

Outro estudo utilizando a técnica de RNA-Seq teve o objetivo de comparar perfis transcricionais do agente de biocontrole *T. hamatum* GD12 na interação com o patógeno *S. sclerotiorum* e na promoção de crescimento de plantas de alface. Os resultados mostram que a interação antagonista com *S. sclerotiorum* promove uma extensa e particular reprogramação transcricional, no início dessa interação, que não acontece na promoção do crescimento de alface. A comparação dos transcritomas observados na promoção de crescimento e como agente de biocontrole permitiu a identificação de novos grupos de genes envolvidos no potencial de GD12 como agente de biocontrole, assim como a dinâmica temporal dessa expressão. Na ação antagonista, destaca-se a identificação de transcritos de pequenas proteínas secretadas, ricas em cisteína (SSCRP) e de grupos de transcritos associados com metabolismo secundário com função predita na síntese de antimicrobianos (Shaw et al., 2016).

Seifbarghi et al. (2017) analisando os transcritos de *S. sclerotiorum* durante a infecção em *Brassica napus*, revelou, por análise de RNA-Seq, genes associados à patogenicidade ou virulência. Esses genes foram categorizados em oito grupos funcionais: enzimas hidrolíticas, metabólitos secundários, desintoxicação, sinalização, desenvolvimento, efetores secretados, ácido oxálico e produção de espécies reativas a oxigênio. Os resultados indicam que *S. sclerotiorum* implementa uma série de fatores e estratégias complexas para facilitar a colonização nos tecidos e superar as linhas de defesas do hospedeiro.

Em um estudo mais recente, Ojaghian et al. (2019) demonstraram que enzimas antioxidantes de *S. sclerotiorum* são alteradas após exposição aos COVs emitidos por *Trichoderma* spp. Posteriormente a 24 horas de exposição, quatro genes que codificam a enzima glutationa-S-transferase (GST) foram regulados positivamente. Essas enzimas participam do metabolismo de defesa e desintoxicação do patógeno.

Espectrometria de massa no controle de fitopatógenos

Espectrometria de massa (*Mass Spectrometry* - MS) é uma ferramenta analítica em que moléculas de uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa e, em seguida,

separados no analisador do espectrômetro de massa de acordo com a razão massa sobre a carga (m/z). Na espectrometria de massa, alguma forma de energia é transferida à amostra para causar a sua ionização. Após a ionização, um detector recebe os íons que foram formados, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados e armazenados na memória de um computador (Rizzato et al., 2015; Sanguinetti & Posteraro, 2017). Essa ferramenta é comumente utilizada para obter informações da massa molecular e de características estruturais da amostra.

Diferentes abordagens baseadas em vários sistemas de ionização, análise e detecção, têm sido desenvolvidas e, um dos métodos mais utilizados é a ionização por dessorção a laser assistida por matriz, MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), seguida pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, TOF (*Time Of Flight*), que permite determinar a razão m/z da amostra baseando-se na velocidade de íons (Figura 4) (Chalupová et al., 2013).

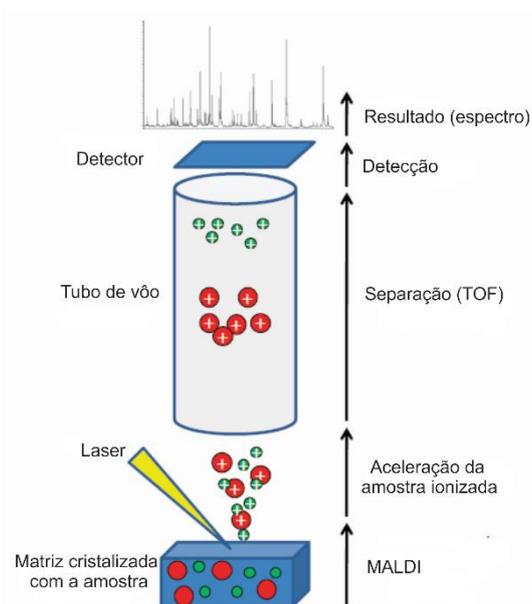


Figura 4. Descrição da técnica de MALDI-TOF: A amostra é misturada com uma matriz sobre uma placa de metal condutora. Depois da cristalização da matriz junto com a amostra, a placa metálica é introduzida no espectrômetro de massas, onde é bombardeada com breves pulsos de laser. As moléculas dessorvidas e ionizadas são aceleradas por meio de um campo elétrico e entram em um tubo metálico submetido a vácuo (tubo de voo, por onde as moléculas passam) até atingirem o detector. Os íons com tamanho menor (m/z) viajam mais rapidamente pelo tubo de voo do que os de tamanho maior. Desse modo, os analitos ou substâncias das amostras, separados por TOF formam espectros de acordo com sua razão m/z (massa/carga) e com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada (analito). Para a identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados (Goulart & Resende, 2013).

A técnica de MALDI-TOF permite a detecção e identificação de perfis proteicos de microrganismos como fungos e bactérias e também é uma importante ferramenta para fins taxonômicos, na genotipagem e análise de polimorfismos no DNA, na

investigação de modificações pós-transcricionais no RNA, além de aplicações em medicina clínica, biotecnologia e indústria (Respinis et al., 2010; Goulart & Resende, 2013; Rizzato et al., 2015). Estudos com esse tipo de análise têm aumentado nos últimos anos por esta técnica ser rápida, confiável, de alta sensibilidade e rendimento (De Carolis et al., 2012; Bader, 2013; Rizzato et al., 2015).

Respinis et al. (2010), utilizando a ferramenta de MALDI-TOF, analisaram 129 linhagens de *Trichoderma* e *Hypocrea*, morfológicamente e geneticamente caracterizadas, pertencentes a 25 espécies em 8 clados filogenéticos. A partir dos perfis de massas resultantes de amostras individuais, foi construída uma árvore filogenética, que apresentou resultado similar às árvores obtidas a partir de sequências ITS e TEF1 de cada linhagem obtidas do GeneBank. Os resultados confirmaram clados e seções já definidas anteriormente.

No estudo de Pereira et al. (2014), o uso da técnica de eletroforese bidimensional associada ao MALDI-TOF permitiu mapear proteínas envolvidas com indução de defesa em plantas de feijão. Esses autores demonstraram que *T. harzianum* ALL 42 foi capaz de modular a resposta das plantas na presença de dois fungos fitopatogênicos, *R. solani* e *F. solani*.

Avaliando o desenvolvimento *in vitro* dos escleródios de *S. sclerotiorum*, Liu et al. (2015) utilizaram a ferramenta MALDI-TOF e conseguiram identificar a partir de exsudatos secretados na superfície dos escleródios, a proteína α -1,2-manosidase (Man 41). Esse foi o primeiro relato de uma α -manosidase identificada a partir de gotas de exsudado não organelares, o que sugere que Man-41 extracelular tem, possivelmente, uma função diferente das α -manosidasas derivadas de organelas.

Kurt et al. (2017) relataram sintomas típicos de *S. sclerotiorum* em plantas de batata na Turquia. Posteriormente à detecção dos sintomas, foi feito teste de patogenicidade, cumprindo todas as etapas do Postulado de Koch e foram obtidas plantas com sintomas idênticos aos encontrados no campo. Em seguida, o patógeno foi analisado por sequenciamento da região ITS, confirmando *S. sclerotiorum* como o organismo causal da doença. A fim de complementar os resultados, a identificação do isolado foi também confirmada por MALDI-TOF, por comparação do perfil de proteínas com um isolado de referência.

Em outro estudo, Hu et al. (2017) comparando os perfis proteicos do agente de controle biológico *Aspergillus aculeatus* Asp-4, quando cultivado em material esclerótico de *S. sclerotiorum* por 48 horas, com o Asp-4 crescido apenas em meio BDA

(Batata Dextrose Ágar), mostraram 116 pontos proteicos que exibiram acúmulo diferencial entre os dois tratamentos. A análise de MALDI-TOF identificou um total de 32 proteínas distintas, sendo 6 reguladas negativamente e 26 reguladas positivamente. As proteínas reguladas positivamente foram diferenciadas em três grandes grupos, de acordo com suas funções. O primeiro grupo refere-se a proteínas com ação degradativa do material esclerótico e absorção de nutrientes, o segundo é de proteínas envolvidas com atividade no metabolismo energético e o terceiro, proteínas envolvidas na regulação do estresse ambiental.

Li et al. (2018), utilizaram MALDI-TOF para identificar proteínas possivelmente relacionadas à formação do apressório de *S. sclerotiorum*. Um total de 40 proteínas foram detectadas. Destas, 17 proteínas foram previstas com as funções conhecidas e outras 23 designadas como proteínas hipotéticas, representando 56% do total.

Recentemente, Inglis et al. (2020) utilizaram a técnica de MALDI-TOF para complementar as análises filogenéticas de 54 linhagens de *Trichoderma* coletadas de solo em plantações de alho e cebola de oito locais diferentes no Brasil.

Estudos direcionados para a investigação de diferenças nos perfis proteicos de fitopatógenos em exposição aos agentes de controle biológico podem auxiliar a compreensão dos aspectos moleculares envolvidos na patogenicidade da doença e nas respostas dos fitopatógenos ao agente de biocontrole. Analisar a diversidade e modificações quantitativas ou até mesmo estruturais dessas proteínas em diferentes condições experimentais pode gerar informações úteis para alcançar métodos mais eficientes no controle das doenças (Billon-Grand et al., 2002).

Justificativa

O patógeno *S. sclerotiorum* causa sérios prejuízos a diversas culturas, incluindo a alface. O fato do mofo-branco possuir amplo ciclo de hospedeiras e produzir escleródios, restringe e dificulta a aplicação de medidas de controle para essa doença. Certas linhagens do fungo antagonista *Trichoderma* spp. produzem COVs como um dos seus mecanismos de ação contra *S. sclerotiorum* e promoção de crescimento de plantas. No entanto, ainda se conhece pouco sobre essas interações. Dessa forma, foi proposto neste projeto de pesquisa uma abordagem multidisciplinar entre COVs de *Trichoderma* x patógeno e COVs de *Trichoderma* x plantas de alface, a fim de identificar as respostas de *S. sclerotiorum* e de plantas de alface ao efeito exclusivamente dos COVs emitidos pelo antagonista. Para tanto, foram realizadas avaliações morfológicas e microscópicas do patógeno, análises de perfil proteico usando espectrometria de massas e expressão gênica diferencial a partir de RNA-Seq, quantificação de severidade da doença e avaliações de parâmetros agronômicos das plantas de alface. A escassez de informações disponíveis na literatura sobre os resultados almejados nesse estudo justificou a realização desse trabalho, com os objetivos descritos a seguir.

Objetivo geral

Avaliar a interação de *S. sclerotiorum* CEN1147 com compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. e os efeitos destes na promoção de crescimento e no controle do mofo-branco em plantas de alface.

Objetivos específicos

1. Avaliar a inibição micelial e a morfologia do micélio de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma* spp.
2. Identificar, por espectrometria de massa, possíveis diferenças nos perfis proteicos de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição a compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp.
3. Identificar, por RNA-Seq, possíveis variações no perfil transcricional de *S. sclerotiorum* CEN1147 quando exposto aos compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241.
4. Avaliar a capacidade dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 em promover um aumento do crescimento de plantas de alface.
5. Comparar a severidade do mofo-branco em plantas de alface após a inoculação de *S. sclerotiorum* CEN1147 em diferentes etapas de exposição aos compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241.

Referências

- Abraham A, Philip S, Jacob CK, Jayachandran K. 2013. Novel bacterial endophytes from *Hevea brasiliensis* as biocontrol agent against *Phytophthora* leaf fall disease. *BioControl*, 58: 675-684.
- Adams PB, Ayers WA. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69: 896-899.
- Adapar: Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Paraná. 2020. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/pagina-387.html>. Acesso em 21 junho de 2020.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. New York: Academic Press. 922p.
- Alvarado-Marchena L, Rivera-Méndez W. 2016. Molecular identification of *Trichoderma* spp. in garlic and onion fields and *in vitro* antagonism trials on *Sclerotium cepivorum*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 40: 1-9.
- Amselem J, Cuomo CA, van Kan JAL, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, et al. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Plos Genetics*, 7: 1-27.
- Anuário Brasileiro de Horti & Fruti. 2019. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. 96p. Disponível em: http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2019/07/HortiFruti_2019_DUPLA.pdf. Acesso em 24 de maio de 2020.
- Armas I, Pogrebnyak N, Raskin I. 2017. A rapid and efficient *in vitro* regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Methods*, 13: 1-9.
- Arseniuk E, Macewicz J. 1994. Scanning electron microscopy of sclerotia of *Sclerotinia trifoliorum* and related species. *Journal of Phytopathology*, 141: 275-284.
- Bader O. 2013. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 13: 788-799.
- Bae SJ, Mohanta TK, Chung JY, Ryu M, Park G, Shim S, Hong SB, Seo H, et al. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control*, 92: 128-138.
- Barros FC, Sagata E, Ferreira LCC, Juliatti FC. 2010. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. *Bioscience Journal*, 26: 231-239.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Condón AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- Bettiol W, Morandi MAB, Pinto ZV, Júnior TJP, Corrêa ÉB, Moura AB, Lucon CMM, Costa JCB, et al. 2012. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de

- doenças de plantas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. Documentos 88. 155p.
- Billon-Grand G, Poussereau N, Fevre M. 2002. The extracellular proteases secreted *in vitro* and in planta by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal Phytopathology*, 150: 507-511.
- Bisset J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62: 924-931.
- Bissett J, Gams W, Jaklitsch W, Samuels GJ. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*, 6: 263-295.
- Botelho LS, Zancan WLA, Machado JC, Barrocas EN. 2013. Performance of common bean seeds infected by the *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Seed Science*, 35: 153-160.
- Butler MJ, Gardiner RB, Day A. 2009. Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 101: 296-301.
- Cai F, Yu G, Wang P, Wei Z, Fu L, Shen Q, Chen W. 2013. Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 106-113.
- Cardoso SS, Lopes MC, Silva Júnior JF, Borges MMN. 2015. Eficiência de fungicidas no controle do mofo branco na cultura da soja. *Scientia Agraria Paranaensis*, 14: 49-52.
- Carvalho DDC, Geraldine AM, Lobo Junior M, Mello SCM. 2015. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50: 1220-1224.
- Casals C, Teixidó N, Viñas I, Silvera E, Lamarca N, Usall J. 2010. Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines *European Journal of Plant Pathology*, 128: 51-63.
- Chalupová J, Raus M, Sedlářová M, Šebela M, 2013. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*, 32: 230-241.
- Chaverri P, Branco-Rocha F, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T, Samuels GJ. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107: 558-590.

- Chaverri P, Samuels GJ. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology*, 48: 1-116.
- Chen JL, Sun SZ, Miao CP, Wu K, Chen YW, Xu LH, Guan HL, Zhao LX. 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40: 315-324.
- Chitrampalam P. 2008. Biocontrol of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in *S. minor* in desert agroecosystems. *Plant Disease*, 92: 1625-1634.
- Choi IY, Kim JH, Kim J, Han KS, Galea V, Shin HD. 2017. Confirmation of *Sclerotinia sclerotiorum* as the causal agent of stem rot of stock in Korea. *Australasian Plant Disease*, 12: 1-3.
- Clarkson JP, Fawcett L, Anthony SG, Young C. 2014. A model for *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce, based on the effects of temperature, relative humidity and ascospore density. *Plos One*, 41: 1-14.
- Coley-Smith JR, Cooke RC. 1971. Survival and germination of fungal *Sclerotinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 6: 65-92.
- Consolo VF, Monaco CI, Cordo CA, Salerno GL. 2012. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1389-1398.
- Cook RJ, Baker KF. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: The American Phytopathological Society. 539p.
- De Carolis E, Posterano B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenina C, Colozza C, et al. 2012. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 475-484.
- Derbyshire M, Denton-Giles M, Hegedus D, Seifbarghy S, Rollins J, Kan J, Seidl MF, Faino L, et al. 2017. The complete genome sequence of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* reveals insights into the genome architecture of broad host range pathogens. *Genome Biology Evolution*, 9: 593-618.

- Derbyshire M, Denton-Giles M. 2016. The control of *Sclerotinia* stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. *Plant Pathology*, 65: 859-877.
- Dillard HR, Ludwing JW, Hunter JE. 1995. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. *Plant Disease*, 79: 411-415.
- Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee, PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 749-759.
- Estrada-Rivera M, Rebolledo-Prudencio OG, Pérez-Robles DA, Rocha-Medina MADC, González-López MDC, Casas-Flores S. 2019. *Trichoderma* Histone Deacetylase HDA-2 modulates multiple responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 179: 1343-1361.
- Faleiro FG, Andrade SRM, Reis Junior FB. 2011. *Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária*. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados. 730p.
- Fatouros G, Gkizi D, Fragkogeorgi GA, Paplomatas EJ, Tjamos SE. 2018. Biological control of *Pythium*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* in lettuce: association of the plant protective activity of the bacterium *Paenibacillus alvei* K165 with the induction of systemic resistance. *Plant Pathology*, 67: 418-425.
- Fernando WGD, Nakkeeran S, Zhang Y. 2004. Ecofriendly methods in combating *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Recent Research in Developmental and Environmental Biology*, 1: 329-347.
- González FH, Fuentes MN. 2017. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciências Agrícolas*, 34: 17-31.
- Goulart VAM, Resende RR. 2013. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. *Nanocell News*, 1: 1-6.
- Grabherr MG, Muehlbauer E, Ma LJ. 2011. Genome sequencing and assembly. *Fungal Genomics*, 722: 1-9.
- Grau, CR., Radke, VL, Gillespie, FL. 1982. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 66: 506-508.
- Guo Y, Ghirardo A, Weber B, Schnutzier JP, Benz JP, Rosenkranz M. 2019. *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1-15.

- Haddad PE, Leite LG, Lucon CMM, Harakava R. 2017. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52: 1140-1148.
- Hall N. 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *Journal of Experimental Biology*, 210: 1518-1525.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004a. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43-56.
- Harman GE, Petzoldt R, Comis A, Chen J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Plant Physiology*, 94: 146-153.
- Hatvani L, Vágvölgyi C, Kredics L, Druzhinina I. 2014. DNA Barcode for species identification in *Trichoderma*. In: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. ScienceDirect. Cap. 3. p.41-55.
- Hu X, Qin L, Roberts DP, Lakshman DK, Gong Y, Maul JE, Xie L, Yu C. 2017. Characterization of mechanisms underlying degradation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Aspergillus aculeatus* Asp-4 using a combined qRT-PCR and proteomic approach. *BMC Genomics*, 18: 1-13.
- Hung R, Lee S, Bennett JW. 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecology*, 6: 19-26.
- Imam J, Punnet KS, Pratyooosh S. 2016. Plant microbe interactions in post genomic era: Perspectives and applications. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-15.
- Inglis PW, Mello SCM, Martins I, Silva JBT, Macêdo K, Sifuentes DN, Valadares-Inglis MC. 2020. *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. *Plos One*, 15: 1-23.
- Jalali F, Zafari D, Salari H. 2017. Volatile organic compounds of some *Trichoderma* spp. increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Ecology*, 29: 67-75.
- Ji F, Sadreyev RI. 2018. RNA-Seq: Basic Bioinformatics Analysis. *Current Protocols in Molecular Biology*, 124: 1-21.
- Kaddes A, Fauconnier ML, Sassi K, Nasraoui B, Jijakli MH. 2019. Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules*, 24: 1-16.

- Kottb M, Gigolashvili T, Großkinsky D, Piechulla B. 2015. *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-14.
- Krause-Sakate R, Pavan MA, Moura MF, Kurozawa C. 2016. Doenças da alface. In: Amorim L, Bergamim Filho A, Rezende JAM, Camargo LEA. Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. Volume 2. 5ª edição. Ouro Fino-MG. Agrônoma Ceres. p.33-40.
- Kurt S, Uysal A, Kara M, Soylu S, Soylu EM. 2017. Natural infection of potato by *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot disease in Turkey. *Australasian Plant Disease*, 12: 1-3.
- Le Torneau D. 1979. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*, 69: 887-890.
- Lee S, Yap M, Behringer G, Hung R, Bennett W. 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3: 1-14.
- Li J, Zhang X, Li L, Liu J, Zhang Y, Pan H. 2018. Proteomics analysis of SsNsd1-mediated compound appressoria formation in *Sclerotinia sclerotiorum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1-19.
- Liu Z, Wei R, He W, Ruan Y, Liu C. 2015. Characterization of an extracellularly derived α -mannosidase from the liquid exudate of the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108: 107-115.
- Lugtenberg BJJ. 2015. Introduction to plant-microbe-interactions. In: Lugtenberg BJJ (ed) Principles of plant-microbe interactions. Microbes for Sustainable Agriculture. Springer, Berlin. 434p.
- Machado DFM, Parzianello FR, Da Silva ACF, Antonioli ZI. 2012. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 35: 274-288.
- Maldonado IR, Mattos LM, Moretti CL. 2014. Manual de boas práticas agrícolas na produção de alface. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças. Documentos 142. 44p.
- Mao XW, Li JS, Chen YL, Song XS, Duan YB, Wang JX, Chen CJ, Zhou MG, et al. 2018. Resistance risk assessment for fluazinam in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144: 27-35.
- Marques E, Martins I, Mello SCM. 2018. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotropica*, 18: 1-5.

- Meyer MC, Campos HD, Godoy CV, Utiamada CM, Pimenta CB, Jaccoud Filho DS, Borges EP, Juliatti, FC, et al. 2016. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2015/2016: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Embrapa Soja. Circular Técnica 122. 5p.
- Meyer MC, Campos HD, Godoy VC, Utiamada CM, Pimenta CB, Jaccoud Filho DS. 2017. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Embrapa Soja. Circular Técnica 133. 6p.
- Mukherjee PK, Mukhopadhyay AN, Sharma DK, Shrestha SM. 1995. Comparative antagonistic properties of *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*, its relevances to understanding the mechanisms of biocontrol. *Journal Phytopathology*, 143: 275-279.
- Mycobank. 2020a. Search on: Mycobank. Disponível em http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=212553. Acesso em 15 de abril de 2020.
- Mycobank. 2020b. Search on: Mycobank. Disponível em <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=39566&Fields=All>. Acesso em 09 de maio de 2020.
- Nagamani P, Bhagat S, Biswas MK, Viswanath K. 2017. Effect of volatile and no volatile compounds of *Trichoderma* spp. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6: 1486-1491.
- Nawrocka J, Szczech M, Małolepsza U. 2018. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. *Plant Protection Science*, 54: 17-23.
- Nieto-Jacobo MF, Steyaert JM, Salazar-Badillo FB, Vi Nguyen D, Rostás M, Braithwaite M, De Souza JT, Jimenez-Bremont JF, Ohkura M, et al. 2017. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1-18.
- O'Brien PA. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46: 293-304.
- Ojaghian S, Wang L, Xie GL, Zhang JZ, 2019. Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 136: 1-6.

- Ortíz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4: 701-712.
- Ozdemir Y, Polat Z, Ozkan M, Kosti RI. 2016. Effects of selected bio-fungicide and fungicide treatments on shelf life and quality characteristics of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Quality*, 39: 25-53.
- Pal KK, Gardener BM. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. APS net. 25p.
- Peltier AJ, Bradley CA, Chilvers MI, Malvick DK, Mueller DS, Wise KA, Esker PD. 2012. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. *Journal of Integrated Pest Management*, 3: 1-7.
- Perazzolli M, Herrero N, Sterck L, Lenzi L, Pellegrini A, Puopolo G, Peer YV, Pertot I. 2016. Transcriptomic responses of a simplified soil microcosm to a plant pathogen and its biocontrol agent reveal a complex reaction to harsh habitat. *BMC Genomics*, 17: 1-18.
- Pereira JL, Queiroz RML, Charneau SO, Feliz CR, Ricart CAO, Silva FL, Steindorff AS, Ulhoa CJ, et al. 2014. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *Plos One* 9: 1-23.
- Pichersky E, Nole JP, Dudareva N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311: 808-811.
- Purdy LH. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69: 875-880.
- Qin S, Ji C, Li Y, Wang Z. 2017. Comparative transcriptomic analysis of race 1 and race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* induced with different carbon sources. *G3 Genes Genomes Genetics*, 7: 2125-2138.
- Qiu D, Xu L, Vandemark G, Chen W. 2016. Comparative transcriptome analysis between the fungal plant pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum* using RNA sequencing. *Journal of Heredity*, 107: 163-172.
- Ranjan A, Jayaraman D, Grau C, Hill JH, Whitham SA, Ané JM, Smith DL, Kabbage M. 2018. The pathogenic development of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean requires specific host NADPH oxidases. *Molecular Plant Pathology*, 19: 700-714.

- Respinis S, Vogel G, Benagli C, Tonolla M, Petrini O, Samuels GJ. 2010. MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress*, 9: 79-100.
- Rifai MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116: 1-56.
- Rizzato C, Lombardi L, Zoppo M, Lupetti A, Tavanti A. 2015. Pushing the Limits of MALDI-TOF Mass Spectrometry: Beyond Fungal Species Identification. *Journal of Fungi*, 1: 367-383.
- Robbertse B, Strobe PK, Chaverri P, Gazis R, Ciufo S, Domrachev M, Schoch CL. 2017. Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying one name one species in well-defined genera with *Trichoderma/Hypocrea*. *Database*, 2017: 1-14.
- Romeiro RS. 2007. Controle biológico de doenças de plantas - procedimentos. Viçosa, Editora UFV. 172p.
- Samuels GJ. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100: 923-935.
- Sanford GB, Broadfoot WC. 1931. A note on the biological control of roots rots of cereal. Studies on the effects of other soil-inhabiting micro-organisms on the virulence of *Ophiobolus yraminis* Sacc. *Scientia Agricola*, 11: 512-528.
- Sanford GB. 1926. Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies*. *Phytopathology*, 16: 525-547.
- Sanguinetti M, Posteraro B. 2017. Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 55: 369-379.
- Sarrocco S, Matarese F, Baroncelli R, Vannacci G, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP, Vergara M. 2017. The Constitutive Endopolygalacturonase TvPG2 Regulates the Induction of Plant Systemic Resistance by *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 107: 537-544.
- Schenkel D, Lemfack, MC, Piechulla B, Splivallo R. 2015. A meta-analysis approach for assessing the diversity and specificity of belowground root and microbial volatiles. *Frontier Plant Science*, 6: 1-11.
- Seifbarghi S, Borha MH, Wei Y, Coutu C, Robinson JS, Hegedus DD. 2017. Changes in the *Sclerotinia sclerotiorum* transcriptome during infection of *Brassica napus*. *BMC Genomics*, 18: 1-37.

- Sharma RF, Singh D, Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control*, 50: 205-221.
- Shaw S, Cocq KL, Paszkiewicz K, Moore K, Winsbury R, Zabala MT, Studholme DJ, Salmon D, et al. 2016. Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* GD12 during antagonistic interactions with *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Molecular Plant Pathology*, 17: 1425-1441.
- Shendure J, Hanlee J. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26: 1135-1145.
- Siddiquee S, Cheong BE, Taslima K, Kausar H, Mainul HM. 2012. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of Chromatographic Science*, 50: 358-367.
- Sousa TP, Souza ACA, Filippi MCC, Lanna AC, Cortês MV, Pinheiro HA, Silva GB. 2018. Bioagents and silicon promoting fast early upland rice growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 3657-3668.
- Souza Pedro EA, Harakava R, Lucon CMM, Guzzo SD. 2012. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47: 1589-1595.
- Spiteller P. 2015. Chemical ecology of fungi. *Natural Product Reports*, 32: 971-993.
- Spitzer T, Bílovský J, Kazda J. 2017. Effect of fungicide application timing on *Sclerotinia sclerotiorum* infection rate and yield in winter oilseed rape. *Gesunde Pflanzen*, 69: 67-72.
- Srivastava M, Kumar V, Shahid M, Pandey S, Singh A. 2016. *Trichoderma* a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 11: 310-316.
- Stadnik MJ, Bettiol W. 2000. Controle biológico de oídeos. In: Melo IS, Azevedo JL (Ed.) *Controle biológico*. v. 3. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 95-112.
- Steindorff AS, Ramada MHS, Coelho ASG, Miller RNG, Pappas Júnior GJ, Ulhoa CJ, Noronha EF, 2014. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics*, 15: 1-14.

- Töfoli JG, Domingues RJ, Ferrari JT. 2014. Míldio e mofo branco da alface: doenças típicas de inverno. *Biológico*, 76: 19-24.
- Van Beneden S, Pannecoucq J, Debode J, De Backer G, Höfte M. 2009. Characterisation of fungal pathogens causing basal rot of lettuce in Belgian greenhouses. *European Journal of Plant Pathology*, 124: 9-19.
- Vàsquez H, Ouhibia C, Lizzia Y, Azzouza N, Forgesa M, Bardinc M, Nicotc P, Urbana L, Aarroufa Jawad. 2017. Pre-harvest hormetic doses of UV-C radiation can decrease susceptibility of lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.) to *Botrytis cinerea* L. *Scientia Horticulturae*, 222: 32-39.
- Wang C, Zhuang WY. 2019. Evaluating effective *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Rhizoctonia solani* causing root rot of *Vigna unguiculate*. *Journal of Integrative Agriculture*, 18: 2072-2079.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10: 57-63.
- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22: 837-845.
- Weindling R. 1934. Various fungi recently found to be parasitic on *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 24: 1141.
- Wendland A, Moreira AS, Bianchini A, Maringoni AC, Giampan JD, Lobo Junior Carneiro, M. 2016. Doenças do feijoeiro. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamim Filho A, Camargo LEA. *Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas*. Volume 2. 5ª edição. Ouro Fino-MG. Agrônomicas Ceres. p. 383-396.
- Wonglom P, Ito S, Sunpapao A. 2020. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). *Fungal Ecology*, 43: 1-10.
- Wu BM, Peng YL, Qin QM, Subbarao KV. 2007. Incubation of excised apothecia enhances ascus maturation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 99: 33-41.
- Zeilinger S, Grubera S, Bansalb R, Mukherjee PK. 2016. Review: Secondary metabolism in *Trichoderma* e Chemistry meets genomics. *Fungal Biology*, 30: 74-90.
- Zeng W, Kirk W, Hao J. 2012. Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control*, 60: 141-147.

Capítulo 1

Alterações morfológicas e proteicas em *Sclerotinia sclerotiorum* após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp.

Resumo

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam potencial relevante para o controle de doenças de plantas devido aos seus diversos mecanismos de ação, como a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs). O fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causa a doença denominada mofo-branco, podridão-de-esclerotinia ou murcha-de-esclerotinia, em diversas espécies vegetais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a morfologia do micélio e o perfil proteico de *S. sclerotiorum* CEN1147 após a exposição aos COVs emitidos por seis linhagens de *Trichoderma*. Os ensaios foram realizados em laboratório por meio de testes de placa de Petri invertida, com avaliação da inibição do crescimento micelial, observações microscópicas das hifas e análises por espectrometria de massa (MALDI-TOF) do perfil proteico de *S. sclerotiorum*. Os melhores resultados foram obtidos a partir da linhagem de *T. azevedoi* CEN1241, com até 35% de inibição do crescimento micelial e maior efeito inibitório na produção de proteínas diferenciais presentes no tratamento controle de *S. sclerotiorum*. Todas as linhagens de *Trichoderma* testadas diminuíram a largura das hifas do patógeno. A diversidade de espécies de *Trichoderma* e de COVs emitidos por linhagens desse fungo podem possibilitar o desenvolvimento de estratégias de uso de tais compostos no controle de doenças de plantas. Considerando essa atividade biológica, a linhagem CEN1241 mostra ser a mais promissora como agente de biocontrole do mofo-branco.

Palavras-chave: metabólitos secundários, controle biológico, MALDI-TOF, mofo-branco.

Introdução

Vários microrganismos habitam solos rizosféricos e/ou colonizam raízes de plantas, beneficiando-as nos aspectos nutricionais e sanitários (Doley et al., 2017), quer solubilizando e disponibilizando nutrientes minerais, quer impedindo o estabelecimento e infecção por fitopatógenos (Guo et al., 2019).

Fungos do gênero *Trichoderma* Persoon (1794) apresentam grande potencial para o controle de fitopatógenos e promoção de crescimento das plantas, devido aos seus diversos mecanismos de ação como hiperparasitismo, competição, antibiose e indutores de resistência (Lee et al., 2016; Kredics et al., 2018; Ojaghian et al., 2019). Estudos têm mostrado que os compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Trichoderma* spp. exercem papel importante no controle de fitopatógenos e no crescimento das plantas (Srivastava et al., 2016; Haddad et al., 2017; Estrada-Rivera et al., 2019).

Os COVs emitidos pelo fungo *Trichoderma* são compostos hidrofóbicos de baixo peso molecular, com aproximadamente 20 átomos de carbono. Essas características lhes conferem alta volatilidade à temperatura ambiente (Guo et al., 2019). Estudos vêm sendo desenvolvidos para elucidar o papel dos COVs de *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos (Lee et al., 2016; Jalali et al., 2017; Nieto-Jacobo et al., 2017). Por exemplo, ácido acético, dimetil dissulfeto, 6-pentil- α -pirona, dibenzofurano, metanotiol e outros compostos das classes das cetonas, dos policetídeos e dos terpenóides são mencionados como inibidores de crescimento micelial de fungos fitopatogênicos (Castillo et al., 2011; Chen et al., 2016; Zeilinger et al., 2016).

O fitopatógeno habitante do solo, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (1884), infecta mais de 400 espécies de plantas, muitas das quais, de grande interesse econômico, a exemplo alface, algodão, soja, feijão, alfafa, canola, morango, girassol, cenoura, batata e tomate (Derbyshire et al., 2017).

A doença causada por *S. sclerotiorum* é conhecida como mofo-branco, podridão-de-esclerotinia ou murcha-de-esclerotinia. *Sclerotinia sclerotiorum* pode produzir estruturas de sobrevivência por aglomeração de hifas com alto teor de melanina, geralmente arredondadas, alongadas ou formato irregular com tamanho aproximado de 2-20 x 2-30 mm, denominadas escleródios. Dessa forma, o fungo pode permanecer viável no solo em condições adversas por até 10 anos (Krause-Sakate et al., 2016; Choi et al., 2017). Entre as medidas mais recomendadas para controle da doença, citam-se a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, o uso do sistema de plantio direto, tratamento de sementes, fungicidas sintéticos e agentes de controle biológico (Peltier et al., 2012).

A identificação de agentes de biocontrole com potencial para suprimir o mofo-branco e subsequente uso de tais bioagentes no desenvolvimento de biofungicidas constitui uma opção ambientalmente segura para o controle da doença. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a morfologia do micélio e o perfil proteico de *S. sclerotiorum* CEN1147 após a exposição aos COVs emitidos por *Trichoderma* spp.,

como parte de um estudo da ação antagonista de linhagens desse fungo contra o patógeno em questão.

Material e Métodos

Origem e manutenção das linhagens

Foram utilizadas seis linhagens de *Trichoderma* e uma linhagem de *S. sclerotiorum*, todas pertencentes à Coleção de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens utilizadas nos experimentos.

Código	Linhagem	Local de coleta	Solo/Cultivo
CEN1386	<i>T. koningiopsis</i>	Curitibanos/SC	Alho
CEN1389	<i>T. peberdyi</i>	Curitibanos/SC	Alho
CEN1397	<i>T. asperelloides</i>	Rio Paranaíba/MG	Alho
CEN1399	<i>T. longibrachiatum</i>	São Marcos/RS	Alho
CEN1416	<i>T. lentiforme</i>	São José do Rio Pardo/SP	Cebola
CEN1241	<i>T. azevedoi</i>	Brasília/DF	Milho
CEN1147	<i>S. sclerotiorum</i>	Formosa/GO	Feijão

Inglis et al. (2020) recentemente identificaram a linhagem CEN1389 como uma nova espécie, nomeada *T. peberdyi*. A linhagem CEN1241 foi alinhada com *T. azevedoi*, outra nova espécie também caracterizada por Inglis et al. (2020), com alta similaridade entre as sequências.

As culturas mantidas em nitrogênio líquido (N₂) foram reativadas em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) sintético e mantidas em tubos de ensaio com tampa de rosca, contendo 20 mL do mesmo meio, à temperatura de 6 °C. Para cada experimento, amostras retiradas desses tubos de ensaio foram cultivadas por cinco dias em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 20 mL de meio BDA.

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp.

Placas de Petri (150 x 25 mm) contendo 60 mL de meio BDA solidificado, receberam ao centro discos de BDA com micélio (5 mm Ø) colonizado por *Trichoderma*. Da mesma forma, em outra placa de Petri foi colocado um disco de BDA com micélio (5 mm Ø) colonizado pelo patógeno. As placas contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas formando uma atmosfera compartilhada. A distância entre as culturas foi de aproximadamente 28,6 mm (Figura 1). O conjunto foi selado com filme de parafina plástica e envolvido com plástico transparente, de forma que as placas contendo o patógeno ficassem na posição superior (Dennis & Webster, 1971). O tratamento controle foi representado por placas também com *S. sclerotiorum*, mas sem o antagonista na parte inferior. O sistema foi mantido à temperatura entre 23 e 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após a total colonização do meio BDA nos tratamentos controles, tomaram-se as medidas do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess[®]). Os valores médios de inibição foram calculados com o uso da fórmula: $I = (C - T)/C \times 100$, onde I representa a porcentagem de inibição, C os valores da medida de diâmetro da cultura de *S. sclerotiorum* do tratamento controle e T, dos valores dos tratamentos com a presença do antagonista, em milímetros. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento e repetido três vezes.

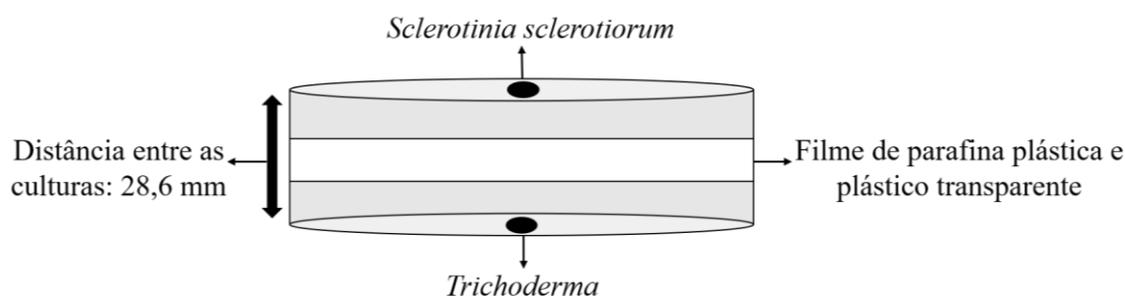


Figura 1. Diagrama do experimento de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma*.

Largura de hifas de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp.

Após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp., amostras do micélio de *S. sclerotiorum* foram examinadas em microscópio (Nikon Eclipse Ci, Japão), em corante lactofenol azul-algodão, sob aumento de 60x. As medidas de largura das hifas foram tomadas e seus valores calculados com o auxílio do *software* de análise de imagens NIS-

Element BR 4.30.01. Obtiveram-se 180 medidas para cada tratamento e as imagens foram registradas no mesmo equipamento.

Análise comparativa do perfil proteico de *S. sclerotiorum* CEN1147 por MALDI-TOF *Biotyper*

Para este experimento foram utilizados os micélios de *S. sclerotiorum* expostos aos COVs emitidos pelas linhagens de *Trichoderma* que apresentaram o maior (CEN1241) e o menor (CEN1386) efeito inibitório de crescimento micelial do patógeno. Para tanto, pequenas alíquotas de micélio do patógeno não exposto e exposto aos COVs das linhagens CEN1386 e CEN1241 de *Trichoderma* foram transferidas para microtubos de polipropileno da marca Eppendorf®, contendo 300 µL de água Milli-Q. Após serem homogeneizadas em vortex por 1 minuto, as amostras receberam 900 µL de etanol puro e foram novamente agitadas em vortex por 1 minuto. Essas suspensões foram centrifugadas duas vezes (13.000 rpm por 2 minutos), removendo-se o sobrenadante. Adicionaram-se, ao pellet, 80 µL de ácido fórmico 70%, seguindo-se uma agitação em vortex por 1 minuto, adição de 80 µL de acetonitrila e novamente centrifugação à 13.000 rpm por 2 minutos. Para análise, 1 µL de amostra foi diluído em 3 µL de matriz ácido α -cianohidroxicinâmico (CHCA) e, em seguida, 1 µL da mistura foi pipetado na placa de aço MSP-96. As análises foram conduzidas em um equipamento com ionização tipo dessorção a laser assistida com matriz (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization*, MALDI) e detector de tempo de voo (*Time Of Flight*, TOF) *MicroFlex* (*Bruker Daltonics*, Alemanha), com *software* de aquisição FlexControl 3.0, método com range de massa de 2.000 a 20.000 m/z. Todos os tratamentos foram submetidos ao mesmo processo de aquisição, somando-se 2.000 tiros satisfatórios. Os perfis de massa encontrados foram comparados com os perfis da lista de massas de referência denominados MSP (*Main Spectra Consensus Peaks*).

Coleta dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241

A coleta dos COVs foi realizada usando câmaras de vidro com volume interno de 2 L. Cada uma dessas câmaras recebeu 10 placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 20 mL de meio BDA e um disco de micélio (5 mm Ø) colonizado por *T. azevedoi* CEN1241. Nesse sistema de coleta de COVs, o ar entra através de um filtro de carvão ativado, garantindo, assim, a passagem de ar purificado. A saída do ar foi realizada com o uso de uma bomba de vácuo com vazão 0,5 L.min⁻¹, conectada a um tubo de vidro contendo 60

mg do polímero adsorvente Porapak Q (50-80 mesh, Supelco, PA, EUA), via conexões de politetrafluoretileno (PTFE). Os COVs foram coletados por 96 horas consecutivas. Após esse período, os COVs coletados foram eluídos dos adsorventes com 500 µL do solvente orgânico *n*-hexano e concentrados para 100 µL, com fluxo de N₂. As amostras obtidas foram armazenadas a -20 °C para posterior análise em cromatógrafo gasoso conectado ao detector de ionização de chamas (CG-DIC) e CG acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM).

Análises químicas dos COVs coletados

Para as análises quantitativas dos COVs, as amostras provenientes da coleta foram acrescidas de 1 µL do composto 16-hexadecanolactona, como padrão interno (PI), preparado na concentração de 0,01 mg.mL⁻¹ em *n*-hexano destilado. Posteriormente, 1 µL de cada amostra foi injetado no CG-DIC (Agilent 7890-A, coluna apolar DB-5MS, 0,32 mm de diâmetro x 30 m de comprimento e filme de 0,25 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), usando o modo de injeção *splitless* e tendo o Hélio como gás de arraste. A temperatura inicial da rampa foi de 50 °C por 2 minutos, aumentando gradualmente 5 °C por minuto até atingir 180 °C e, posteriormente, o segundo gradiente foi de 10 °C por minuto até atingir 250 °C, temperatura esta que foi mantida por 20 minutos. A temperatura do detector foi de 270 °C e do injetor 250 °C. A quantificação dos compostos liberados foi realizada por meio da comparação das áreas de cada composto em relação à área do PI. Desta forma, foi considerado o fator de resposta do detector, para todos os compostos, igual a 1. Os dados foram coletados com o *software* GC *Open Lab*. Os COVs foram identificados, comparando o padrão de fragmentação do espectro de massas com os dados da biblioteca NIST 2008, e classificados neste trabalho pela classe química dos mesmos.

Análises estatísticas

Os dados referentes à inibição micelial e largura de hifas foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), com o auxílio do *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011). Para a quantidade total dos COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241, foi realizado teste de normalidade e transformação logarítmica dos dados para a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), com o uso do *software* PAST (version 2.17C).

Resultados

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp.

Nos três ensaios conduzidos, o tratamento controle colonizou toda a superfície do meio BDA após 96 horas de cultivo. Nos tratamentos com exposição aos COVs foi observada uma redução no crescimento micelial do patógeno em comparação ao controle.

A linhagem CEN1241 foi a que mostrou maiores porcentagens inibitórias com médias de 28,0, 35,8 e 35,2% nos três ensaios conduzidos (Tabela 2). Nos experimentos 1 e 2, os COVs emitidos pela linhagem CEN1399 apresentaram inibição micelial de *S. sclerotiorum* de 31,0 e 31,4%, não diferenciando da inibição provocada pelos COVs da linhagem CEN1241. A linhagem CEN1386 apresentou o menor efeito inibitório do crescimento micelial do patógeno nos três experimentos, com 15,7, 17,7 e 17,0% de inibição.

Tabela 2. Ação dos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial e largura de hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147.

Linhagem	Inibição Micelial (%) ⁽¹⁾			Largura de hifas (µm) ⁽¹⁾
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	
CEN1399	31,0±1,79a	31,4±1,89a	22,7±0,91b	6,56±0,44b
CEN1241	28,0±1,74a	35,8±1,84a	35,2±2,18a	6,98±0,67b
CEN1416	24,3±3,88a	18,0±3,10c	17,1±0,86c	6,49±0,28b
CEN1397	21,0±4,75b	26,4±2,56b	22,1±0,37b	6,83±0,43b
CEN1389	18,7±3,24c	12,8±1,56c	20,6±1,23b	6,56±0,45b
CEN1386	15,0±1,06c	17,7±5,55c	17,0±1,39c	6,31±0,47b
Controle	-	-	-	9,63±1,12a
C.V (%)	13,12	12,19	5,66	8,45

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05).

Além da redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* quando exposto aos COVs, detectou-se também menor abundância de micélio aéreo nas colônias, como ilustrado na Figura 2.

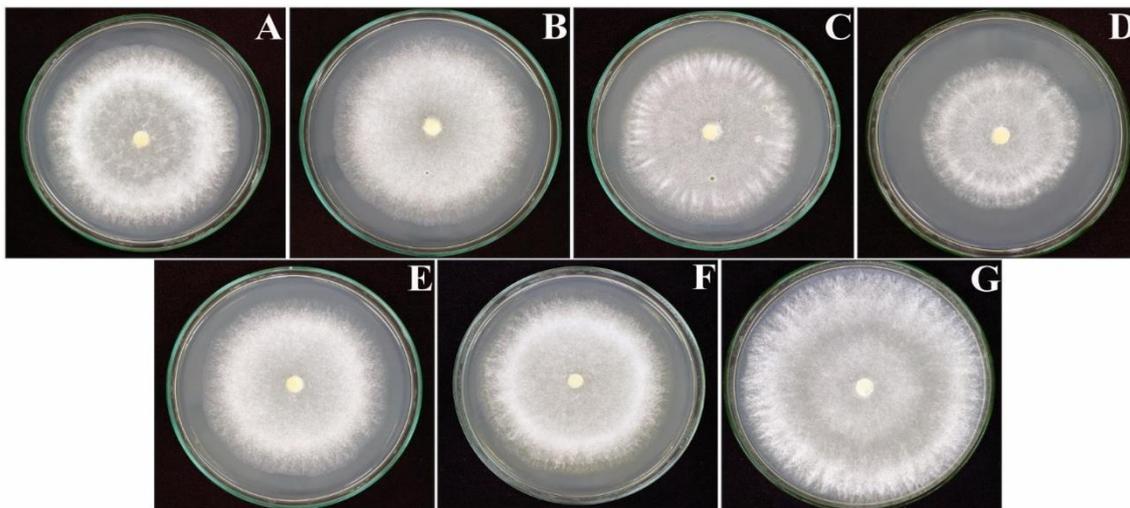


Figura 2. Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. **A:** *T. koningiopsis* CEN1386, **B:** *T. peberdyi* CEN1389, **C:** *T. asperelloides* CEN1397, **D:** *T. azevedoi* CEN1241, **E:** *T. longibrachiatum* CEN1399, **F:** *T. lentiforme* CEN1416, **G:** Controle.

Largura de hifas de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp.

Análises microscópicas das amostras de micélio do patógeno submetidas aos COVs das linhagens de *Trichoderma* mostraram diferenças na largura das hifas de *S. sclerotiorum*, quando comparadas ao micélio não exposto aos voláteis de *Trichoderma* (Figura 3).

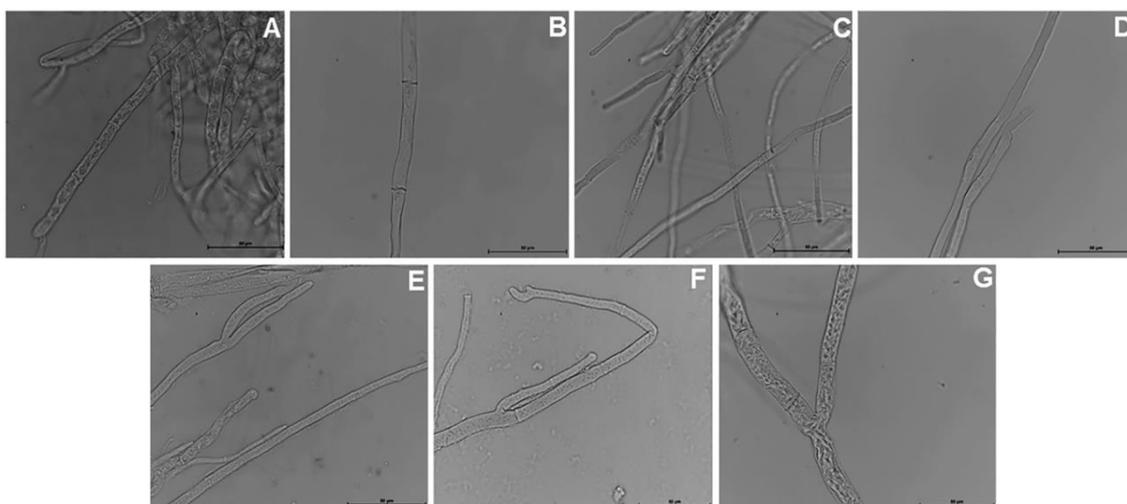


Figura 3. Hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. **A:** *T. koningiopsis* CEN1386, **B:** *T. peberdyi* CEN1389, **C:** *T. asperelloides* CEN1397, **D:** *T. azevedoi* CEN1241, **E:** *T. longibrachiatum* CEN1399, **F:** *T. lentiforme* CEN1416, **G:** Controle. As barras micrométricas correspondem a 50 μ m.

De acordo com as análises estatísticas, *S. sclerotiorum* quando não exposto aos COVs, apresentou maior largura de hifas, com o valor médio de 9,63 μm (Tabela 2). Nos tratamentos onde *S. sclerotiorum* foi exposto aos COVs de *Trichoderma* spp., esses valores médios da largura das hifas variaram entre 6,31 e 6,98 μm , o que representa aproximadamente 34% de redução em relação às hifas do patógeno sem exposição aos COVs.

Análise comparativa do perfil proteico de *S. sclerotiorum* CEN1147 por MALDI-TOF

As análises de MALDI-TOF/MS do micélio de *S. sclerotiorum* exposto aos COVs das linhagens de *Trichoderma* CEN1386 e CEN1241 mostraram diferenças no perfil proteico quando comparadas ao micélio não exposto (Figura 4). O perfil proteico do controle mostrou maior diversidade de massas na faixa de 2.000 a 5.000 m/z (Figura 4). Já os tratamentos expostos aos COVs tiveram maior diversidade de massas na faixa entre 6.000 e 8.000 m/z. Os picos proteicos de *S. sclerotiorum* expostos aos COVs também mostraram maior intensidade de sinal em comparação ao tratamento controle.

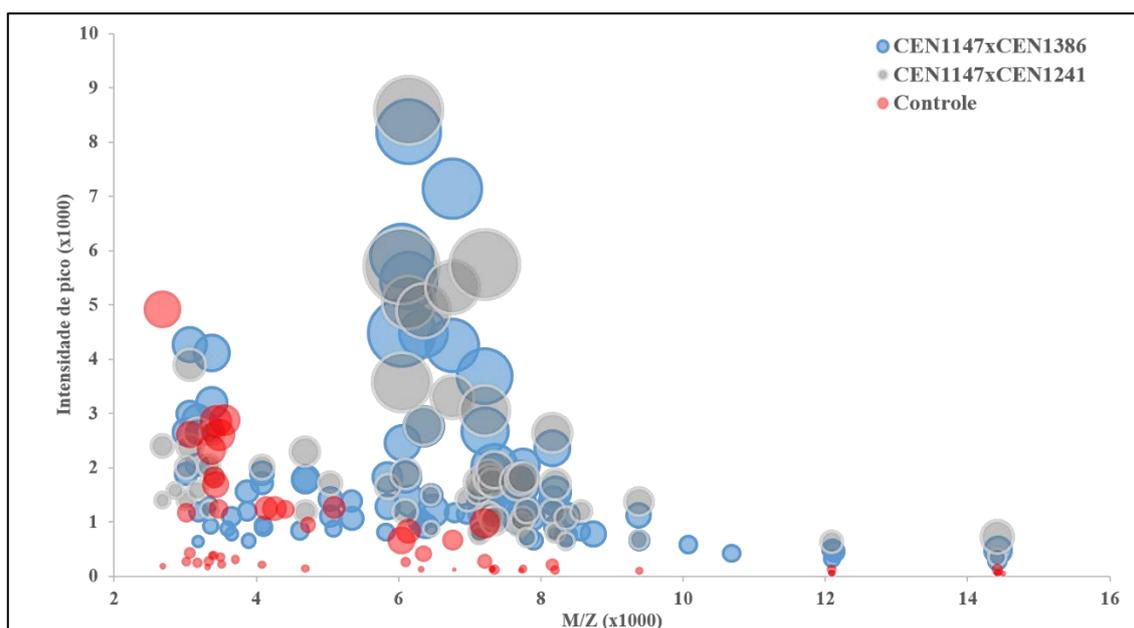


Figura 4. Distribuição de massas detectadas por MALDI-TOF/MS de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma koningiopsis* CEN1386 e *Trichoderma azevedoi* CEN1241, por área do pico, onde o raio de cada círculo é proporcional à intensidade do sinal.

A identificação dos componentes moleculares presentes nos MSPs de cada tratamento permitiu a comparação entre os perfis proteicos. Foram identificados, ao total,

215 íons, dos quais 72,6% são comuns a todos os tratamentos. Os outros 27,4% representaram íons exclusivamente pelos tratamentos individualmente (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de massas proteicas diferenciais de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma koningiopsis* CEN1386 e *Trichoderma azevedoi* CEN1241, identificadas por MALDI-TOF/MS.

Valores de m/z identificados em CEN1147			
	CEN1386	CEN1241	Controle
	3183	2860	3318
	3185	-	3366
	3353	-	3387
	3599	-	3393
	3652	-	3410
	3654	-	3427
	3870	-	3437
	3872	-	3468
	3892	-	3481
	4097	-	3499
	4098	-	3514
	4610	-	3555
	5079	-	3704
	5340	-	4137
	5342	-	4259
	5821	-	4405
	6058	-	4726
	6175	-	5089
	6294	-	6099
	6379	-	6782
	6481	-	14383
	6789	-	14407
	7132	-	14451
	7834	-	14503
	7873	-	-
	7900	-	-
	8168	-	-
	8207	-	-
	8375	-	-
	8737	-	-
	10073	-	-
	10683	-	-
	12098	-	-
	12125	-	-
PPD* (%)	15.8	0.5	11.2

*Percentual de picos diferenciais em relação a todos os picos proteicos obtidos.

Foram identificados 34 íons em *S. sclerotiorum* exclusivos da exposição aos COVs de CEN1386, com massas na faixa de 3183 a 12125 m/z (Tabela 3). Já para o tratamento exposto aos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241, somente um pico diferencial exclusivo com massa de 2860 m/z foi observado. *S. sclerotiorum*, quando não exposto aos COVs de *Trichoderma* spp., apresentou 24 picos proteicos diferenciais exclusivos, com massas na faixa de 3318 a 14503 m/z.

Análises químicas dos COVs coletados

A análise química por CG-EM mostrou que os voláteis majoritários emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 apresentam seis classes químicas: cetonas, aldeídos, álcoois, aromáticos, sesquiterpenos e ésteres (Figura 5). Um total de 30 compostos majoritários foram identificados nestas classes, sendo 16 sesquiterpenoides, cinco cetonas, quatro ésteres, dois álcoois, dois aromáticos e um aldeído. A análise da quantidade média total de COVs liberadas por classe mostrou que as cetonas foram liberadas em quantidade significativamente maior quando comparado aos sesquiterpenos ($P=0,002$), aos ésteres ($P<0,001$) e aldeídos ($P<0,001$), e não houve diferença na quantidade média liberada de cetonas em relação aos álcoois ($P=0,052$) e aos aromáticos ($P=0,623$). A quantidade média liberada de sesquiterpeno foi maior do que de ésteres ($P<0,001$), mas menor do que aromáticos ($P=0,02$), e a quantidade média total de álcoois foi maior do que a quantidade total média de ésteres ($P<0,001$). As demais comparações não foram diferentes das outras classes de compostos liberadas.

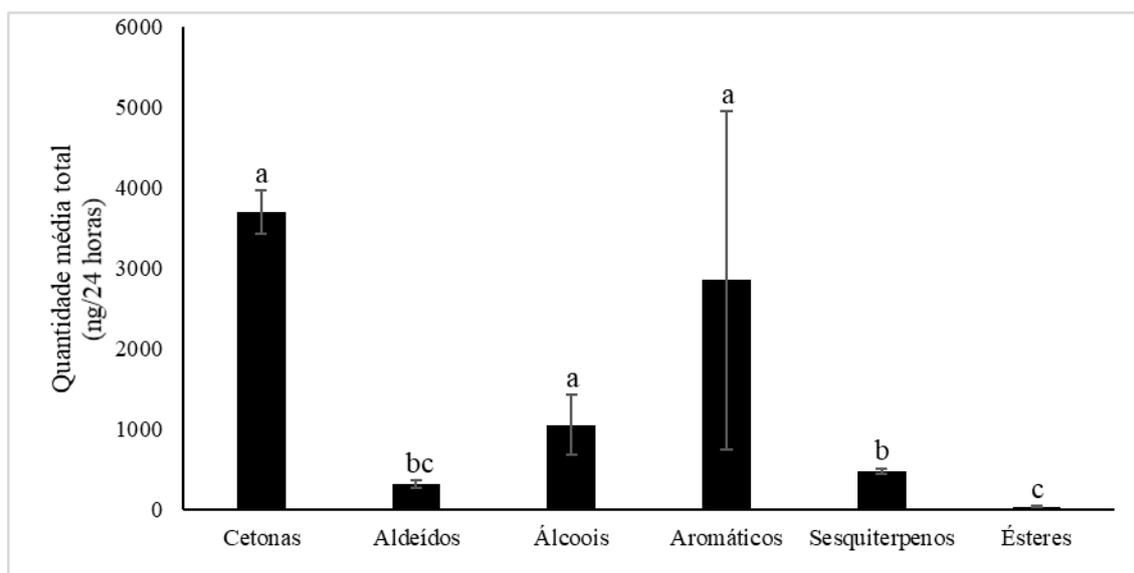


Figura 5. Quantidade total (média \pm EP) das classes químicas dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma azevedoi* CEN1241 por 24 horas. As barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Discussão

As porcentagens de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* obtidas através de COVs de *Trichoderma* spp. neste estudo, estão próximas às verificadas em estudos conduzidos por Amin et al. (2010), que relataram médias de inibição entre 26,3 e 40,7%, com o emprego de diferentes espécies de *Trichoderma*. Castillo et al. (2011) obtiveram médias de inibição variando de 0 a 28,0%, em experimentos com 41 isolados de *Trichoderma*. Já Lopes et al. (2012) utilizando a mesma metodologia, relataram valores de até 60% de inibição do crescimento micelial pela ação de COVs de *T. harzianum*. Resultados mais recentes obtidos por Ojaghian et al., (2019) utilizando COVs de 11 espécies de *Trichoderma*, demonstraram que esses compostos produziram efeito inibitório de 10 a 80% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Em geral, a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por COVs de *Trichoderma* spp. nesse estudo foi heterogênea. Isso pode estar relacionado à diversidade de COVs produzidos por diferentes espécies do fungo, cujo metabolismo varia com a condição ambiental, conforme relatado por Dennis & Webster (1971). Entretanto, Bomfim et al. (2010), sugerem que além da redução e/ou paralisação do crescimento micelial, os COVs de *Trichoderma* spp. podem, também, afetar a esporulação e a germinação de esporos e, ainda, ocasionar alterações das hifas do patógeno.

Quanto à largura de hifas de *S. sclerotiorum*, os dados obtidos das amostras do controle estão em conformidade com Sharma et al. (2015). Esses autores relatam que a largura média das hifas desse fungo está entre 9 e 18 μm em condições normais de

crescimento, ou seja, sem a presença de um antagonista. Com essa comparação pode-se inferir que, no presente estudo, os COVs de todas linhagens de *Trichoderma* apresentaram efeito de redução na largura das hifas de *S. sclerotiorum*, apesar de algumas das linhagens terem mostrado diferentes níveis de inibição de crescimento da colônia. Alterações nas hifas de *S. sclerotiorum* foram também relatadas com COVs de bactérias por Giorgio et al. (2015). Esses autores mostraram que *S. sclerotiorum* exposto aos COVs de seis diferentes rizobactérias exibiram hifas mais finas, além de alterações citológicas em diversas organelas celulares. Essas análises revelaram uma vacuolização no citoplasma de *S. sclerotiorum* em comparação ao controle, indicando a membrana citoplasmática como possível alvo dos COVs.

Estudos sobre as características proteicas de *S. sclerotiorum* vem sendo desenvolvidos nos últimos anos (Liu et al., 2015; Liu & Free, 2016; Li et al., 2018). Entretanto, esse é o primeiro estudo de perfil proteico por espectrometria de massa deste patógeno em exposição aos COVs de *Trichoderma* spp. e a primeira vez que compostos proteicos associados às inibições ou novas expressões evidenciadas inicialmente por modificações morfológicas, resultado da exposição aos COVs, foram detectados.

Embora em determinadas faixas de massa, *S. sclerotiorum* exposto às linhagens CEN1241 e CEN1386 apresentar diversidade de massa semelhante, não podemos afirmar que o resultado da supressão das moléculas/proteínas diferenciais de *S. sclerotiorum* pelos COVs foi o mesmo (Tabela 3). As proteínas diferenciais encontradas no controle foram suprimidas nos tratamentos com COVs, no entanto o tratamento com CEN1386 teve maior capacidade de expressar proteínas diferenciais, que não foram expressas em exposição aos COVs de CEN1241 e no controle. Isso mostra um efeito mais pronunciado dos COVs de CEN1386, que gerou a necessidade do organismo de produzir uma série de proteínas em resposta. Possivelmente, essas proteínas são parte de um arsenal de defesa do microrganismo. Já para CEN1241 a ação dos COVs resultou em maior efeito inibitório, impedindo inclusive a produção das proteínas diferenciais presentes no controle. Essa maior capacidade inibitória pode de fato estar relacionada ao perfil de COVs emitidos por essa linhagem, sendo impeditivos de novas expressões, ou podem ter também um efeito inibidor do metabolismo como um todo, visto que o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* com esse tratamento foi o mais afetado (Tabela 2). Ojaghian et al. (2019) mostraram que o mecanismo de ação inibitória dos COVs emitidos por *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum* alteram a regulação de enzimas antioxidantes, como a glutathione-S-transferase (GST) do patógeno. As GSTs podem reduzir a ação de

compostos antifúngicos do hospedeiro durante o processo de infecção (Sellam et al., 2006). Portanto, a capacidade de desintoxicação de substâncias antimicrobianas pode ser um fator chave de virulência e defesa de *S. sclerotiorum*. Além disso, Falardeau et al. (2013) sugerem que os lipopeptídeos iturinas e fengicinas, produzidos por outro agente de biocontrole (*Bacillus subtilis*) são um dos principais responsáveis pela atividade antagonica contra os fitopatógenos. Da mesma forma, Sabaté et al. (2018) relataram alterações celulares durante o antagonismo com *S. sclerotiorum* via produção de lipopeptídeos. Estes trabalhos anteriores apontam que existem proteínas de *S. sclerotiorum* que estão sendo inibidas pela ação dos COVs das linhagens de *Trichoderma* deste estudo. Essa inibição foi mais proeminentemente pelos COVs da linhagem CEN1241, que em todos os testes realizados mostrou resultados satisfatórios de alterações morfológicas e moleculares do patógeno em questão. A associação das moléculas diferenciais com alterações morfológicas permite identificar quais são as alterações moleculares relacionadas ao efeito morfológico observado. A partir disso, esforços devem ser concentrados no estudo das moléculas diferenciais de cada tratamento para verificar quais seriam os genes relacionados a essas proteínas.

Diversos estudos mostram a capacidade de *Trichoderma* spp. em produzir uma diversidade de COVs das mais variadas classes químicas, capazes de inibir fitopatógenos e promover o crescimento das plantas (Kottb et al., 2015; Lee et al., 2015; Chen et al., 2016; González-Pérez et al., 2018). Os dados encontrados neste estudo estão de acordo com Lee et al. (2016) que também identificaram as mesmas seis classes químicas de COVs emitidas pela linhagem CEN1241 do presente estudo. Nieto-Jacobo et al. (2017) relataram grande diversidade de COVs emitidos por diferentes espécies de *Trichoderma* e, da mesma forma, essa diversidade foi demonstrada por Chen et al. (2016), ao identificarem 22 diferentes COVs de *T. gamsii* com potencial de atividade antagonica contra fungos de solo patogênicos a *Panax notoginseng*. No mesmo estudo conduzido por Chen et al. (2016) foi ainda demonstrada a produção de cetonas pelas linhagens de *Trichoderma*. Do mesmo modo, no presente estudo, *T. azevedoi* CEN1241 demonstrou ser um bom produtor de cetonas e aromáticos, e apresenta uma diversidade grande de sesquiterpenos. Entretanto, ainda não é possível indicar quais destes COVs ou classes de COVs de CEN1241 poderiam estar envolvidos na inibição do crescimento do patógeno. O mais provável é que a combinação toda influencie na inibição do crescimento micelial do patógeno. Estudos futuros poderiam avaliar se uma mistura sintética desses COVs apresentaria o mesmo efeito, e comparar o perfil de voláteis de CEN1241 com o das

outras linhagens, para inferir a influência dos COVs sobre o patógeno. Cooney & Lauren (1998) inferiram que a produção de COVs de *Trichoderma* spp. pode ser específica para cada tipo de patógeno antagonizado. Esses autores mostraram níveis mais elevados de 6-pentil- α -pirona (6PAP) produzido por *T. harzianum* antagonizando *Botrytis cinerea* e, em menor quantidade, quando em confronto com *Fusarium culmorum* e *Rhizoctonia solani*.

A produção diversificada dos COVs pode, ainda, estar relacionada a um estágio limitado do ciclo celular ou um estágio específico de desenvolvimento morfológico do fungo (Zeilinger et al., 2016). Como a coleta dos COVs foi realizada em um período de 96 horas para a análise CG-EM, é possível que esta análise não capture o perfil completo dos COVs emitidos pela linhagem CEN1241 ao longo de todo o desenvolvimento do fungo. Porém, este estudo envolve o tempo em que se observou a ação no patógeno, de forma que podemos afirmar que os COVs que tem ação inibitória foram coletados, e que há um grande potencial para aplicação biotecnológica na agricultura, em razão da antibiose provavelmente associada a outros mecanismos, considerando a importância do controle do mofo-branco.

Conclusão

Todas as linhagens de *Trichoderma* estudadas foram capazes de inibir o crescimento micelial e reduzir a largura das hifas de *S. sclerotiorum* CEN1147, pela produção de COVs.

Os componentes moleculares diferenciais do patógeno foram mais suprimidos em exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241. Considerando essa atividade biológica, a linhagem CEN1241 mostra, entre as demais estudadas, ser a mais promissora como agente de biocontrole do mofo-branco.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado concedidas.

Referências

- Amin F, Razdan VK, Mohiddin FA, Bhat KA, Sheikh PA. 2010. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in-vitro*. *Journal of Phytology*, 2: 34-37.
- Bomfim MP, São José AR, Rebouças TNH, De Almeida SS, Souza IVB, Dias NO. 2010. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. *Summa Phytopathologyca*, 36: 61-67.
- Castillo FDH, Padilla AMB, Morales GG, Siller MC, Herrera RR, Gonzales CNA, Reyes FC. 2011. *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 6: 410-417.
- Chen JL, Sun SZ, Miao CP, Wu K, Chen YW, Xu LH, Guan HL, Zhao LX. 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40: 315-324.
- Choi IY, Kim JH, Kim J, Han KS, Galea V, Shin HD. 2017. Confirmation of *Sclerotinia sclerotiorum* as the causal agent of stem rot of stock in Korea. *Australasian Plant Disease*, 12: 1-3.
- Cooney JM, Lauren DR. 1998. *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 283-286.
- Dennis C, Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotic. *Transactions British Mycological Society*, 57: 41-48.
- Derbyshire M, Denton-Giles M, Hegedus D, Seifbarghy S, Rollins J, Kan J, Seidl MF, Faino L, Mbengue M, Navaud O, Raffaele S, Heard S, Oliver R. 2017. The complete genome sequence of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* reveals insights into the genome architecture of broad host range pathogens. *Genome Biology Evolution*, 9: 593-618.
- Doley K, Dudhane M, Borde M. 2017. Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* in groundnut by using microbial inoculants. *Notulae Scientia Biologicae*, 9: 124-130.
- Estrada-Rivera M, Rebolledo-Prudencio OG, Pérez-Robles DA, Rocha-Medina MADC, González-López MDC, Casas-Flores S. 2019. *Trichoderma* Histone Deacetylase

- HDA-2 modulates multiple responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 179: 1343-1361.
- Falardeau J, Wise C, Novitsky L, Avis TJ. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 869-878.
- Ferreira DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039-1042.
- Giorgio A, De Stradis A, Lo Cantore P, Iacobellis NS. 2015. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-13.
- González-Pérez E, Ortega-Amaro MA, Salazar-Badillo FB, Bautista E, Douterlungne D, Bremont JFJ. 2018. The *Arabidopsis-Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific Reports*, 8: 1-14.
- Guo Y, Ghirardo A, Weber B, Schnutzier JP, Philip Benz J, Rosenkranz M. 2019. *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1-15.
- Haddad PE, Leite LG, Lucon CMM, Harakava R. 2017. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52: 1140-1148.
- Inglis PW, Mello SCM, Martins I, Silva JBT, Macêdo K, Sifuentes DN, Valadares-Inglis MC. 2020. *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. *Plos One*, 15: 1-23.
- Jalali F, Zafari D, Salari H. 2017. Volatile organic compounds of some *Trichoderma* spp. increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Ecology*, 29: 67-75.
- Kottb M, Gigolashvili T, Großkinsky DK, Piechulla B. 2015. *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-14.
- Krause-Sakate R, Pavan MA, Moura MF, Kurozawa C. 2016. Doenças da alface. In: Amorim L, Bergamim Filho A, Rezende JAM, Camargo LEA. *Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas*. Volume 2. 5ª edição. Ouro Fino, MG, Brasil: Agrônômica Ceres, pp. 33-40.

- Kredics L, Chen L, Kedves O, Büchner R, Hatvani L, Allaga H, Nagy VD, Khaled JM, et al. 2018. Molecular tools for monitoring *Trichoderma* in agricultural environments. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-17.
- Lee S, Hung R, Yap M, Bennett JW. 2015. Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. *Archives of Microbiology*, 97: 723-727.
- Lee S, Yap M, Behringer G, Hung R, Bennett W. 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3: 1-14.
- Li J, Zhang X, Li L, Liu J, Zhang Y, Pan H. 2018. Proteomics analysis of SsNsd1-mediated compound appressoria formation in *Sclerotinia sclerotiorum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1-19.
- Liu L, Free SJ. 2016. Characterization of the *Sclerotinia sclerotiorum* cell wall proteome. *Molecular Plant Pathology*, 17: 985-995.
- Liu Z, Wei R, He W, Ruan Y, Liu C. 2015. Characterization of an extracellularly derived α -mannosidase from the liquid exudate of the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108: 107-115.
- Lopes FAC, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandao RS, Monteiro VN, Lobo Junior M, Coelho ASG, Ulhoa CJ, Silva RN. 2012. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, 116: 815-824.
- Nieto-Jacobo MF, Steyaert JM, Salazar-Badillo FB, Vi Nguyen D, Rostás M, Braithwaite M, De Souza JT, Jimenez-Bremont JF, Ohkura M, Stewart A, Mendoza-Mendoza A. 2017. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Frontiers Plant Science*, 8: 1-18.
- Ojaghian S, Wang L, Xie GL, Zhang JZ. 2019. Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 136: 1-6.
- Peltier AJ, Bradley CA, Chilvers MI, Malvick DK, Mueller DS, Wise KA, Esker PD. 2012. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. *Journal of Integrated Pest Management*, 3: 1-7.

- Sabaté DC, Brandan CP, Petroselli G, Erra-Balsells R, Audisio MC. 2018. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus strains*. *Microbiological Research*, 211: 21-30.
- Sellam A, Poupard P, Simoneau P. 2006. Molecular cloning of AbGst1 encoding a glutathione transferase differentially expressed during exposure of *Alternaria brassicicola* to isothiocyanates. *FEMS Microbiology Letters*, 258: 241-249.
- Sharma P, Meena PD, Verma PR, Saharan GS, Mehta N, Singh D, Kumar A. 2015. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing Sclerotinia rot in oilseed *Brassicas*: A review. *Journal of Oilseed Brassica*, 6: 1-44.
- Srivastava M, Kumar V, Shahid M, Pandey S, Singh A. 2016. *Trichoderma* a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review. *African Journal Agricultural Research*, 11: 310-316.
- Zeilinger S, Grubera S, Bansal R, Mukherjee PK. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* e Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30: 74-90.

Capítulo 2

Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma* spp. em fases distintas de desenvolvimento

Resumo

Fungos do gênero *Trichoderma* possuem elevada versatilidade no controle de diferentes doenças de plantas. Dentre os principais mecanismos de ação utilizados por esses fungos antagonistas, cita-se a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs). Acredita-se que o perfil de COVs é característico para cada espécie de fungo, porém pode ser alterado com as condições nutricionais do substrato de cultivo, idade da cultura e durante interação antagônica com outros fungos. O objetivo desse trabalho foi avaliar, *in vitro*, a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 por COVs de seis linhagens de *Trichoderma* em fases distintas de desenvolvimento. Os ensaios foram realizados em laboratório por meio de testes de placa de Petri invertida. As observações foram realizadas em fases diferentes de desenvolvimento do antagonista: fase de crescimento micelial (CM), fase de esporulação (ES) e pareado com o patógeno (PP). Além disso, foi quantificada a esporulação das linhagens de *Trichoderma* testadas. Em todas as condições experimentais, os COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 apresentaram maior efeito inibitório, embora a inibição tenha sido menos evidenciada quando as culturas de *S. sclerotiorum* estiveram expostas na fase de crescimento micelial do antagonista. Houve maior esporulação de *T. lentiforme* CEN1416, fato não relacionado com melhor capacidade de inibir *S. sclerotiorum*, por COVs.

Palavras-chave: antagonismo, controle biológico, esporulação, mofo-branco.

Introdução

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary tem sido relatado causando a doença mundialmente conhecida como mofo-branco, em diversas culturas (Derbyshire et al., 2017). Potenciais epidemias podem se desenvolver a partir da germinação, tanto miceliogênica como carpogênica, de estruturas de sobrevivência, os escleródios, presentes no solo ou introduzidos em meio às sementes (Gupta & Singh, 2017).

O controle químico do mofo-branco é influenciado pela busca de resultado rápido, de forma a impedir a formação de escleródios e o consequente avanço da doença no campo. Entretanto, tal prática tem levado à seleção de isolados resistentes do patógeno, fato que compromete a eficiência desse método de controle (Mao et al., 2018). O controle biológico é visto como opção e/ou complementação ao uso dos fungicidas sintéticos (Zeng et al., 2012; Haddad et al., 2017)

O gênero *Trichoderma* Persoon, correspondente à fase assexuada do ascomiceto *Hipocrea*, com ocorrência no solo e na rizosfera de várias plantas (Contreras-Cornejo et al., 2014; Nieto-Jacobo et al., 2017). Esses fungos vêm despertando interesse para estudos na micologia básica e aplicada desde a década de 1930 (Weindling, 1932), pelo fato de várias de suas espécies apresentarem potencial como agentes de controle biológico. Produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) constitui um dos modos de ação pelos quais *Trichoderma* spp. atuam contra fitopatógenos (Srivastava et al., 2016; O'Brien 2017).

Compostos orgânicos voláteis são substâncias hidrofóbicas de baixa massa molecular que podem evaporar facilmente em temperatura e pressão ambiente, podendo desempenhar importante papel na comunicação de longa distância entre organismos (Effmert et al., 2012). Tais compostos pertencem a diferentes classes químicas, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois, cetonas, lactonas, ésteres entre outras (Schenkel et al., 2015). Diversos estudos mostram que COVs emitidos por *Trichoderma* spp. são capazes de inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos (Lopes et al., 2012; Cai et al., 2013; Chen et al., 2016; Ojaghian et al., 2019).

A produção de COVs por *Trichoderma* é bastante diversificada qualitativamente e também quantitativamente (Lee et al., 2016; Guo et al., 2019). Essa diversidade está relacionada a vários fatores abióticos, como temperatura, umidade e substrato, e também a fatores bióticos, como espécie e idade da colônia. Por se tratar de um organismo vivo, *Trichoderma*, quando aplicado no campo, requer um tempo para se estabelecer no ambiente para, então, exercer ação de biocontrole. Sendo assim, é razoável pensar que a inibição do crescimento micelial de fitopatógenos por COVs de *Trichoderma* torne-se mais eficaz após o estabelecimento e pleno funcionamento do metabolismo do antagonista. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar, *in vitro*, a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 por COVs de seis linhagens de *Trichoderma* em fases distintas de desenvolvimento do agente de biocontrole.

Material e Métodos

Origem e manutenção das linhagens

Foram utilizadas seis linhagens de *Trichoderma* pertencentes às espécies *T. koningiopsis* CEN1386, *T. asperelloides* CEN1397, *T. longibrachiatum* CEN1399, *T. lentiforme* CEN1416, *T. peberdyi* CEN1389 e *T. azevedoi* CEN1241 contra o patógeno *S. sclerotiorum* CEN1147, todas pertencentes à Coleção de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil. As culturas, mantidas em nitrogênio líquido (N₂) foram reativadas em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) sintético e mantidas em tubos de ensaio com tampa de rosca, contendo 20 mL do mesmo meio, à temperatura de 6 °C. Para cada experimento, amostras retiradas desses tubos de ensaio foram cultivadas por cinco dias em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 20 mL de meio BDA.

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp. em fase de crescimento micelial (CM)

Placas de Petri (150 x 25 mm) contendo 60 mL de meio BDA solidificado, receberam ao centro discos de BDA com micélio (5 mm Ø) colonizado por *Trichoderma*. Da mesma forma, em outra placa de Petri foi colocado um disco de BDA com micélio (5 mm Ø) colonizado pelo patógeno. As placas contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas formando uma atmosfera compartilhada. A distância entre as culturas foi de aproximadamente 28,6 mm. O conjunto foi selado com filme de parafina plástica e envolvido com plástico transparente, de forma que as placas contendo o patógeno ficassem na posição superior (Dennis & Webster, 1971). O tratamento controle foi representado por placas também com *S. sclerotiorum*, mas sem o antagonista na parte inferior. O sistema foi mantido à temperatura entre 23 e 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após a total colonização do meio BDA nos tratamentos controles, tomaram-se as medidas do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess®).

Os valores médios de diâmetro das colônias foram integralizados como AACCM (Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial), por meio da fórmula $AACCM = \sum [(y_1 + y_2) / 2] \times (t_2 - t_1)$, em que y_1 e y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento e repetido duas vezes.

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp. em fase de esporulação (ES)

Placas de Petri (150 x 25 mm) contendo 60 mL de meio BDA solidificado, receberam ao centro, um disco de BDA (5 mm Ø) colonizado por *Trichoderma*. Após 96 horas, placas de Petri de tamanho correspondente contendo 60 mL de BDA, receberam ao centro, um disco de BDA (5 mm Ø) colonizado pelo patógeno. Placas contendo o antagonista em fase de esporulação foram sobrepostas com placas contendo o patógeno, formando uma atmosfera compartilhada. A distância entre as culturas foi de aproximadamente 28,6 mm. O conjunto foi selado com filme de parafina plástica e envolvido com plástico transparente, de forma que as placas contendo o patógeno ficassem na posição superior. O tratamento controle foi representado por placas de Petri com *S. sclerotiorum*, mas sem o antagonista na parte inferior. As culturas assim preparadas foram incubadas nas mesmas condições descritas acima. Procederam-se as avaliações conforme o item anterior. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento e repetido duas vezes.

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp. em pareamento com o patógeno (PP)

Placas de Petri (150 x 25 mm) contendo 60 mL de meio BDA solidificado, receberam em uma das extremidades um disco de BDA (5 mm Ø) colonizado por *Trichoderma*. De maneira similar, o patógeno foi posicionado no lado oposto ao antagonista. As culturas foram incubadas à temperatura entre 23 e 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 96 horas, placas de tamanho correspondente contendo 60 mL de BDA, receberam ao centro, um disco de BDA (5 mm Ø) colonizado pelo patógeno, sendo então sobrepostas às placas contendo o pareamento de culturas, formando uma atmosfera compartilhada. A distância entre as culturas foi de aproximadamente 28,6 mm. O conjunto foi selado com filme de parafina plástica e envolvido com plástico transparente, de forma que as placas contendo o patógeno ficassem na posição superior. O tratamento controle foi representado por placas de Petri com *S. sclerotiorum*, mas com apenas BDA na parte inferior. As culturas assim preparadas foram incubadas nas mesmas condições descritas acima. Procederam-se as avaliações conforme descrito no item anterior. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento e repetido duas vezes.

Quantificação dos esporos produzidos pelas linhagens de *Trichoderma* em fase ES

Para a quantificação dos esporos, 20 mL de água destilada esterilizada (ADE) foram adicionadas em cada placa de Petri, seguido da liberação dos esporos com alça de Drigalsky. Em seguida, os esporos foram recolhidos em beakers e filtrados em gaze esterilizada. As suspensões de esporos foram examinadas em câmara de Neubauer e o número de esporos, determinado por contagens (cinco amostragens/placa).

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). Realizou-se também análise de regressão e desdobramento estatístico da interação: AACCM x fases de desenvolvimento. Todas essas análises foram realizadas com o auxílio do *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

Resultados

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp. em fase de crescimento micelial (CM)

Os COVs emitidos pelas linhagens de *Trichoderma* utilizadas neste estudo inibiram o crescimento de colônias de *S. sclerotiorum* nas três condições experimentais ($P < 0,05$). O crescimento micelial de *S. sclerotiorum* exposto ou não à *Trichoderma* spp. na fase de CM, ajustou-se a modelos de regressão quadráticos com R^2 superiores à 0,98 (Figura 1).

Quando patógeno e antagonista foram expostos simultaneamente, a taxa de crescimento micelial do patógeno foi inibida em relação ao controle após 72 horas de exposição na maioria das linhagens testadas. A linhagem CEN1241 foi a que apresentou maior efeito inibitório ao crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (Figura 1).

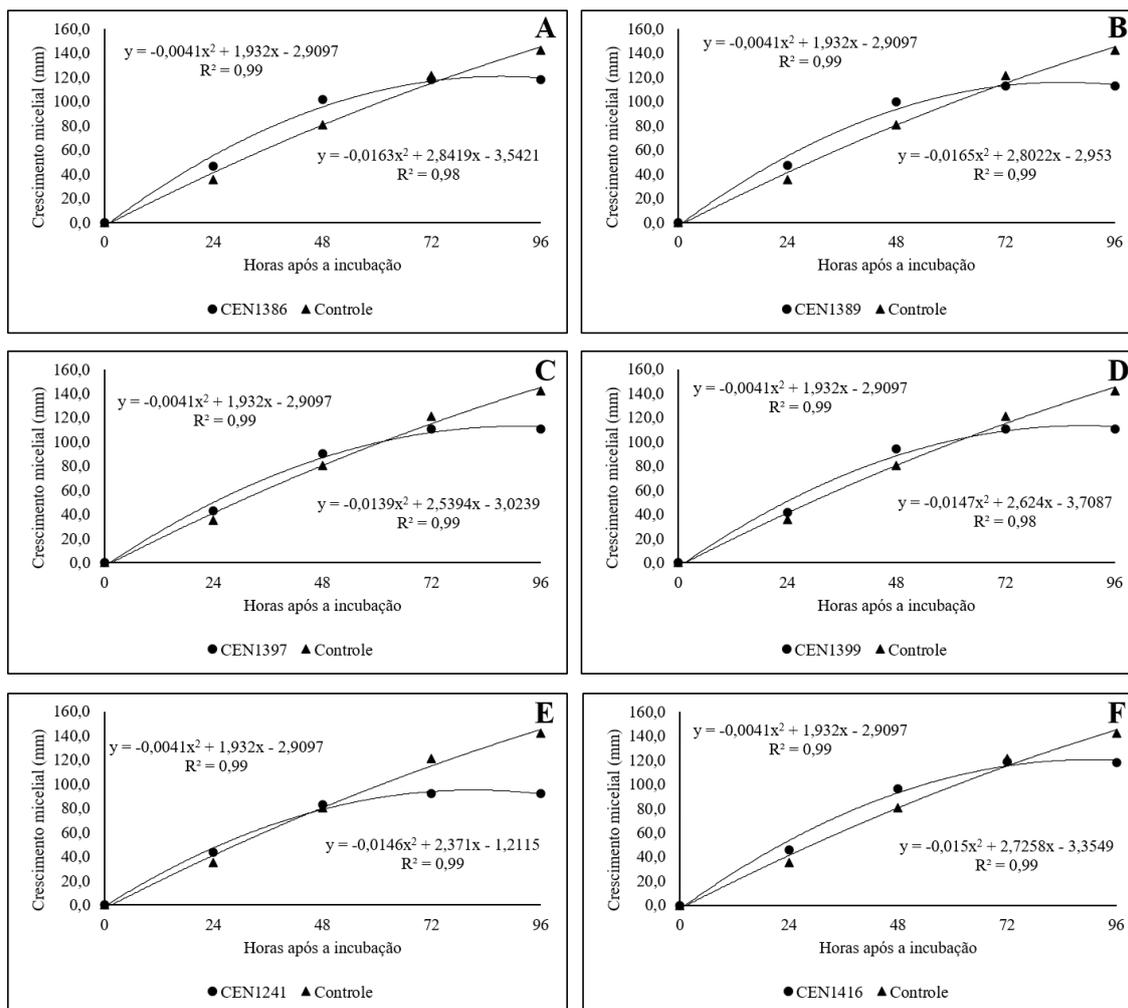


Figura 1. Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em fase de crescimento micelial. **A:** *T. koningiopsis* CEN1386, **B:** *T. peberdyi* CEN1389, **C:** *T. asperelloides* CEN1397, **D:** *T. longibrachiatum* CEN1399, **E:** *T. azevedoi* CEN1241, **F:** *T. lentiforme* CEN1416.

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp. em fase de esporulação (ES)

Quando exposto aos COVs emitidos por colônias de *Trichoderma* spp. na fase ES, constatou-se o aumento da inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, em comparação com as culturas em fase CM. O crescimento micelial ajustou-se a modelos de regressão quadráticos (Figura 2). Todas as linhagens apresentaram capacidade de inibir o crescimento micelial do patógeno, desde as primeiras horas de cultivo, quando comparadas ao controle.

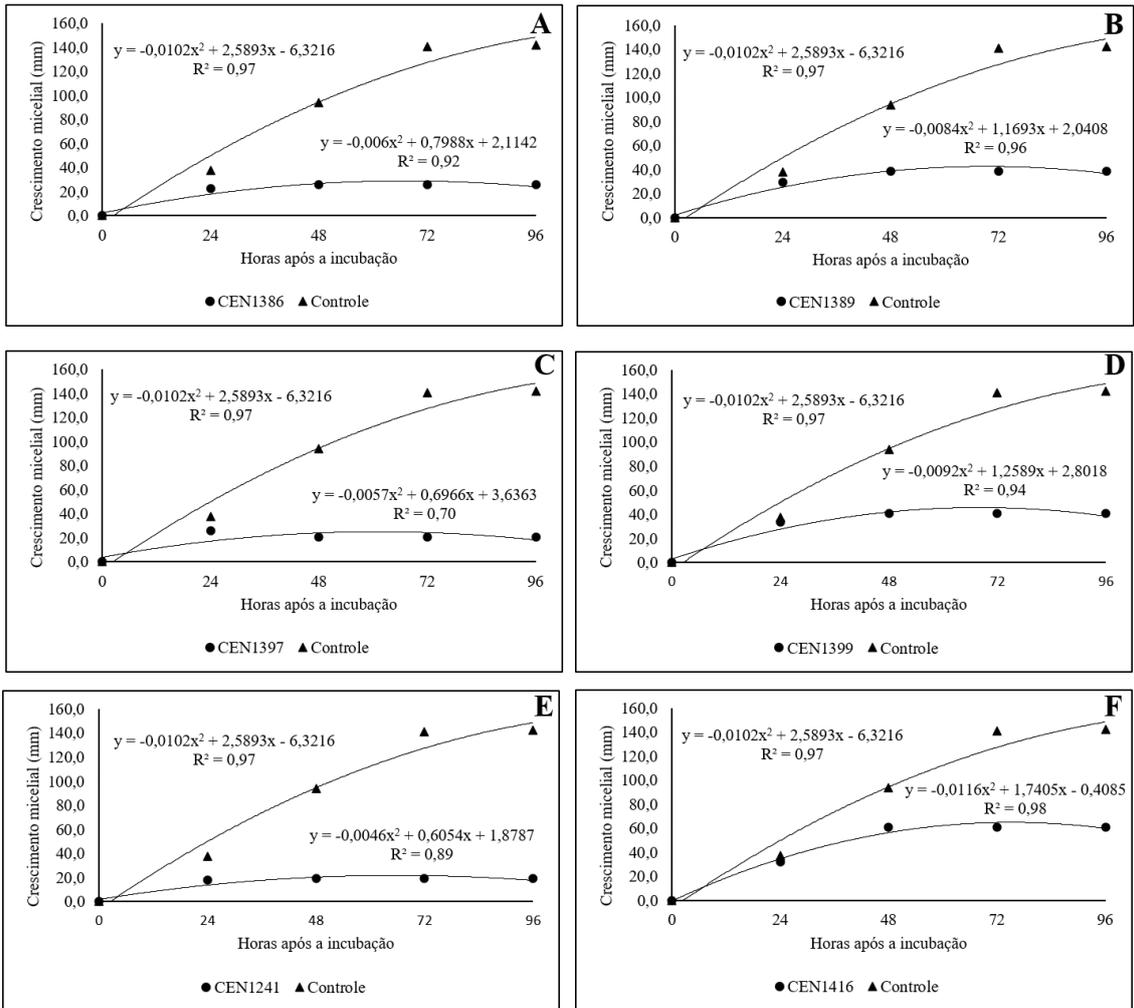


Figura 2. Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em fase de esporulação. **A:** *T. koningiopsis* CEN1386, **B:** *T. peberdyi* CEN1389, **C:** *T. asperelloides* CEN1397, **D:** *T. longibrachiatum* CEN1399, **E:** *T. azevedoi* CEN1241, **F:** *T. lentiforme* CEN1416.

As linhagens de *Trichoderma* com maiores taxas de inibição foram *T. azevedoi* CEN1241, *T. koningiopsis* CEN1386 e *T. asperelloides* CEN1397. Estas apresentaram taxas de inibição do crescimento micelial do patógeno superiores a 80% (Figura 3), indicando que tais linhagens atuaram diretamente na inibição de crescimento do agente fitopatogênico, por ação dos COVs.

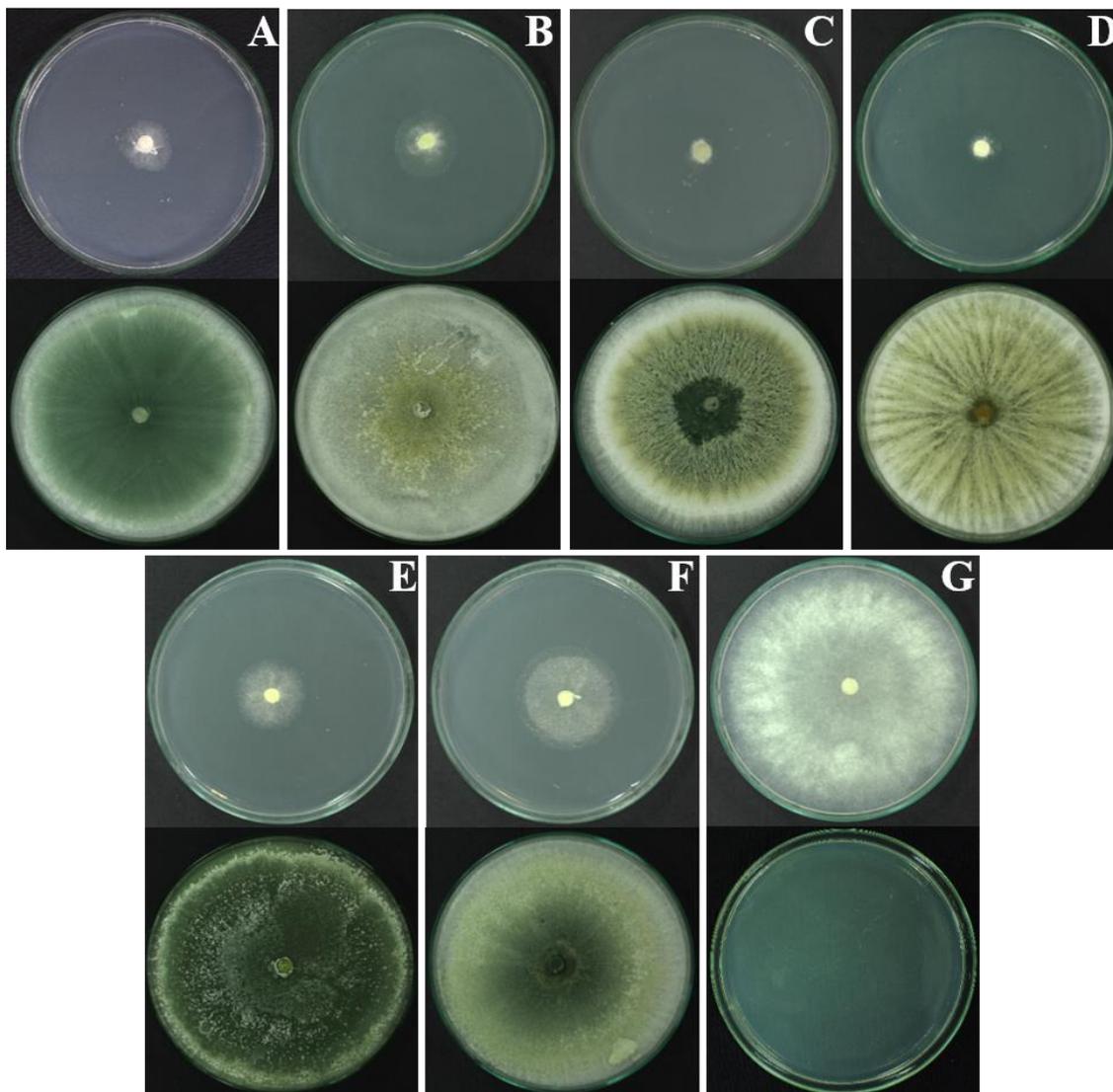


Figura 3. Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em fase de esporulação. **A:** *T. koningiopsis* CEN1386, **B:** *T. peberdyi* CEN1389, **C:** *T. asperelloides* CEN1397, **D:** *T. azevedoi* CEN1241, **E:** *T. longibrachiatum* CEN1399, **F:** *T. lentiforme* CEN1416, **G:** Controle.

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos COVs de *Trichoderma* spp. em pareamento com o patógeno (PP)

Em relação à exposição em condição de PP, esta foi a que apresentou os maiores índices de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*. Novamente, o crescimento micelial ajustou-se à modelos de regressão quadráticos (Figura 4).

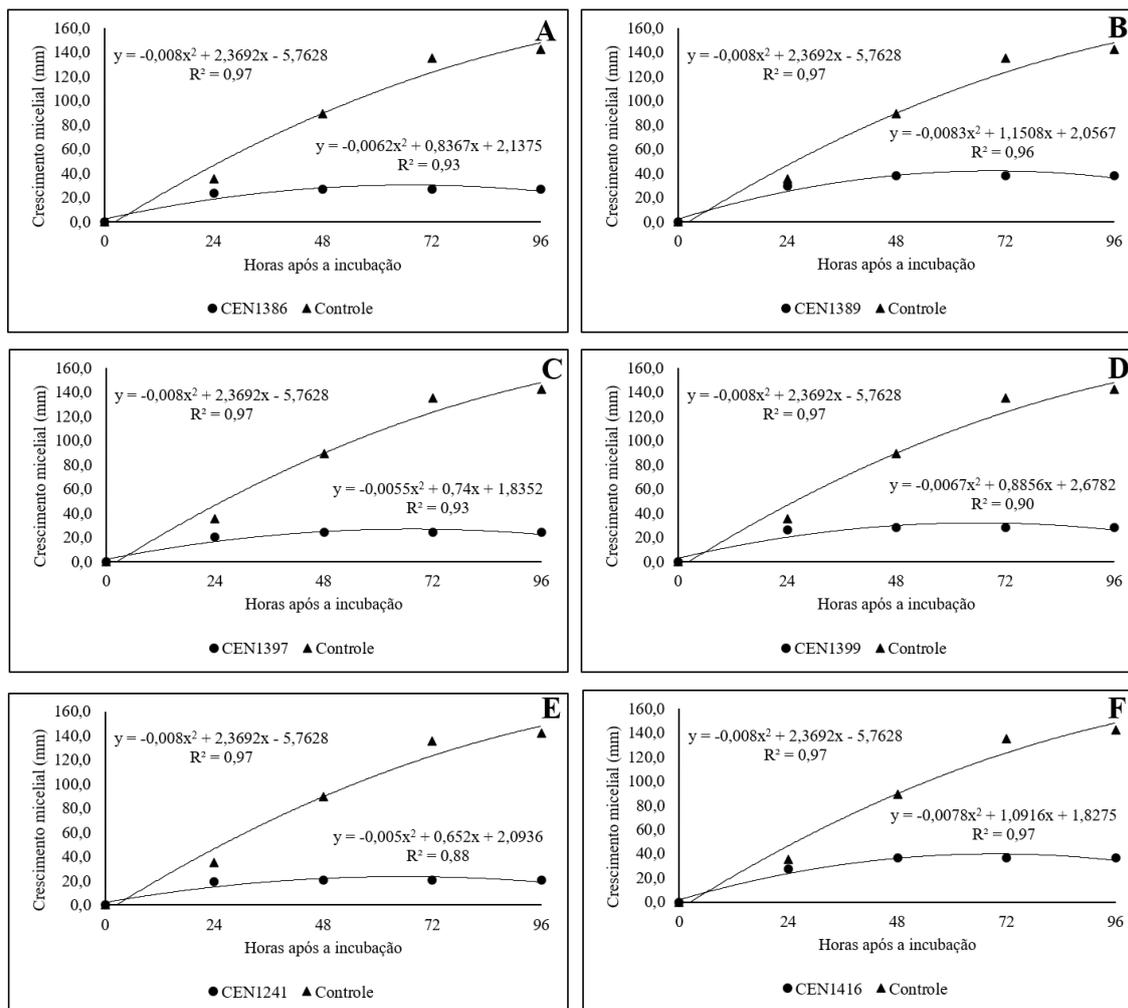


Figura 4. Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em pareamento com o patógeno. **A:** *T. koningiopsis* CEN1386, **B:** *T. peberdyi* CEN1389, **C:** *T. asperelloides* CEN1397, **D:** *T. longibrachiatum* CEN1399, **E:** *T. azevedoi* CEN1241, **F:** *T. lentiforme* CEN1416.

Foi inserido no ensaio de PP um tratamento contendo apenas patógeno em ambas as extremidades da atmosfera compartilhada, demonstrando que os diâmetros das colônias do patógeno foram semelhantes (Figura 5H). Entretanto, as colônias desse tratamento apresentaram menor diâmetro em relação ao tratamento controle, apenas com o meio BDA (Figura 5G). Com base nessa observação, infere-se a existência de uma pequena concorrência por oxigênio dentro da atmosfera compartilhada. Dessa maneira, o mecanismo inibitório do crescimento micelial do patógeno poderia não ser apenas pelo mecanismo de antibiose, mas também por competição pelo oxigênio. Estudos futuros devem ser desenvolvidos para melhor avaliar esse achado.

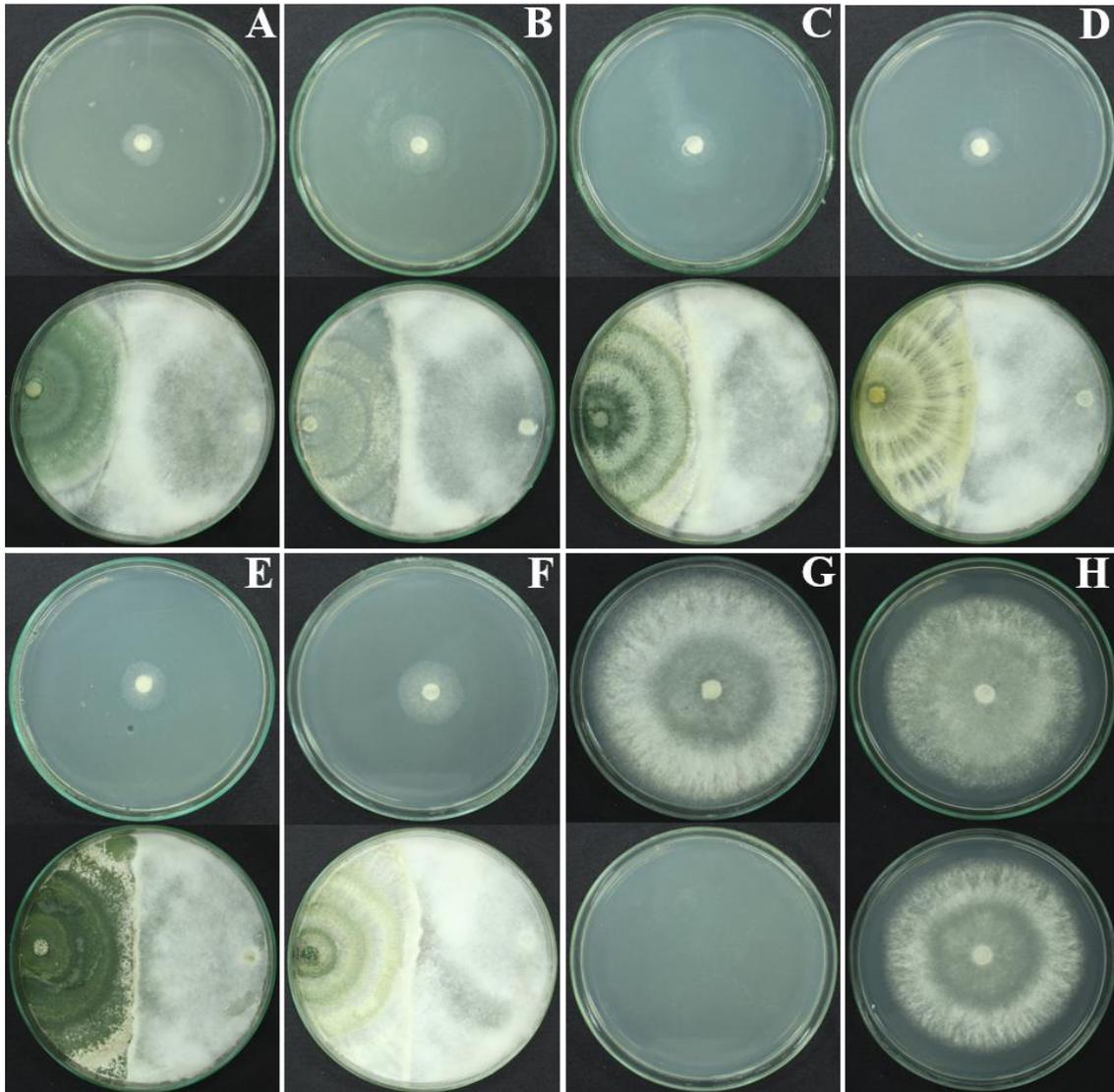


Figura 5. Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. em pareamento com o patógeno. **A:** *T. koningiopsis* CEN1386, **B:** *T. peberdyi* CEN1389, **C:** *T. asperelloides* CEN1397, **D:** *T. azevedoi* CEN1241, **E:** *T. longibrachiatum* CEN1399, **F:** *T. lentiforme* CEN1416, **G:** Controle (*S. sclerotiorum* x BDA), **H:** Controle (*S. sclerotiorum* x *S. sclerotiorum*).

Em relação ao desdobramento estatístico, houve interação significativa para condições de exposição testadas, ao comparar dados de AACCM do patógeno. A linhagem CEN1241 foi a que exibiu a melhor ação antifúngica, proporcionando os menores valores de AACCM em todas as condições de exposição ao patógeno (Tabela 1). As outras linhagens apresentaram atividade inibitória com valores de AACCM menores do que o controle, com exceção da fase de CM.

Tabela 1. Valores médios de área abaixo do crescimento micelial (AACCM) de *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto aos COVs emitidos por *Trichoderma* spp. em diferentes fases de desenvolvimento: crescimento micelial (CM), esporulação (ES), pareado com o patógeno (PP) e esporulação das linhagens de *Trichoderma*.

Linhagens	AACCM (mm ²) ⁽¹⁾			Esporulação
	CM	ES	PP	($\times 10^8$ conídios.mL ⁻¹) ⁽¹⁾
CEN1241	5829,33aB	1362,33aA	1465,70aA	3,98 \pm 0,12d
CEN1386	7229,93cB	1806,23aA	1893,63bA	3,93 \pm 0,35d
CEN1389	7012,23cB	2668,46bA	2625,00cA	0,30 \pm 0,04e
CEN1397	6654,36bB	1872,46aA	1676,20aA	5,93 \pm 0,85c
CEN1399	6739,53cB	2858,83bB	1994,76bA	8,83 \pm 0,45b
CEN1416	7110,73cC	4052,60cB	2493,83cA	12,01 \pm 1,01a
Controle	6958,20cA	7785,60dB	7508,23dB	-
Média	6790,61C	3200,93B	2808,05A	-
C.V. (%)	2,59	9,52	7,05	11,07

⁽¹⁾ Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

No que diz respeito às condições de exposição, pareamento de culturas foi a que apresentou a maior média de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, cujos valores médios foram estatisticamente superiores às demais condições avaliadas (Tabela 1). Já em relação ao número de esporos produzidos por *Trichoderma* spp., a linhagem CEN1416 foi estatisticamente superior às demais (Tabela 1).

Discussão

Antibiose exercida por COVs é um importante mecanismo de ação de *Trichoderma* e tem sido utilizada como um dos parâmetros para a seleção de linhagens desses fungos como agentes de biocontrole (Castillo et al., 2011; Zeilinger et al., 2016; Kaddes et al., 2019). Em condições simultâneas de crescimento do antagonista e patógeno, outros estudos já mostraram a capacidade dos COVs de *Trichoderma* spp. em inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (Karimi & Altinok, 2019; Ojaghian et al., 2019). Os COVs inibidores de fitopatógenos são derivados de diferentes vias do metabolismo fúngico e consistem em uma ampla gama de compostos, incluindo pironas, terpenos, álcoois, cetonas, xantonas, alcanos, alcenos e fenóis (Korpi et al., 2009; Zeilinger et al., 2016; Kaddes et al., 2019).

Ao contrário dos fungicidas sintéticos que logo após a aplicação no campo já conseguem agir sobre os patógenos (McGrath, 2004; Brauer et al., 2019), os fungicidas biológicos requerem um tempo para se estabelecerem no solo (fase vegetativa e fase reprodutiva), antes de iniciarem sua atividade, por seus diversos mecanismos de ação contra os patógenos (Machado et al., 2012; Mutawila et al., 2016; O'Brien, 2017). A

transição do crescimento vegetativo para a fase de conidiação, em muitos fungos, é marcada pelo aumento da produção de metabólitos secundários (Nemcovic et al., 2008). Esse foi o ponto chave de observação para a nossa pesquisa, no tocante à fase de esporulação de *Trichoderma*.

Alguns patógenos, como *S. sclerotiorum*, possuem rápido crescimento vegetativo (Smolińska & Kowalska, 2018). Isso pode levar a resultados pouco satisfatórios ao agente de biocontrole em avaliações com condições de cultivos simultâneos com o patógeno. Neste trabalho, observou-se que quando o patógeno é incubado em presença de *Trichoderma* na fase ES, seu crescimento micelial é mais eficientemente inibido (Figura 2). Isso pode explicar os bons resultados encontrados na literatura com aplicações preventivas do agente de biocontrole, por exemplo, na forma de tratamento de sementes (Carvalho et al., 2011; Haddad et al., 2017; Macena et al., 2019; Moya et al., 2020).

Até a execução deste trabalho não foram encontrados na literatura resultados obtidos com a metodologia de cultura pareada com o patógeno, sendo este o primeiro estudo com essa abordagem. Pelos resultados obtidos nos ensaios de PP, infere-se que *Trichoderma* ao ser submetido ao estresse do antagonismo contra o patógeno, poderia alterar seu perfil de emissão de COVs, potencializando sua capacidade de inibir o crescimento micelial em *S. sclerotiorum* pelo mecanismo de antibiose. Efetivamente os COVs nessa condição experimental foram capazes de reduzir acentuadamente o crescimento micelial do patógeno (Figura 5). De acordo com Larsen & Frisvad (1995), o perfil de COVs é característico para cada espécie de fungo, porém pode ser alterado com as condições nutricionais do substrato de cultivo, idade da cultura e durante interação antagônica com outros fungos (Bruce et al., 1996; Hynes et al., 2007). No estudo de Guo et al. (2019) foi constatado um aumento na emissão total dos COVs de *T. hamatum* em confronto direto com *Laccaria bicolor*, sendo identificados 19 novos COVs, por outro lado, observou-se redução na emissão dos COVs por *T. harzianum*. Já Mutawila et al. (2016) mostraram que o COV 6-pentil- α -pirona (6PAP) aumentou significativamente em *T. atroviride* em co-cultura com o patógeno *Neofusicoccum parvum*. O 6PAP é um conhecido composto antimicrobiano produzido por espécies de *Trichoderma* (Vinale et al., 2006; El-Hasan et al., 2007; Jelén et al., 2014).

Em todas as condições experimentais utilizadas no presente trabalho, os menores valores de AACCM foram obtidos por *T. azevedoi* CEN1241. De maneira similar a este estudo, outros trabalhos também demonstraram que a porcentagem de inibição micelial de fitopatógenos por COVs de *Trichoderma* pode ser muito diversificada entre as espécies

do agente de biocontrole (Amin et al., 2010; Mesquita et al., 2017; Ojaghian et al.; 2019). Isso pode estar relacionado ao perfil de COVs emitidos por cada espécie/linhagem de *Trichoderma* (Guo et al., 2019). A atmosfera compartilhada entre os fungos, formada a partir da metodologia da placa invertida (Dennis & Webster, 1971), pode induzir sinais específicos de comunicação e defesa entre eles, o que pode resultar nas emissões diversificadas dos COVs do agente de biocontrole em cada condição (Cooney & Lauren, 1998; Guo et al., 2019). Esses resultados indicam a complexidade dos eventos que ocorrem durante o controle biológico por *Trichoderma* (Lopes et al., 2012).

Independente da linhagem, atenção especial deve ser dada ao período em que se observa o início efetivo da inibição micelial na condição de CM. A Figura 1 mostra que os índices efetivos de inibição micelial de *S. sclerotiorum* começam ser aumentados após 72 horas de crescimento de *Trichoderma*. Jelén et al. (2014) mostraram que *T. atroviride* aumenta expressivamente a produção de diferentes COVs como 2-heptanona, 2-nonanona, 1-octeno-3-ol e 6PAP, após aproximadamente 96 horas de crescimento em meio BDA. Isso fornece indícios da necessidade real da colônia estar em pleno desenvolvimento para obtenção de melhores resultados de inibição do patógeno, por COVs de *Trichoderma*.

Ao final do ensaio na condição ES, tentamos relacionar o melhor potencial de inibição micelial com o número de conídios produzidos, relativo a cada uma das linhagens de *Trichoderma*. Entretanto, *T. lentiforme* CEN1416 que demonstrou produzir a maior quantidade de conídios, foi o menos eficaz em inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Foi relatado por Nemcovic et al. (2008) um aumento na produção dos COVs 1-octen-3-ol, 3-octanol e 3-octanona por colônias conidantes de *T. atroviride*. Esses autores sugerem que a produção de alguns COVs está ligada ao processo de formação de conídios, entretanto não investigaram essa relação. Os resultados encontrados no presente estudo, nos leva a acreditar que a inibição micelial do patógeno parece estar mais relacionada ao perfil qualitativo dos COVs emitidos por *Trichoderma* spp. Porém é válido ressaltar que linhagens que possuem boa capacidade de esporulação, mesmo que não sejam eficazes inibidoras por COVs, também podem ser selecionadas como agentes de biocontrole, pois irão agir por outro mecanismo de ação, como o hiperparasitismo.

Conclusão

Em todas as condições experimentais os COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 superaram estatisticamente aos das demais linhagens, no que se refere a inibição micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147.

A inibição micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 por COVs emitidos por *Trichoderma* spp. foi mais evidenciada ao se utilizar as metodologias ES e PP.

A maior produção de conídios de *T. lentiforme* CEN1416 não está relacionada à maior capacidade de inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147, pela produção de COVs.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado concedidas.

Referências

- Amin F, Razdan VK, Mohiddin FA, Bhat KA, Sheikh PA. 2010. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in-vitro*. *Journal of Phytology*, 2: 34-37.
- Brauer VS, Rezende CP, Pessoni AM, De Paula RG, Rangappa KS, Nayaka SC, Gupta VK, Almeida. 2019. Antifungal agents in agriculture: friends and foes of public health. *Biomolecules*, 9: 1-21.
- Bruce A, Kunzewicz A, Wheatley RE. 1996. Influence of culture age on the volatile organic compounds produced by *Trichoderma aureoviride* and associated inhibitory effects on selected wood decay fungi. *Material und Organismen*, 30: 79-84.
- Cai F, Yu G, Wang P, Wei Z, Fu L, Shen Q, Chen W. 2013. Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 106-113.
- Carvalho DDC, Mello SCM, Lobo Júnior M, Geraldine AM. 2011. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 822-828.

- Castillo FDH, Padilla AMB, Morales GG, Siller MC, Herrera RR, Gonzales CNA, Reyes FC. 2011. *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6: 410-417.
- Chen JL, Sun SZ, Miao CP, Wu K., Chen YW, Xu LH, Guan HL, Zhao LX. 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. Journal of Ginseng Research, 40: 315-324.
- Conteras-Cornejo, HA, Macías-Rodríguez, L, Alfaro-Cuevas, R, López-Bucio, J. 2014. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. Molecular Plant-Microbe Interactions, 27: 503-514.
- Cooney JM, Lauren DR. 1998. *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. Letters in Applied Microbiology, 27: 283-286.
- Dennis C, Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotic. Transactions British Mycological Society, 57: 41-48.
- Derbyshire M, Denton-Giles M, Hegedus D, Seifbarghy S, Rollins J, Kan J, Seidl MF, Faino I, et al. 2017. The complete genome sequence of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* reveals insights into the genome architecture of broad host range pathogens. Genome Biology and Evolution, 9: 593-618.
- Effmert, U, Kalderás, J, Warnke, R, Piechulla, B. 2012. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. Journal of Chemical Ecology, 38: 665-703.
- El-Hasan F, Walker F, Schone J, Buchenauer H. 2007. Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. Journal of Plant Diseases and Protection, 114: 62-68.
- Ferreira, DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, 35: 1039-1042.
- Guo Y, Ghirardo A, Weber B, Schnitzler JP, Benz JP, Rosenkranz M. 2019. *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. Frontiers in Microbiology, 10: 1-15.

- Gupta, M, Singh, K. 2017. Carpogenic germination and viability studies of Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* causing lettuce drop. International Journal Current Microbiology and Applied Science, 6: 2971-2979.
- Haddad PE, Leite LG, Lucon CMM, Harakava R. 2017. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 52: 1140-1148.
- Hynes J, Müller CT, Jones TH, Boddy L. 2007. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. Journal of Chemical Ecology, 33: 43-57.
- Jelén H, Błaszczyk L, Chełkowski J, Rogowicz K, Strakowska J. 2014. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. Mycological Progress, 13: 589-600.
- Kaddes A, Fauconnier ML, Sassi K, Nasraoui B, Jijakli M-H. 2019. Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. Molecules, 24: 1-16.
- Karimi K, Altinok HH. 2019. *In vitro* antifungal activity of *Trichoderma harzianum* e pgpr strain against gray and with mold of eggplant. Fresenius Environmental Bulletin, 28: 6166-6173.
- Korpi A, Jarnberg J, Pasanen AL. 2009. Microbial Volatile Organic Compounds. Critical Reviews in Toxicology, 39: 139-193.
- Larsen TO, Frisvad JC. 1995. Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. Mycological Research, 99: 1167-1174.
- Lee S, Yap M, Behringer G, Hung R, Bennett W. 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. Fungal Biology and Biotechnology, 3: 1-16.
- Lopes FAC, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandão RS, Monteiro VN, Lobo Júnior M, Coelho ASG, Ulhoa CJ, et al. 2012. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian cerrado and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. Fungal Biology, 116: 815-824.
- Macena AMF, Kobori NN, Mascarin GM, Vida JB, Hartman G. 2020. Antagonism of *Trichoderma*-based biofungicides against Brazilian and North American isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion of soybean. BioControl, 65: 235-246.

- Machado DFM, Parzianello FR, Da Silva ACF, Antonioli ZI. 2012. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 35: 274-288.
- Mao XW, Li JS, Chen YL, Song XS, Duan YB, Wang JX, Chen CJ, Zhou MG, Hou YP. 2018. Resistance risk assessment for fluazinam in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144: 27-35.
- McGrath MT. 2004. What are Fungicides? Available in: <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/Fungicides.aspx>. Acessado em 17 de janeiro de 2020.
- Mesquita DCM, Ferreira FA, Martins I, Mello SCM, Carvalho DDC (2017) Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* do feijão comum. *Agropecuária Científica no Semiárido* 13:1-4.
- Moya P, Barrera V, Cipollone J, Bedoya C, Kohan L, Toledo A, Sisterna M. 2020. New isolates of *Trichoderma* spp. as biocontrol and plant growth-promoting agents in the pathosystem *Pyrenophora teres*-barley in Argentina. *Biological Control*, 141: 1-8.
- Mutawila C, Vinale F, Halleena F, Lorito M, Mostert L. 2016. Isolation, production and *in vitro* effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathology*, 65: 104-113.
- Nemcovic M, Jakubikova L, Viden I, Farkas V. 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 284: 231-236.
- Nieto-Jacobo MF, Steyaert JM, Salazar-Badillo FB, Vi Nguyen D, Rostás M, Braithwaite M, De Souza JT, Jimenez-Bremont JF, et al. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1-18.
- O'Brien PA. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46: 293-304.
- Ojaghian S, Wang L, Xie GL, Zhang JZ. 2019. Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 136: 1-6.

- Schenkel D, Lemfack, MC, Piechulla B, Splivallo R. 2015. A meta-analysis approach for assessing the diversity and specificity of belowground root and microbial volatiles. *Frontier Plant Science*, 6: 1-11.
- Smolińska U, Kowalska B. 2018. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* - a review. *Journal of Plant Pathology*, 100: 1-12.
- Srivastava M, Kumar V, Shahid M, Pandey S, Singh A. 2016. *Trichoderma* a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 11: 310-316.
- Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalberti EL, Lorito M, Sivasithamparam K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 143-148.
- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22: 837-845.
- Zeilinger S, Grubera S, Bansal R, Mukherjee PK. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* e chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30: 74-90.
- Zeng W, Kirk W, Hao J. 2012. Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control*, 60: 141-147.

Capítulo 3

Respostas transcricionais de *Sclerotinia sclerotiorum* exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi*

Resumo

A doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum* é conhecida como mofo-branco, podridão-de-esclerotinia ou murcha-de-esclerotinia. O uso de fungos antagonistas, como os do gênero *Trichoderma*, tem se mostrado uma opção de controle para o mofo-branco. Até a execução desse estudo, apenas um trabalho mostrou respostas transcricionais em *S. sclerotiorum* após exposição aos COVs de *Trichoderma*. O objetivo desse estudo foi identificar alterações no perfil de expressão de *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241. Os ensaios foram realizados em laboratório por meio de testes de placa de Petri invertida, seguidos da extração do RNA e análise de RNA-Seq. Os COVs reduziram em, aproximadamente, 32% o crescimento micelial do patógeno em comparação ao controle. Cerca de 840 transcritos foram identificados como diferencialmente expressos entre os grupos controle e tratamento. Dentre os que apresentam maior diferença entre os grupos expresso pelo log de *fold change*, destacaram-se 25 transcritos, os quais foram divididos em 8 categorias funcionais relacionadas à produção de melanina, parede celular, defesa, respiração celular, transporte transmembrana, patogenicidade, incompatibilidade vegetativa e resposta ao estresse. Demonstrou-se também que os COVs de *T. azevedoi* CEN1241 foram capazes de reduzir a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*. Estes resultados indicam a complexidade dos eventos que ocorrem durante o controle biológico por *Trichoderma* e reforçam o potencial de COVs emitidos por *Trichoderma* para aplicação biotecnológica no controle de *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: mofo-branco, RNA-Seq, transcritoma, germinação carpogênica.

Introdução

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é o fitopatógeno causador da doença denominada mofo-branco, podridão-de-esclerotinia ou murcha-de-esclerotinia, de gravidade reconhecida para a agricultura mundial, devido à capacidade de infectar mais de 400 espécies de plantas, pertencentes às famílias Solanaceae, Brassicaceae, Umbeliferae,

Malvaceae, Chenopodiaceae, Rosaceae, Fabaceae, Asteraceae entre outras (Boland & Hall, 1994; Derbyshire et al., 2017; Smolińska & Kowalska, 2018). Esse fungo foi relatado pela primeira vez no ano de 1861 infectando plantas de girassol (Purdy, 1979), e pode permanecer viável no solo por até 10 anos na forma de estruturas de sobrevivência, os escleródios (Adams & Ayers, 1979; Choi et al., 2017).

A germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* pode ocorrer de forma miceliogênica (assexuada), através da produção de hifas vegetativas, ou carpogênica (sexuada), mediante a produção de um corpo de frutificação denominado apotécio (Le Torneau, 1979). A germinação carpogênica é responsável pela maioria das infecções no campo, pois o apotécio no solo pode liberar milhões de ascósporos no ar (Wu et al., 2007).

A longevidade dos escleródios no solo e a alta capacidade de produção de esporos sexuais tem dificultado o controle da doença. Esses fatores contribuíram para o uso constante e elevado de fungicidas sintéticos pelos agricultores. No entanto, o uso contínuo de tais produtos tem contribuído para o surgimento de isolados resistentes (Wang et al., 2015). Além disso, a preocupação quanto aos efeitos dos fungicidas sintéticos no ambiente e seus resíduos nos alimentos vem aumentando o interesse dos pesquisadores pelo controle biológico como alternativa para os agricultores no controle de doenças, a exemplo do crescente uso de fungos do gênero *Trichoderma* (O'Brien, 2017; Nawrocka et al., 2018; Macena et al., 2020).

Trichoderma Persoon apresenta potencial para o controle de fitopatógenos e para a promoção de crescimento das plantas devido aos seus diversos mecanismos de ação (Lee et al., 2016; Srivastava et al., 2016; Haddad et al., 2017). Muitas espécies desse gênero são produtoras de uma diversidade de compostos orgânicos voláteis (COVs). Os COVs pertencem à diferentes classes químicas, que incluem, principalmente, compostos de origem terpênica e derivados de ácidos graxos, os quais podem ter grupos funcionais como álcoois, cetonas, lactonas, compostos aromáticos e ésteres (Schenkel et al., 2015). Alguns estudos têm demonstrado a capacidade de COVs para inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (Castillo et al., 2011; Karimi & Altinok, 2019; Ojaghian et al., 2019). Entretanto, o conhecimento molecular dessa inibição ainda é limitado.

Compreender os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre agente de biocontrole e patógeno é essencial para o estabelecimento de agentes de controle biológico efetivos. Uma das formas de se aumentar o conhecimento acerca dos mecanismos moleculares do controle biológico é explorando o perfil de expressão do

RNA, através da análise do transcrito (Steindorff et al., 2014; Perazzolli et al., 2016; Qiu et al., 2016; Ojaghian et al., 2019). A análise transcritômica de fitopatógenos pode auxiliar na compreensão da patogênese fúngica permitindo, potencialmente, a caracterização de genes expressos em diferentes estágios da infecção ou em diferentes condições experimentais, além de gerar bancos de dados sobre os fitopatógenos, suas hospedeiras e colaborando para um maior entendimento da relação entre esses e os agentes de biocontrole.

Os resultados de RNA-Seq encontrados na literatura sobre a interação *Trichoderma* x *S. sclerotiorum* abordam o contato direto entre antagonista e fitopatógeno ou, ainda, as respostas transcricionais de *S. sclerotiorum* ao longo do tempo de infecção na planta hospedeira. Steindorff et al. (2014), analisaram a expressão gênica de *T. harzianum* crescido em meio mínimo suplementado com glicose 2% ou com 0,5% de parede celular inativada de *S. sclerotiorum*. Shaw et al. (2016), capturando seis diferentes pontos no tempo, compararam perfis transcricionais de *T. hamatum* na interação no solo com *S. sclerotiorum*. Seifbarghi et al. (2017) forneceram uma visão da expressão gênica de *S. sclerotiorum* ao longo do curso de infecção em *Brassica napus*. Recentemente, Westrick et al. (2019) mostraram diferentes comportamentos de *S. sclerotiorum* durante a infecção em plantas de soja.

Até a execução desse estudo, apenas um trabalho relatou respostas transcricionais em *S. sclerotiorum* após exposição aos COVs de *Trichoderma* (Ojaghian et al., 2019), porém os resultados obtidos foram limitados. De acordo com esses autores, quatro genes que codificam a enzima glutationa-S-transferase (GST) foram regulados positivamente. Embora o trabalho mencionado acima tenha explorado a interação de *S. sclerotiorum* com COVs emitidos por *Trichoderma*, reforçamos a necessidade de compreender melhor a resposta desse fitopatógeno quando exposto aos COVs de *Trichoderma*, além de gerar mais informações sobre esse importante mecanismo de ação do antagonista.

O avanço nas técnicas de sequenciamento, com o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (NGS) e o consequente aumento na quantidade de dados gerados a um custo acessível, vem revolucionando as análises transcritômicas, permitindo inclusive, análises quantitativas do perfil de expressão de um organismo e também a amostragem de perfis completos de expressão do RNA de diferentes organismos (Hall, 2007; Wang et al., 2009). Um bom delineamento experimental, com réplicas biológicas e cobertura suficiente para garantir uma análise estatística robusta, permite análises de expressão diferencial entre diferentes amostras, retratando diferentes

condições como tratamentos, linhagens, tempo de crescimento entre outras variáveis (Li et al., 2015; Ji & Sadreyev, 2018).

A disponibilidade de um genoma de referência da espécie estudada é extremamente valiosa na qualidade da análise de RNA-Seq. O mapeamento dos transcritos obtidos experimentalmente no genoma aprimora a capacidade de análise, permitindo a inferência dos transcritos completos dos genes expressos a partir da posição de mapeamento das sequências curtas, geradas pelo sequenciamento de nova geração. O genoma de *S. sclerotiorum* foi sequenciado em 2011 (Amselem et al., 2011) e está disponível na plataforma MycoCosm, do *Joint Genome Institute* do Departamento de Energia dos EUA (JGI-DOE). Recentemente, Derbyshire et al. (2017), com a combinação das ferramentas de sequenciamento em tempo real de molécula única PacBio (*Pacific Biosciences*) que gera sequências longas, e sequenciamento *Illumina*, geraram um genoma de referência mais completo para *S. sclerotiorum*. Utilizando essa versão aprimorada do genoma de referência, identificaram uma série de novos genes que codificam proteínas efetoras. Algumas dessas proteínas são capazes de manipular as defesas das plantas e promover a infecção fúngica (Stergiopoulos & de Wit, 2009; Lo Presti et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar, por RNA-Seq, o perfil de transcritos de *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241, sem contato físico entre ambos. Buscou-se identificar alterações no perfil de expressão de *S. sclerotiorum* CEN1147 em resposta ao efeito inibitório exclusivamente dos COVs emitidos pelo antagonista, corroborando a eficácia dos mesmos no controle do crescimento do fungo fitopatogênico.

Material e Métodos

Origem e manutenção das linhagens

Foi utilizada uma linhagem do agente de controle biológico *T. azevedoi* CEN1241 e uma do patógeno *S. sclerotiorum* CEN1147, ambas pertencentes à Coleção de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil. As culturas mantidas em nitrogênio líquido (N₂) foram reativadas em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) sintético e preservadas em tubos de ensaio com tampa de rosca, contendo 20 mL do mesmo meio, à temperatura de 6 °C. Para cada experimento, amostras retiradas desses

tubos de ensaio foram cultivadas por cinco dias em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 20 mL de meio BDA.

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241

Placas de Petri (150 x 25 mm) contendo 60 mL de meio BDA receberam ao centro discos de BDA com micélio (5 mm Ø) colonizado por *T. azevedoi* CEN1241. Da mesma forma, em outra placa de Petri foi colocado um disco de BDA com micélio (5 mm Ø) colonizado pelo patógeno. As placas contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas, formando uma atmosfera compartilhada. A distância entre as culturas foi de aproximadamente 28,6 mm. O conjunto foi selado com filme de parafina plástica e envolvido com plástico transparente, de forma que as placas contendo o patógeno ficassem na posição superior (Dennis & Webster, 1971). O tratamento controle foi representado por placas também com *S. sclerotiorum*, mas sem o antagonista na parte inferior. O sistema foi mantido à temperatura entre 23 e 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Ao final do ensaio, tomaram-se medidas do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess[®]) até a total colonização do meio BDA nos tratamentos controles. Os valores médios de inibição foram calculados com o uso da fórmula: $I = (C-T)/C \times 100$, onde I representa a porcentagem de inibição, C os valores do tratamento controle e T os valores dos tratamentos com a presença do antagonista, em milímetros. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

Extração de RNA de *S. sclerotiorum* CEN1147 após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241

O micélio de *S. sclerotiorum* crescido por 96 horas sob o efeito dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 foi coletado com lâmina de aço inoxidável e, imediatamente, macerado em cadinho na presença N₂ ou congelado e mantido em freezer -80 °C até a maceração. Em seguida, aproximadamente 200 mg dos micélios macerados de cada amostra foram utilizados para a extração. O RNA foi extraído usando 1 mL do reagente *PureLink™ Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific)*, de acordo as instruções do fabricante. O resultado da extração apresentou bom rendimento, contudo não se conseguiu a pureza desejada do RNA isolado. Por isso, o RNA extraído foi, posteriormente, purificado usando o protocolo de purificação *RNeasy Plant kit (Qiagen)*,

de acordo com as instruções do fabricante. A integridade, pureza e quantificação do RNA extraído foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% e espectrofotometria em NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*).

RNA-Seq

Aproximadamente 3,0 µg de amostras de RNA de alta qualidade de cada uma das três réplicas de amostras tratamento e controle foram enviados para a empresa MacroGen (Seul, Coreia do Sul), para preparo das bibliotecas e sequenciamento em plataforma Illumina NovaSeq usando sequenciamento pareado de 100 bases com *TruSeq Stranded mRNA kit*.

Inibição da germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* CEN1147 por COVs de *T. azevedoi* CEN1241

Foram depositados 10 discos de meio BDA (5 mm Ø) colonizado por *S. sclerotiorum* em sacos plásticos com filtro contendo 200 g de arroz autoclavado com 60% de umidade. Após 14 dias de cultivo com temperatura entre 23 e 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, os escleródios maduros foram lavados em água corrente por 10 minutos e, em seguida, desinfestados por 1 minuto em etanol 70%, seguido de 3 minutos em hipoclorito de sódio 50% e enxaguados três vezes em água Milli-Q por 30 segundos. Tampas de placas de Petri (60 x 15 mm) foram colocadas invertidas dentro de placas de Petri maiores (150 x 25 mm), às quais foram adicionados 200 g de areia fina autoclavada. As bases das placas (60 x 15 mm) contendo 5 mL de meio BDA, receberam ao centro, um disco de BDA (5 mm Ø) colonizado por *T. azevedoi* CEN1241 e foram fixadas à superfície dessas tampas, com fita adesiva. Foram distribuídos e levemente inseridos na areia cinco escleródios maduros, espaçados entre si 26 mm aproximadamente (Figura 1). Em seguida, outra placa (150 x 25 mm) foi sobreposta à placa contendo a areia e o conjunto envolvido com parafina plástica e filme plástico transparente, formando uma atmosfera compartilhada. O tratamento controle consistiu na placa de Petri (60 x 15 mm) contendo apenas meio BDA. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento e repetido por duas vezes. Ao final, foi

avaliada a porcentagem de germinação carpogênica dos escleródios em ambos tratamentos.

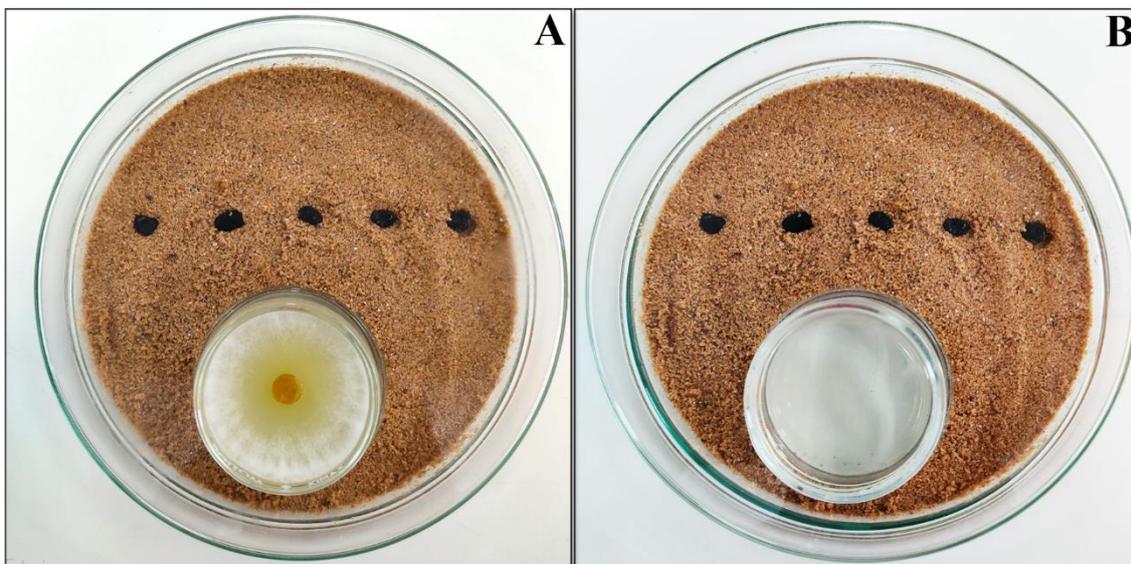


Figura 1. Metodologia de inibição da germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147. **A:** Escleródios expostos aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241, **B:** Controle.

Análises de dados

Os dados do RNA-Seq foram analisados no laboratório de Bioinformática da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, seguindo um *pipeline* de análise para avaliação da qualidade de sequência, mapeamento das leituras de sequenciamento no genoma de referência e contagem dos mesmos. A análise de qualidade dos dados foi feita com o programa FastQC - v0.11.4 (disponível *online* em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). As leituras de sequenciamento de cada amostra foram, então, mapeadas contra o genoma de *S. sclerotiorum* (hospedado na plataforma MycoCosm - JGI/DOE, <https://mycoCosm.jgi.doe.gov/ScLsc1/ScLsc1.home.html>) com o programa STAR versão STAR-2.5.2b (van de Geijn et al., 2015). Os dados da anotação funcional foram obtidos a partir do genoma de referência que disponibiliza dados de ontologia, a partir da plataforma *Gene Ontology* (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019) e de domínios proteicos, a partir do banco de dados PFAM (El-Gebali et al., 2019). As contagens do mapeamento foram realizadas com o htseq-count, versão 0.6.1 (S Anders, T P Pyl, W Huber: HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. bioRxiv 2014) (Anders et al., 2014). Para a análise de expressão diferencial, foi utilizado o edgeR, um pacote de análise que usa o modelo de

Poisson para considerar as variabilidades técnica e biológica, além dos métodos Bayesianos para moderar a superdispersão entre transcritos, melhorando a segurança da inferência (Robinson et al., 2010). Foram considerados transcritos diferencialmente expressos aqueles com log de *fold change* (log FC) ≥ 2 ou ≤ -2 e *false discovery rate* $FDR \leq 0,05$. Com esse conjunto de dados foi realizada, no mesmo pacote, uma análise de componentes principais para avaliação das réplicas e tratamentos. Foi realizada, então, análise de enriquecimento funcional baseado em termos de ontologia do consórcio *Gene Ontology* (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019), usando o programa FUNC (disponível *online* em: <http://func.eva.mpg.de/>). Os dados de enriquecimento são apresentados em gráfico gerado pelo pacote em R GOplot (Walter et al., 2015).

Os dados referentes à inibição da germinação carpogênica foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), com o auxílio do *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

Resultados

Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto aos compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241

O tratamento controle colonizou toda a superfície do meio BDA após 96 horas de cultivo. No tratamento com exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, foi observada uma redução de aproximadamente 32% no crescimento micelial do patógeno em comparação ao controle. Além da redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* quando exposto aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, detectou-se também menor abundância de micélio aéreo (Figura 2).

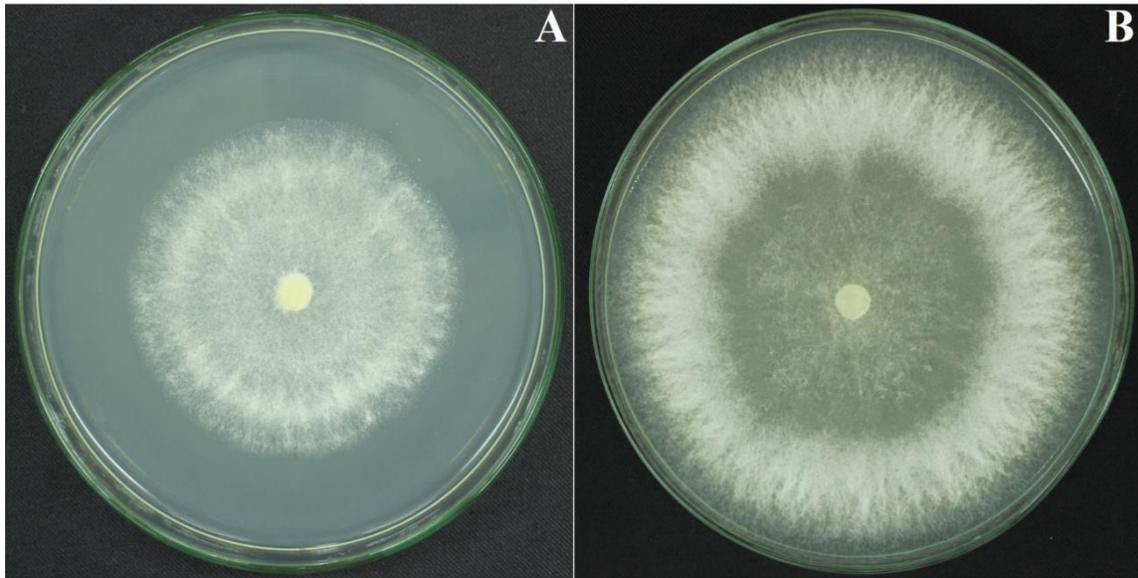


Figura 2. Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147. **A:** Tratamento exposto aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241, **B:** Controle.

Extração de RNA

As amostras de RNA de *S. sclerotiorum* para o experimento de RNA-Seq foram quantificadas e avaliadas quanto à pureza por espectrofotometria usando Nanodrop. As razões dos valores de absorvância 260/280 que indicam pureza do RNA com relação à presença de proteínas, mostrou bom resultado na extração de RNA com o reagente *PureLink™ Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific)*. Contudo, a razão 260/230 que indica pureza com relação à polissacarídeos, se mostrou bastante aquém do desejável (em torno de 2,0). Por isso, foi usada uma purificação em filtro usando o protocolo para purificação de RNA do kit *RNeasy* para plantas (Qiagen). Assim, obteve-se a pureza desejada (razões A260/280 e A260/230 perto de 2,0). As amostras de RNA foram enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul). Os dados de controle de qualidade realizados pela empresa mostraram RNA de alta qualidade para todas as seis amostras com RIN (do inglês *RNA integrity number*) variando de 8,7 a 9,8 o que resultou em dados de sequenciamento de alta qualidade (Anexo 3).

RNA-Seq

O experimento de RNA-Seq gerou dados da ordem de 21.500.000 a 29.800.000 de leituras curtas de sequenciamento por amostra num total de cerca de 147.000.000 de leituras (Tabela 1). Todas essas mostraram ser de alta qualidade com índices gerados pelo programa FastQC maiores que 30, ou seja, com menos de 1 erro de leitura a cada 1.000

bases. Dessas, cerca de 121.000.000 mapearam em locos únicos do genoma variando de, aproximadamente, 16.700.000 a 23.000.000 por amostra.

Tabela 1. Números de leituras curtas de sequenciamento geradas no experimento de RNA-Seq e mapeadas contra o genoma de referência de *Sclerotinia sclerotiorum* usando o programa STAR. Contagens por amostra do número total de leituras usadas no mapeamento e mapeadas uma única vez.

Tratamentos	Número total de leituras curtas geradas	Número de leituras curtas mapeadas (<i>unique mapping</i>)	Porcentagem de leituras curtas mapeadas (<i>unique mapping</i>)
Controle 1	25.825.546	22.210.778	86,00 %
Controle 2	21.700.050	18.417.081	84,87 %
Controle 3	21.569.106	18.538.716	85,95 %
Tratamento 1	26.273.441	22.499.806	85,64 %
Tratamento 2	22.504.183	16.731.199	74,35 %
Tratamento 3	29.861.592	23.028.623	77,12 %
Total	147.733.918	121.426.203	-

A partir dessas leituras mapeadas contra o genoma uma única vez, foi então realizada a análise de expressão diferencial usando o pacote edgeR. Aproximadamente 840 transcritos foram identificados como diferencialmente expressos (DE) pelos critérios determinados ($\log FC \geq 2$ ou ≤ -2 e $FDR \leq 0,05$). Uma análise de componentes principais (PCA) desses transcritos mostrou uma clara separação entre as amostras dos grupos controle e tratamento, com o primeiro componente explicando 94% da variância dos dados e mostrando uma replicata (controle 1 e tratamento 2) com maior dispersão em relação às outras duas dentro de cada grupo (Figura 3).

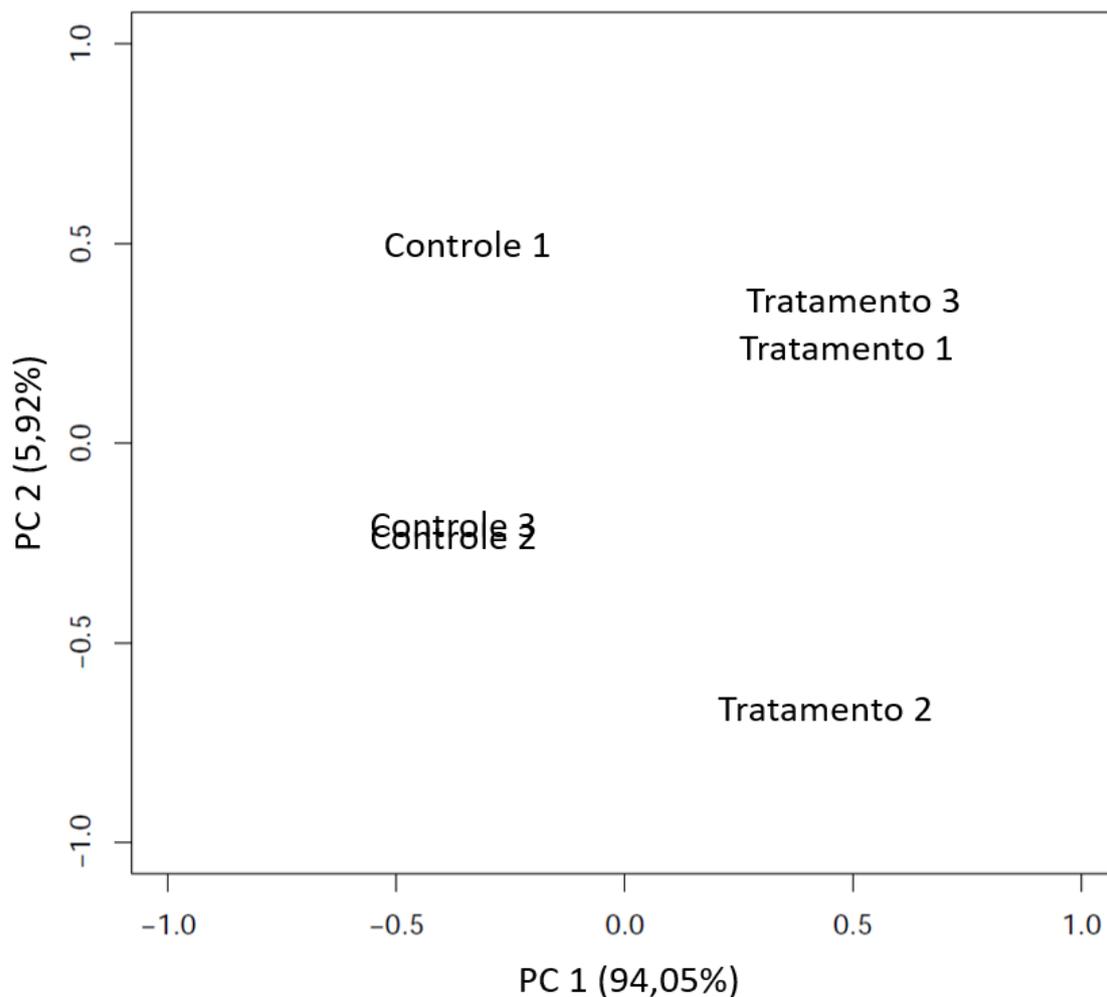


Figura 3. Análise de Componentes Principais dos transcritos considerados diferencialmente expressos ($\log FC \geq 2$ ou ≤ -2 e $FDR \leq 0,05$) entre os grupos controle e tratamento segundo resultados do pacote edgeR.

A classificação ontológica realizada pelo o consórcio GO (*Gene Ontology*) descreve o conhecimento sobre domínios biológicos com relação a três aspectos: processo biológico, componente celular e função molecular. Uma análise de enriquecimento de termos GO para os transcritos DE mostrou destaque para oxirredução e metabolismo de carboidratos na categoria processo biológico, componentes de membrana e extracelulares na categoria componente celular e, finalmente, atividade de hidrolase e ligação a carboidratos na categoria função molecular (Figura 4).

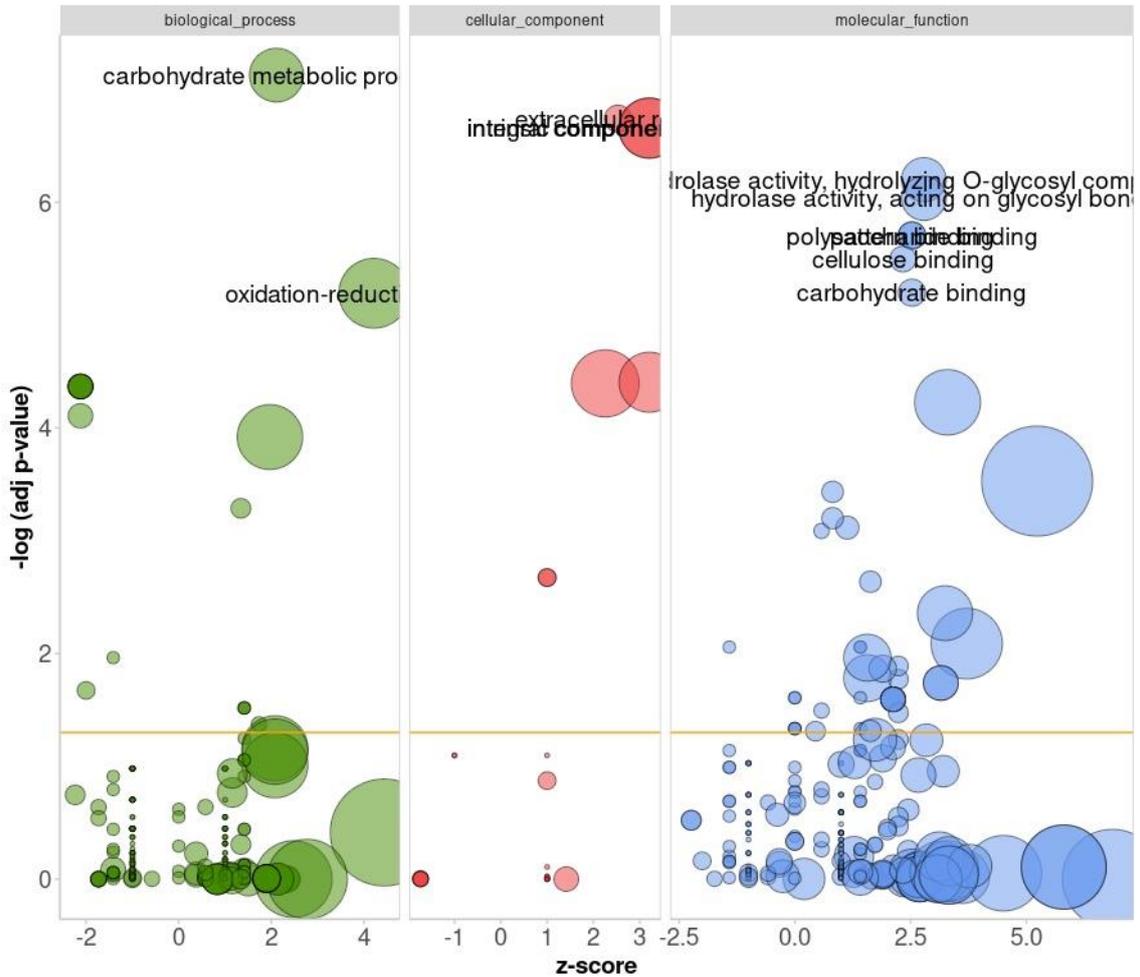


Figura 4. Enriquecimento de termos GO realizado com pacote FUNC por categoria (processo biológico, componente celular e função molecular) de todos os transcritos diferencialmente expressos ($\log FC \geq 2$ ou ≤ -2 e $FDR \leq 0,05$), segundo o pacote edgeR, entre os grupos controle e tratamento. No eixo x, está representado z-score (diferença relativa ao número de leituras de sequenciamento); no eixo y, o logaritmo negativo do p-value ajustado (FDR neste caso). A área dos círculos é proporcional ao número de genes do termo GO indicado, e a cor corresponde à categoria. A linha amarela mostra o limite para a indicação dos termos GO.

Uma curadoria manual foi realizada para cerca de 120 transcritos ordenados pelo maior log de *fold change* ($FDR \leq 0,05$) usando os dados de anotação funcional para identificação de transcritos de genes com função biológica potencialmente relevante para a inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*. A partir dessa avaliação, destacam-se 25 transcritos, os quais foram divididos em oito categorias funcionais relacionadas com produção de melanina, parede celular, defesa, respiração celular, transporte transmembrana, patogenicidade, incompatibilidade vegetativa e resposta ao estresse (Tabela 2).

Tabela 2. Transcritos DE selecionados pela potencial função biológica relacionada ao processo de inibição por COVs de *Trichoderma azevedoi* CEN1241 descrevendo o código de cada transcrito, a anotação por similaridade de sequência, expressão relativa entre grupos tratamento e controle (logFC) e possível função biológica.

Transcrito	Anotação	logFC	Possível Função	
s6075	Tirosinase	-4,96	Produção de melanina	
s11696	Tirosinase	-4,19		
s1826	Ligação a beta-1,3-glucano	-4,56	Parede Celular	
s12886	Ligação a beta-1,3-glucano	-4,29		
s5761	Manoproteína da parede celular (HSP150)	-4,34		
s9399	Beta-glicosidase secretada (SUN4)	7,05		
s3382	Agglutinina	-6,12	Defesa	
s7923	Glutathione transporte 1	-4,03		
s6833	Glutathione S-transferase	5,18		
s8797	Patulina	4,74		
s11510	Asperlina	4,37		
s5528	Amina oxidase de cobre	4,60		
s6088	Carnitina O-acetiltransferase mitocondrial putativa	4,56		Respiração
s13681	Choque térmico 78, Hsp78 mitocondrial	4,81		
s2679	Álcool desidrogenase dependente de NADP6	4,05		
s6235	DNA helicase HMI1 mitocondrial dependente de ATP	6,13		
s11534	Proenzima 2 da fosfatidilserina descarboxilase	-4,34		
s919	Transporte de efluxo gliotoxina MFS	4,27	Transporte de transmembrana	
s1872	Transportador de glicose/galactose	4,54		
s6990	Homólogo da carboxipeptidase S1	-4,27	Patogenicidade	
s10078	Incompatibilidade vegetativa HET-E-1	7,78	Incompatibilidade vegetativa	
s7950	Incompatibilidade vegetativa HET-E-1	7,50		
s1824	Domínio WSC ARB_07867	-6,00	Resposta ao estresse	
s7135	Choque térmico HSP98	5,24		
s5979	Choque térmico HSP98	-5,29		

Entre esses 25 transcritos selecionados, 11 foram regulados negativamente e 14 positivamente em relação ao tratamento controle. Uma representação da expressão relativa desses transcritos e sua anotação com termos GO é mostrada na Figura 5.

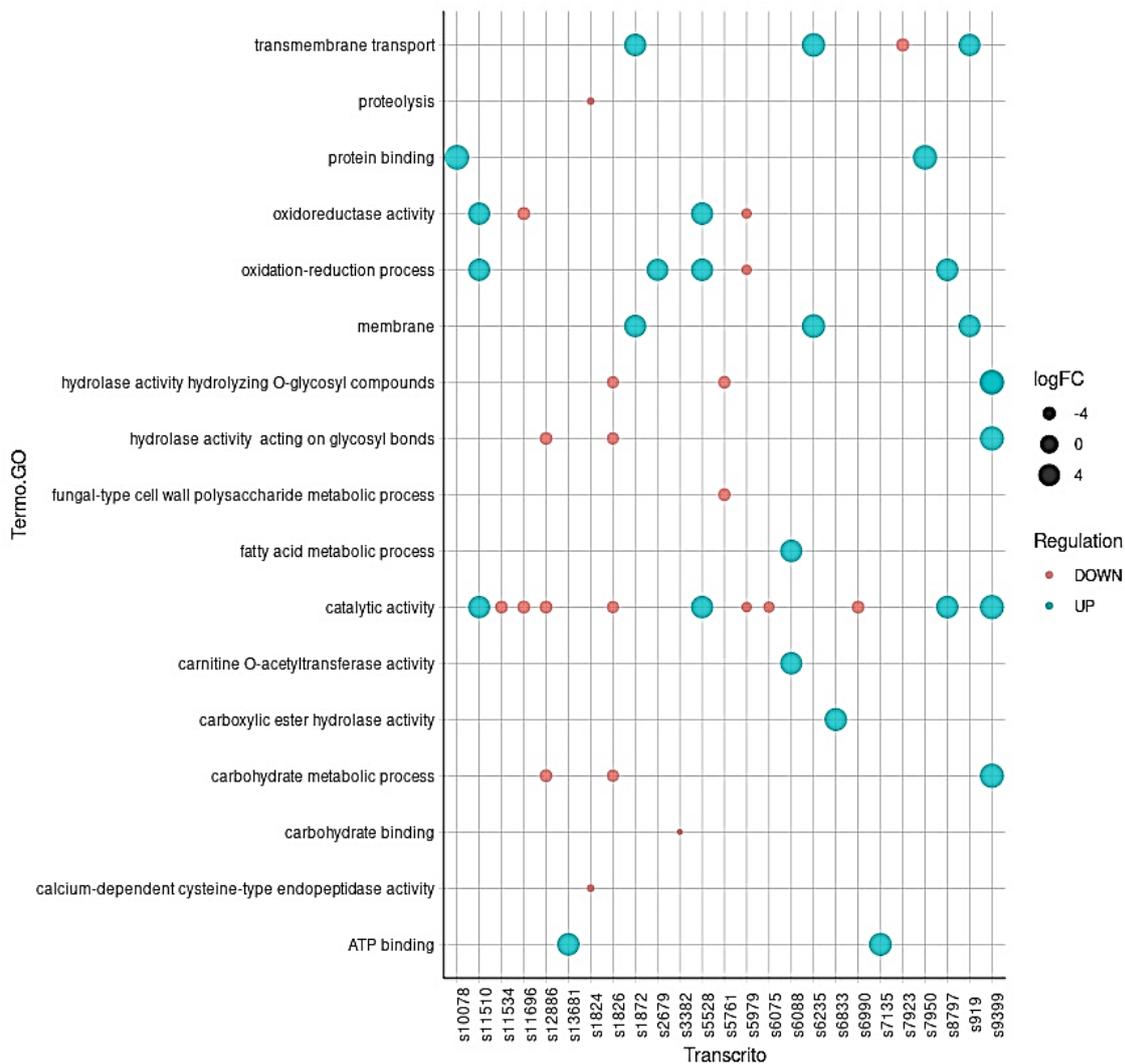


Tabela 3. Inibição da germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 por compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241.

Tratamento	Germinação carpogênica (%) ¹	
	Experimento 1	Experimento 2
CEN1241	20±33,45a	46±30,11a
Controle	90±10,95b	80±12,64b
C.V. (%)	35,44	30,51

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Observou-se a emissão de estipes dos apotécios aos 40 dias após a incubação em atmosfera compartilhada. Os estipes apresentaram tamanhos variados e alguns escleródios emitiram mais de um estipe, independente do tratamento (Figura 6).

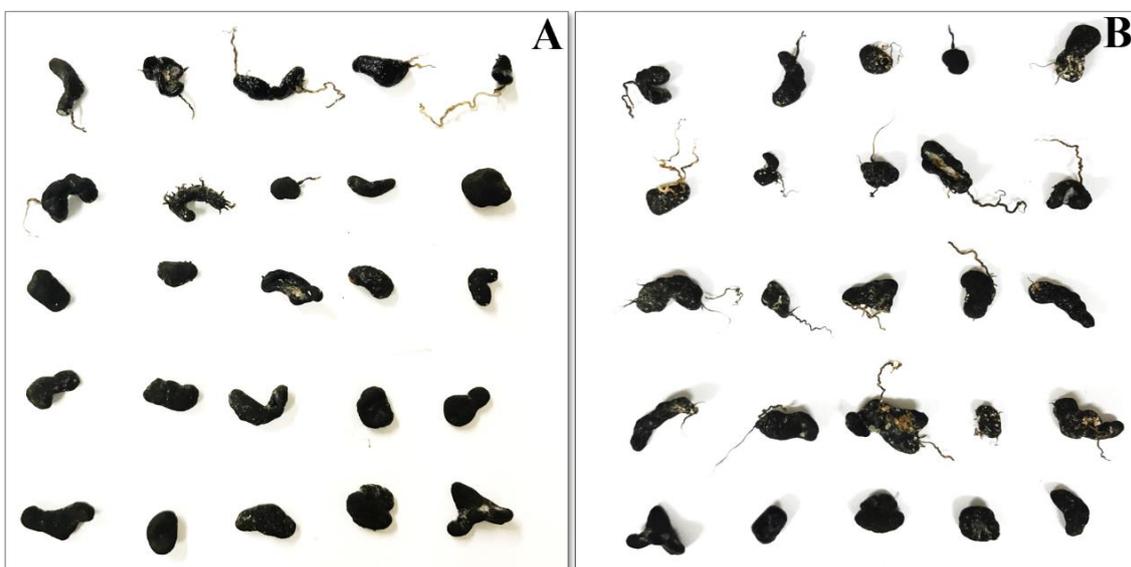


Figura 6. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147. **A:** Escleródios expostos aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241, **B:** Controle.

Discussão

A inibição micelial de *S. sclerotiorum* por COVs de *T. azevedoi* CEN1241 está em conformidade com outros estudos que já demonstraram a ação antagônica de COVs de *Trichoderma* spp. sobre esse patógeno (Kapil & Kapoor 2005; Lopes et al., 2012; Ojaghian et al., 2019). As espécies de *Trichoderma* são produtoras de uma diversidade de COVs capazes de inibir o crescimento de fitopatógenos. Esses COVs pertencem a diferentes classes químicas como os álcoois, alcanos, ésteres, sesquiterpenos, aldeídos, cetonas, compostos aromáticos, pironas entre outros (Lee et al., 2016; Chen et al., 2016). Recentemente, foi demonstrado que o perfil dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 abrange, principalmente, compostos das classes das cetonas, aromáticos, álcoois e sesquiterpenos (Silva et al., 2020). Até o presente momento, não é possível afirmar quais dos COVs de

T. azevedoi CEN1241 têm ação inibitória sobre *S. sclerotiorum*. Entretanto, já foi demonstrado que alguns COVs isolados possuem potencial antagônico contra fungos fitopatogênicos (Cooney & Lauren, 1998).

A análise de enriquecimento de termos GO para os transcritos DE nesse experimento mostra importante variação de expressão de transcritos relacionados ao processo de estresse oxidativo. Já foi relatado que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são essenciais na patogenicidade de *S. sclerotiorum* (Kim et al., 2011). Esses autores identificaram durante a interação em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), duas NADPH oxidases (SsNox1 e SsNox2), que poderiam estar envolvidas na geração de EROs. Usando silenciamento por RNA interferente (RNAi) para examinar a função de SsNox1 e SsNox2, mostrou-se que SsNox1 tem um papel central na virulência e produção de escleródios. A inativação do gene SsNox2 resultou em desenvolvimento esclerotial limitado, entretanto, o organismo permaneceu totalmente patogênico. Georgious et al. (2006) também concluíram que regulação de EROs desempenha um papel importante na diferenciação esclerótica de fungos filamentosos.

Outro processo biológico destacado foi o de metabolismo de carboidratos que também aparece em destaque na categoria função molecular como ligação a carboidratos. Durante a infecção de *S. sclerotiorum* em *B. napus*, Seifbarghi et al. (2017) também identificaram que a maioria dos genes regulados na categoria de processos biológicos pertenciam à subcategoria de processos metabólicos de carboidratos, com maior regulação 24 horas após a inoculação (HPI) e um declínio as 48 HPI. Esses autores também relataram resultados semelhantes para genes de atividade hidrolítica e, dessa forma, concluíram que o metabolismo de carboidratos e a atividade de enzimas hidrolíticas trabalham em conjunto para fornecer nutrientes e energia para o crescimento micelial. No presente estudo, o micélio foi avaliado após 96 horas de incubação. Esse é o tempo em que o tratamento controle coloniza todo o diâmetro da placa de Petri. Nesse período, não foram encontrados escleródios maduros em nenhum tratamento. Sabe-se que o meio BDA é rico em nutrientes e, por isso, pode-se afirmar que *S. sclerotiorum* não teria necessidade de avançar tão rapidamente para o estado necrotrófico, como em uma situação de infecção *in vivo*. Sendo assim, esse período de 96 horas pode ser considerado uma etapa de intenso crescimento micelial e, dessa forma, sugere-se que os resultados aqui obtidos sejam, provavelmente, uma resposta do patógeno aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241.

A atividade de hidrolases foi destacada com dois termos (GO:0016798 e GO:0004553) relacionados a essa atividade em ligações e compostos glicosídicos, respectivamente, no enriquecimento de funções moleculares. Em *Sclerotinia homeocarpa*, durante a infecção em grama rasteira (*Agrostis stolonifera* L.) também foi relatado um grande número de transcritos com atividade de glicosil hidrolase (Orshinsky et al., 2012). Essas enzimas visam uma ampla variedade de compostos da parede celular da planta, mostrando a capacidade desse fungo de infectar e causar doença em uma ampla gama de hospedeiros. De maneira semelhante, Seifbarghi et al. (2017) também encontraram genes da família glicosil hidrolase em *S. sclerotiorum* na infecção em plantas de *B. napus* e destacaram um papel potencial desses na degradação de hemicelulose e celulose das hospedeiras. Destaca-se o termo GO relacionado à ligação à celulose também enriquecido nos nossos dados (Figura 3).

Dentre aqueles transcritos DE com maior variação de expressão entre os grupos, dois transcritos de *S. sclerotiorum* com similaridade à proteína tirosinase foram regulados negativamente na presença dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241. Essa enzima é relacionada à etapa inicial da síntese de melanina, um dos compostos chave para a formação de escleródios (Halaouli et al., 2006; Smolińska & Kowalska, 2018; Melo et al., 2019). Westrick et al. (2019) demonstraram que, na interação com plantas de soja, *S. sclerotiorum* parece não produzir grande quantidade de melanina nos estágios iniciais da infecção. Já os estágios posteriores da infecção foram caracterizados por uma aparente mudança para a formação da estrutura de sobrevivência, mostrando uma regulação tardia da síntese de melanina, sendo a última análise temporal realizada com 96 horas após a inoculação, mesmo tempo de crescimento utilizado para coleta do material usado na extração de RNA do presente estudo. De maneira similar, Graham-Taylor et al. (2020) também demonstraram uma regulação tardia em *S. sclerotiorum* para a formação de escleródios na infecção em *B. napus*, talvez porque a melanina não seja vital no início do crescimento de *S. sclerotiorum*. Ordóñez-Valencia et al. (2015), de forma similar, verificaram o início da formação dos escleródios de *S. sclerotiorum* 96 HPI *in vitro*, em condições normais de cultivo, com presença abundante de micélio aéreo nas extremidades das placas de Petri, seguido do início da aglomeração de hifas e maturação completa dos escleródios após nove dias de cultivo. Como demonstrado neste estudo, essas observações foram verificadas apenas nas amostras controle, sem exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241. Em estudos rotineiros do nosso laboratório, *S. sclerotiorum* CEN1147 apresenta características similares aos resultados observados por Ordóñez-Valencia et al.

(2015), com escleródios maduros presentes após sete e dez dias de cultivo. A melanina também participa do processo de formação dos apressórios dos fungos. O apressório é uma estrutura especializada que exerce força física para romper a superfície do vegetal ou secretar enzimas para digerir a cutícula e a parede celular da planta (Mendgen et al., 1996; Ryder & Talbot, 2015). Entretanto, não seria razoável acreditar que a alteração da expressão gênica da tirosinase estivesse relacionada com a formação do apressório nesse caso, pois a condição experimental aqui testada não exigiria tanto a formação dessa estrutura. Dessa forma, sugere-se que a regulação negativa de tirosinase, a inibição micelial observada e a menor disponibilidade de micélio aéreo em *S. sclerotiorum* sejam resultados da presença dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, que parecem interferir ou retardar a produção de escleródios de *S. sclerotiorum*.

O segundo grupo de transcritos de *S. sclerotiorum* destacados está, possivelmente, relacionado à parede celular. Os genes representados neste grupo representam duas proteínas de ligação a β -1,3-glucano, uma manoproteína da parede celular (HSP150) e uma β -glucosidase secretada (SUN4). O β -1,3-glucano e a quitina são os polissacarídeos mais abundantes da parede celular dos fungos. Glucanases celulolíticas e não celulolíticas, incluindo β -1,4, β -1,6 e β -1,3 glucanases, já foram identificadas em *S. sclerotiorum* (Ezzine et al., 2016), sendo o glucano ligado a β -1,3, o polímero predominante compreendendo entre 65 e 90% da fração de glucano da parede celular fúngica (Fontaine et al., 1997; Oliveira-Garcia & Deising, 2013). De acordo com Hsu et al. (2015) as manoproteínas HSP150 do ascomiceto *Saccharomyces cerevisiae* são um componente estrutural de estabilidade e crescimento da camada externa da parede celular, além de adesão às células hospedeiras e virulência. Já as proteínas da família SUN são reguladas diferentemente durante o desenvolvimento de *S. cerevisiae* e sob diferentes condições ambientais e aparentemente estão envolvidas na remodelação da parede celular e alterações na sua resistência a compostos extracelulares (Kuznetsov et al., 2013). A observação macroscópica das colônias de *S. sclerotiorum* após exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, comparado ao tratamento controle, fornece indícios que componentes estruturais de crescimento vegetativo são alterados, refletindo em, aproximadamente, 32% de inibição micelial. A regulação negativa da proteína de ligação a β -1,3-glucano e da manoproteína da parede celular HSP150 somada aos resultados obtidos por Silva et al. (2020), que demonstraram redução na largura de hifas de *S. sclerotiorum* após 96 horas de exposição aos COVs de *Trichoderma* spp., permite

inferir que esses são resultados do efeito dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 na atmosfera compartilhada com o patógeno.

A diferença mais acentuada na expressão gênica de *S. sclerotiorum* após exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 foi observada para transcritos que codificam possíveis proteínas de defesa/desintoxicação, sendo 6 dentre os 25 transcritos diferencialmente expressos aqui destacados. Um desses se refere a uma aglutinina que foi regulada negativamente. A aglutinina faz parte de uma superfamília de proteínas conhecida como lectinas, aparentemente bastante comuns na família Sclerotiniaceae (Candy et al., 2003). Em *S. sclerotiorum*, a aglutinina foi previamente identificada como uma das principais proteínas solúveis em escleródios maduros (Kellens & Peumans, 1992). De acordo com Van Damme et al. (2007) as lectinas produzidas pela família Sclerotiniaceae podem desempenhar uma função no papel defensivo contra possíveis organismos predadores. Essa analogia se deve ao papel de defesa atribuído a um grande grupo de lectinas vegetais (Van Damme et al., 2004). De acordo com essa inferência, acredita-se que espécies de Sclerotiniaceae acumulem em seus tecidos de armazenamento e sobrevivência proteínas citoplasmáticas de armazenamento que, em virtude de suas propriedades de ligação ao açúcar, são tóxicas ou repelentes para predadores (Van Damme et al., 2007).

As glutations desempenham papéis importantes nas respostas a situações de estresse em fungos, como na eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (Grant, 2001; Pócsi et al., 2004). Curiosamente, nossos resultados mostraram uma glutatona sendo regulada negativamente e outra positivamente. Sato et al. (2009) demonstraram que alterações no crescimento micelial de *Aspergillus nidulans* estão correlacionadas com uma diminuição da Glutaciona (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH) intracelular. A regulação positiva de GST foi descrita anteriormente em *S. sclerotiorum* após 24 horas de exposição aos COVs de *Trichoderma* spp. e pode estar relacionada com mecanismos inibitórios de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum* (Ojaghian et al., 2019).

Outro transcrito de defesa com expressão aumentada em *S. sclerotiorum* após exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, faz parte de um grupo de genes que mediam a biossíntese de patulina, uma micotoxina de etilo, produzida por várias espécies de fungos, que demonstra propriedades antimicrobianas (Moake et al., 2005; Li et al., 2019). A patulina, descrita em diversos gêneros de fungos como *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces* (Puel et al., 2010; Barad et al., 2016), pode

facilitar as habilidades competitivas de *Penicillium expansum* contra outros microrganismos, uma vez que esse composto possui forte atividade antibiótica contra bactérias e fungos (Moake et al., 2005). Ainda no grupo relacionado à defesa antimicrobiana, foi identificado um transcrito que faz parte do grupo de genes que mediam a biossíntese de asperlina, um policetídeo que possui atividades antifúngicas. Recentemente, foi demonstrado, durante a infecção em *B. napus*, que *S. sclerotiorum* produz ácido botcínico ou um composto relacionado (Graham Taylor et al., 2020). O ácido botcínico também é um policetídeo que induz necrose e clorose nas plantas, além de possuir atividade antifúngica (Dalmais et al., 2011). Verificou-se ainda no presente trabalho, a regulação positiva de um transcrito ligado à proteína amina oxidase contendo cobre. Nos organismos eucarióticos as aminas oxidases são implicadas na desintoxicação celular, na cicatrização de feridas, no processo de oxirredução, como também na diferenciação e crescimento celular (Kumar et al., 1996; Planas-Portell et al., 2013). Uma amina oxidase contendo cobre já foi identificada na levedura *Schizosaccharomyces pombe* (Peter et al., 2008), em *S. sclerotiorum*, foi relatada uma amina oxidase (Derbyshire et al., 2017).

As interações entre plantas e patógenos representam uma competição dinâmica entre um sistema imune robusto e estratégias de infecção eficientes. As plantas ao serem atacadas pelos fitopatógenos têm a capacidade de responder com um amplo conjunto de respostas de defesa (elicitors) para impedir a colonização de seus tecidos (Felix et al., 1999). Em oposição, os fitopatógenos liberam compostos antimicrobianos (efetores) capazes de interferir no sistema de defesa das plantas (Lo Presti et al., 2015). O elevado número de transcritos de defesa diferencialmente expressos em *S. sclerotiorum* no presente estudo demonstra que, mesmo não existindo uma interação física entre fitopatógeno e antagonista, os COVs de *T. azevedoi* CEN1241 liberados dentro da atmosfera compartilhada ativam respostas de defesas em *S. sclerotiorum*. Os transcritos de defesa, em sua maioria, foram regulados positivamente, o oposto do observado para os transcritos relacionados à parede celular. Esses resultados sugerem que a inibição micelial em *S. sclerotiorum* exposto aos COVs pode estar relacionada a alterações transcricionais do patógeno, que visam à defesa contra os efeitos desses e garantir a sua sobrevivência, com efeitos estruturais que resultam na inibição do crescimento micelial.

O segundo grupo com maior número de transcritos diferencialmente expressos pode estar relacionado com a respiração celular do patógeno. Dos cinco transcritos identificados, quatro foram regulados positivamente (carnitina O-acetiltransferase

mitocondrial; proteína de choque térmico 78, Hsp78 mitocondrial; álcool desidrogenase dependente de NADP6; DNA helicase HMI1 mitocondrial dependente de ATP) e um regulado negativamente (Proenzima 2 da fosfatidilserina descarboxilase). A carnitina O-acetiltransferase putativa mitocondrial está envolvida na transferência de acetil-CoA para as mitocôndrias e já foi identificada em outros ascomicetos como *S. cerevisiae* (Schmalix & Bandlow, 1993) e *Colletotrichum* spp. (Gan et al., 2013). O acetil-CoA é um composto intermediário chave no metabolismo celular e sua formação contribui para uma das etapas da respiração, na matriz mitocondrial (Hynes et al., 2011). A Hsp78 foi previamente relatada em *S. cerevisiae* e sua possível função está relacionada com a Hsp70 mitocondrial para a reorganização de agregados de proteínas danificadas na matriz mitocondrial após estresse térmico e retomada da função respiratória mitocondrial (Krzewska et al., 2001). A enzima álcool desidrogenase (ADH) dependente de NADP6 pertence à família das oxidoreduases. Este álcool é um metabólito essencial no metabolismo energético, sendo um produto final da glicólise e da fermentação etanólica, servindo como substrato de carbono durante respiração (van Loon & Young, 1986). As ADH são divididas em diversos grupos e já foi demonstrado em *S. cerevisiae*, que a ADH3 está localizada nas mitocôndrias (de Smidt et al., 2008). Outro transcrito relacionado ao processo de respiração é a DNA helicase HMI1 mitocondrial dependente de ATP. De acordo com Monroe Jr et al. (2005) o gene HMI1 codifica uma DNA helicase que se localiza nas mitocôndrias de *S. cerevisiae*, sendo necessária para a manutenção do genoma do DNA mitocondrial (mtDNA). A mutação desse gene resultou em uma cepa com ausência de função mitocondrial. O único transcrito regulado negativamente, relacionado a componentes da respiração celular foi uma fosfatidilserina descarboxilase. Esta é precursora da fosfatidiletanolamina que, por sua vez, é um componente essencial das mitocôndrias de leveduras (Zinser et al., 1991; Nebauer et al., 2007). A diminuição de fosfatidiletanolamina nas mitocôndrias ocasiona problemas na respiração, defeitos na montagem de complexos de proteínas mitocondriais e perda de DNA mitocondrial (Birner et al., 2003; Wriessnegger et al., 2009).

Em um ensaio realizado no nosso laboratório com uma atmosfera compartilhada apenas com *S. sclerotiorum* em ambas extremidades das placas de Petri, foi verificado após 96 horas de cultivo, uma leve redução do crescimento micelial nas duas colônias do patógeno, em relação ao tratamento controle com apenas uma colônia de *S. sclerotiorum* (Dados não publicados). Esta observação e o elevado número de transcritos diferencialmente expressos, referentes a componentes da respiração celular, podem estar

relacionados a uma possível concorrência por O₂ na atmosfera compartilhada entre antagonista e patógeno. Dessa forma, além da ação dos COVs, sugere-se que a inibição micelial de *S. sclerotiorum* pode ser atribuída, em parte, à competição por O₂ entre o patógeno e o antagonista.

Dois transcritos relacionados às proteínas de transporte transmembrana foram regulados positivamente. O primeiro é o transportador de efluxo gliotoxina MFS, relatado no agente de biocontrole *Coniothyrium minutans* em interação com *S. sclerotiorum* (Zhao et al., 2020). Sua ação foi semelhante à da proteína GliA, relatada em *Aspergillus fumigatus*. Segundo Wang et al. (2014) a GliA desempenha um papel importante na proteção contra gliotoxinas extracelulares. Outras gliotoxinas foram descritas em *Colletotrichum* (Gan et al., 2019) e *Trichoderma* (Vargas et al., 2014). A gliotoxina é comum em alguns fungos filamentosos com atividade antimicrobiana e antioxidante (Vargas et al., 2014). O segundo transcrito foi o transportador de glicose/galactose, descrito em *Sclerotinia borealis* (Mardanov et al., 2014). Os transportadores de membrana desempenham um papel na neutralização do impacto fisiológico dos compostos de defesa liberados pelos hospedeiros (Amselem et al., 2011). Foi demonstrado que o gene que codifica para o transportador ABC BcatrB de *Botrytis cinerea* é necessário para tolerar a fitoalexina camalexina de *Arabidopsis thaliana*, (Stefanato et al., 2009). Já Amselem et al. (2011) relataram que aproximadamente metade dos genes de transportadores foram mais expressos em *S. sclerotiorum* e *B. cinerea* durante a infecção em plantas de girassol. Semelhante ao discutido sobre os transcritos de defesa, é possível que genes relacionados ao transporte transmembrana atuem especialmente durante a infecção, quando é provável que encontrem mecanismos de defesa do hospedeiro. A condição experimental proposta neste estudo é distante de uma infecção *in vivo*, porém a atmosfera compartilhada pode simular uma condição em que *S. sclerotiorum* também precise alterar sua regulação gênica para superar os possíveis danos causados pelos COVs de *T. azevedoi* CEN1241.

Nossos resultados mostraram um transcrito com possível relação à patogenicidade de *S. sclerotiorum* regulado negativamente. Esse transcrito tem similaridade com a proteína carboxipeptidase S1 que foi descrita no patógeno humano, o ascomiceto *Arthroderma benhamiae* (Burmester et al., 2011), e no fitopatógeno *Penicillium janthinellum* (Svendsen et al., 1993). Em *S. sclerotiorum* foram relatadas outras peptidases como a Carboxipeptidase A, Carboxipeptidase Ss, Carboxipeptidase Y, Pro-X Carboxipeptidase e Ala-Ala Carboxipeptidase (Amselem et al., 2011). Fitopatógenos

saprófitas secretam peptidases para degradar uma variedade de polipeptídeos em seu ambiente. Essa degradação é potencialmente benéfica para eliminar a atividade das proteínas antifúngicas dos hospedeiros e também fornecer nutrientes (Amselem et al., 2011). A identificação de apenas um transcrito relacionado à patogenicidade de *S. sclerotiorum* pode, teoricamente, ser explicada pela condição experimental testada, que não proporciona uma interação física entre patógeno e antagonista, não sendo necessário uma maior expressão de proteínas que contribuam para infecção fúngica. O fato de não ter se destacado nenhum transcrito DE com grande variação relacionado à produção de ácido oxálico corrobora esta hipótese. Esse composto foi amplamente estudado e identificado como um dos principais na patogenicidade de *S. sclerotiorum* durante o processo de infecção (Marciano et al., 1983; Cotton et al., 2003; Amselem et al., 2011; Sang et al., 2019; Westrick et al., 2019).

Após 96 horas de exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, dois transcritos relacionados à proteína HET-E-1 foram regulados positivamente em *S. sclerotiorum*. De acordo com Paoletti & Clavé (2007), nos fungos, a morte celular programada associada à incompatibilidade vegetativa é determinada pelas interações de proteínas que contêm domínios de incompatibilidade heterocariônica (HET). Infere-se que esses sistemas podem funcionar para limitar trocas citoplasmáticas entre indivíduos diferentes da mesma espécie. Genes que codificam proteínas com o domínio HET-E-1 já foram relatados em *S. sclerotiorum* (Amselem et al., 2011). Durante a infecção em *B. napus*, 11 genes que codificam proteínas HET foram reguladas positivamente em *S. sclerotiorum* (Seifbarghi et al., 2017). Genes codificadores de proteínas com o domínio HET em *S. sclerotiorum* são similares a genes da família HET-E-1 de *Podospora anserina* (Saupe et al., 1995; Paoletti & Saupe, 2009; Amselem et al., 2011) e, interessantemente, apresentam uma expansão com duas a três vezes mais genes em relação aos genomas de *P. anserina* e *B. cinerea* (Amselem et al., 2011). Os genes de incompatibilidade vegetativa de fungos caracterizados inicialmente como não capazes de reconhecimento co-específico, podem ter uma função no reconhecimento de patógenos e representam um componente do que poderia ser um sistema imunológico inato dos fungos (Paoletti & Saupe, 2009). Nessa visão, a regulação positiva dos transcritos HET-E-1 em *S. sclerotiorum* pode ter relação com o reconhecimento dos COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241. Parece provável que a curta distância (28,6 mm) entre as culturas na atmosfera compartilhada possa contribuir para essas respostas. Alguns destes resultados permitem inferir que o comportamento de *S. sclerotiorum* em resposta aos

COVs do antagonista se assemelha a uma provável resposta que o patógeno teria na interação com uma hospedeira para superar a resposta inata de defesa da planta.

A atmosfera compartilhada entre antagonista e patógeno pode ocasionar situações de estresse em ambos organismos. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram três transcritos relacionados à resposta ao estresse, sendo dois regulados negativamente e um positivamente. Uma proteína de domínio WSC (*Cell Wall Stress Responsive Component*) foi regulada negativamente. Proteínas de resposta ao estresse da parede celular já foram caracterizadas em outros fungos filamentosos, como *A. fumigatus* (Dichtl et al., 2012) e *Neurospora crassa* (Maddi et al., 2012). Uma proteína semelhante (SS1G_08280) já foi identificada anteriormente em *S. sclerotiorum* (Amselem et al., 2011). Já em *S. cerevisiae*, foi demonstrado que o domínio WSC1 atua em resposta ao estresse ambiental (Heinisch et al., 2010). Segundo Tong et al. (2016) as funções das proteínas WSC são variáveis em fungos filamentosos, porém com envolvimento efetivo nas respostas ao estresse. Os outros dois transcritos são associados às proteínas de choque térmico HSP98, já descritas nos ascomicetos *N. crassa* (Vassilev et al., 1992) e *A. fumigatus* (Nierman et al., 2005). Um dos mecanismos responsáveis pela tolerância mais estudados é o da resposta dos organismos ao estresse por temperatura, que coincide com o acúmulo de proteínas de estresse HSPs, sintetizadas em resposta ao choque térmico, essenciais para a proteção celular nessas condições (Mohsenzadeh et al., 1998; Ferreira et al., 2007). Embora estes ensaios tenham sido conduzidos em temperatura próxima aos 25 °C, não se pode descartar que, dentro da atmosfera compartilhada, tenha ocorrido aumento de temperatura, pois o ambiente permanece absolutamente vedado por 96 horas. Ao final das 96 horas, foi possível observar, nas extremidades das placas do tratamento exposto aos COVs, o micélio de *S. sclerotiorum* enfraquecido com a presença de exsudatos transparentes também detectados nas colônias de *T. azevedoi* CEN1241. Acredita-se que essas constatações sejam de uma transpiração ocorrida durante a condição experimental.

A inibição da germinação carpopôgica de *S. sclerotiorum* por COVs de *Trichoderma* spp. já foi reportada por Ojaghian et al. (2019), usando o cultivo de escleródios em blocos de espuma de poliuretano. No presente estudo foi proposta uma nova metodologia que se aproximasse das condições de campo, com os escleródios enterrados em areia autoclavada, formando uma atmosfera compartilhada com COVs de *T. azevedoi* CEN1241. A doença causada por *S. sclerotiorum* é de difícil controle, devido ao longo tempo de viabilidade do escleródio no solo e à formação dos apotécios com

posterior liberação dos ascósporos no ar (Doughan & Rollins, 2016). A interrupção do ciclo sexual de *S. sclerotiorum* é um alvo importante para o controle da doença. Por esse motivo, diversos estudos demonstraram a capacidade de *Trichoderma* de impedir e/ou reduzir a formação dos apotécios (Geraldine et al., 2013; Carvalho et al., 2015; Jones et al., 2015; Smolińska et al., 2016). Entretanto, a maioria desses resultados são comprovados com o mecanismo de hiperparasitismo. O presente estudo evidencia que a ação de *Trichoderma* sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* pode ocorrer também pelo mecanismo exclusivo de antibiose. A exposição dos escleródios por 40 dias aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 diminuiu, significativamente, a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* em relação ao tratamento controle.

A ação inibitória dos COVs de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* já foi descrita em inúmeros trabalhos. Entretanto, este estudo é o primeiro que objetivou elucidar as diferentes respostas do patógeno exclusivamente à ação dos COVs. É provável que a atmosfera compartilhada entre os fungos possa induzir sinais específicos de comunicação e defesa entre eles, indicando a complexidade dos eventos que ocorrem durante o controle biológico por *Trichoderma*. Esses resultados reforçam o potencial de COVs emitidos por *Trichoderma* para aplicação biotecnológica no controle de *S. sclerotiorum*.

Conclusão

O experimento relativo ao crescimento de *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto exclusivamente aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, sem nenhum contato físico entre ambos, mostrou inibição significativa do crescimento micelial.

Os dados de RNA-Seq gerados pelo sequenciamento de próxima geração de milhões de leituras curtas do RNA de *S. sclerotiorum* CEN1147 mostraram que os COVs de *T. azevedoi* CEN1241 alteram significativamente a expressão de cerca de 840 transcritos.

A análise de enriquecimento de termos GO mostrou destaque para os processos de oxirredução e metabolismo de carboidratos além da atividade catalítica, particularmente, de hidrolases.

Dentre os transcritos DE com maior diferença significativa entre os grupos controle e tratamento, na resposta transcricional de *S. sclerotiorum* CEN1147 aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, destacam-se aqueles relacionados à parede celular, defesa e respiração celular.

A germinação carpopôgica de *S. sclerotiorum* CEN1147 foi reduzida significativamente pela exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado concedidas.

Referências

- Adams PB, Ayers WA. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69: 896-899.
- Amselem J, Cuomo CA, van Kan JAL, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, et al. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Plos Genetics*, 7: 1-27.
- Anders S, Pyl PT, Huber W. 2014. HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31: 166-169.
- Ashburner M, Bola CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cereja JM, Davis AP, K, Dolinski, et al. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25: 25-29.
- Barad S, Sionov E, Prusky D. 2016. Role of patulin in post-harvest diseases. *Fungal Biology Reviews*, 30: 24-32.
- Birner R, Nebauer R, Schneiter R, Daum G. 2003. Synthetic lethal interaction of the mitochondrial phosphatidylethanolamine biosynthetic machinery with the prohibitin complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 14: 370-383.
- Boland GJ, Hall R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 93-108.
- Burmester A, Shelest E, Glöckner G, Heddergott C, Schindler S, Staib P, Heidel A, Felder M, et al. 2011. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome Biology*, 12: 1-16.
- Candy L, Van Damme EJM, Peumans WJ, Menu-Bouaouiche L, Erard M, Roug P. 2003. Structural and functional characterization of the GalNAc/Gal-specific lectin from

- the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Biochemical and Biophysical Research Communications, 308: 396-402.
- Carvalho DDC, Geraldine AM, Lobo Junior M, Mello SCM. 2015. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 50: 1220-1224.
- Castillo FDH, Padilla AMB, Morales GG, Siller MC, Herrera RR, Gonzales CNA, Reyes FC. 2011. *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6: 410-417.
- Chen JL, Sun SZ, Miao CP, Wu K., Chen YW, Xu LH, Guan HL, Zhao LX. 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. Journal of Ginseng Research, 40: 315-324.
- Choi IY, Kim JH, Kim J, Han KS, Galea V, Shin HD. 2017. Confirmation of *Sclerotinia sclerotiorum* as the causal agent of stem rot of stock in Korea. Australasian Plant Disease, 12: 1-3.
- Cooney JM, Lauren DR. 1998. *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. Letters in Applied Microbiology, 27: 283-286.
- Cotton P, Kasza Z, Bruel C, Rascale C, Fevre M. 2003. Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. FEMS Microbiology Letters, 227: 163-169.
- Dalmaís B, Schumacher J, Moraga J, Le Pêcheur P, Tudzynski B, Collado IG, Viaud M. 2011. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. Molecular Plant Pathology, 12: 564-579.
- de Smidt O, du Preez JC, Albertyn J. 2008. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. FEMS Yeast Research, 8: 967-978.
- Dennis C, Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotic. Transactions British Mycological Society, 57: 41-48.

- Derbyshire M, Denton-Giles M, Hegedus D, Seifbarghy S, Rollins J, Kan J, Seidl MF, Faino I, et al. 2017. The complete genome sequence of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* reveals insights into the genome architecture of broad host range pathogens. *Genome Biology and Evolution*, 9: 593-618.
- Dichtl K, Helmschrott C, Dirr F, Wagener J. 2012. Deciphering cell wall integrity signaling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Molecular Microbiology*, 83: 506-519.
- Doughan B, Rollins JA. 2016. Characterization of MAT gene functions in the life cycle of *Sclerotinia sclerotiorum* reveals a lineage-specific MAT gene functioning in apothecium morphogenesis. *Fungal Ecology*, 120: 1105-1117.
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, et al. 2019. The Pfam Protein Families Database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47: 427-432.
- Ezzine A, Chahed H, Hannachi M, Hardouin J, Jouenne T, Marzouki MN. 2016. Biochemical and molecular characterization of a new glycoside hydrolase family 17 from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology*, 28: 1610-1621.
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18: 265-276.
- Ferreira AS, Tótola MR, Parreira AG, Borges AC. 2007. Crescimento micelial e síntese de proteínas de choque térmico em três isolados de fungos ectomicorrízicos sob condições de temperaturas supra-ótimas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31: 29-38.
- Ferreira DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039-1042.
- Fontaine T, Hartland R, Beauvais A, Diaquin M, Latge JP. 1997. Purification and characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *European Journal Biochemistry*, 243: 315-321.
- Gan P, Ikeda K, Irieda H, Narusaka M, O'Connell RJ, Narusaka Y, Takano Y, Kubo Y, et al. 2013. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *The New Phytologist*, 197: 1236-1249.

- Gan P, Tsushima A, Narusaka M, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu YKK. 2019. Genome sequence resources for four phytopathogenic fungi from the *Colletotrichum orbiculare* species complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32: 1088-1090.
- Georgious CD, Patsoukis N, Papapostolou I, Zervoudakis G. 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 691-712.
- Geraldine AM, Lopes FAC, Carvalho DDC, Barbosa ET, Rodrigues AF, Brandao RS, Ulhoa CJ, Junior ML. 2013. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 67: 308-316.
- Graham-Taylor C, Kamphuis LG, Derbyshire MC. 2020. A detailed in silico analysis of secondary metabolite biosynthesis clusters in the genome of the broad host range plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *BMC Genomics*, 21: 1-20.
- Grant CM. 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39: 533-541.
- Haddad PE, Leite LG, Lucon CMM, Harakava R. 2017. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52: 1140-1148.
- Halaouli S, Asther M, Sigoillot JC, Hamdi M, Lomascolo A. 2006. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 291-232.
- Hall N. 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *Journal of Experimental Biology*, 210: 1518-1525.
- Heinisch JJ, Dupres V, Wilk S, Jendretzki A, Dufrêne YF. 2010. Single molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *Plos One*, 5: 1-9.
- Hsu PH, Chiang PC, Liu CH, Chang YW. 2015. Characterization of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae* clinical isolates elucidates Hsp150p in virulence. *Plos One*, 10: 1-18.
- Hynes MJ, Murray SL, Andrianopoulos A, Davis MA. 2011. Role of carnitine acetyltransferases in acetyl coenzyme A metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 10: 547-555.

- Ji F, Sadreyev RI. 2018. RNA-Seq: Basic Bioinformatics Analysis. *Current Protocols in Molecular Biology* 124:1-21.
- Jones EE, Rabeendran N, Stewart A. 2015. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of cabbage by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* spp. *Biocontrol Science and Technology* 24: 1363-1382.
- Kapil R, Kapoor AS. 2005. Management of white rot of pea incited by (*Sclerotinia sclerotiorum*) using *Trichoderma* spp. and biopesticides. *Indian Phytopathology*, 58: 10-16.
- Karimi AK, Altinok HH. 2019. *In vitro* antifungal activity of *Trichoderma harzianum* rifai and PGRP strains as biocontrol agents against gray mold and white mold in eggplant. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28: 6166-6173.
- Kellens JTC, Peumans WJ. 1992. Lectins in different members of the Sclerotiniaceae. *Mycological Research*, 96: 495-502.
- Kim H, Chen C, Kabbage M, Dickman MB. 2011. Identification and characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH oxidases. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7721-7729.
- Krzewska J, Langer T, Liberek K. 2001. Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in *Saccharomyces Cerevisiae*, cooperates with Hsp70 in protein refolding. *FEBS Letters*, 489: 92-96.
- Kumar V, Dooley DM, Freeman HC, Guss JM, Harvey I, McGuirl MA, Wilce MCJ, Zuba Vilma M. 1996. Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure*, 4: 943-955.
- Kuznetsov E, Kučerová H, Váchová L, Palková Zdena. 2013. SUN family proteins Sun4p, Uth1p and Sim1p are secreted from *Saccharomyces cerevisiae* and produced dependently on oxygen level. *Plos One*, 8: 1-11.
- Le Torneau D. 1979. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*, 69: 887-890.
- Lee S, Yap M, Behringer G, Hung R, Bennett W. 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3: 1-14.
- Li B, Chen Y, Zong Y, Shang Y, Zhang Z, Xu X, Wang X, Long M, Tian S. 2019. Dissection of patulin biosynthesis, spatial control and regulation mechanism in *Penicillium expansum*. *Environmental Microbiology*, 21: 1124-1139.

- Li Y, Rao X, Mattox WW, Amos CI, Liu B. 2015. RNA-Seq analysis of differential splice junction usage and intron retentions by DEXSeq. *Plos One*, 10: 1-14.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 513-545.
- Lopes FAC, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandao RS, Monteiro VN, Lobo Junior M, Coelho ASG, Ulhoa CJ, et al. 2012. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, 116: 815-824.
- Macena AMF, Kobori NN, Mascarin GM, Vida JB, Hartman GL. 2020. Antagonism of *Trichoderma*-based biofungicides against Brazilian and North American isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion of soybean. *BioControl*, 65: 235-246.
- Maddi A, Dettman A, Fu C, Seiler S, Free SJ. 2012. WSC-1 and HAM-7 are MAPK-1 MAP kinase pathway sensors required for cell wall integrity and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Plos One*, 7: 1-10.
- Marciano P, Di Lenna PD, Magero P. 1983. Oxalic acid, cell walldegrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiological Plant Pathology*, 22: 339-345.
- Mardanov AV, Beletsky AV, Kadnikov VV, Ignatov AN, Ravin NV. 2014. Draft Genome sequence of *Sclerotinia borealis*, a psychrophilic plant pathogenic fungus. *Genome Announcements*, 2: 1-2.
- Melo BS, Voltan AR, Arruda W, Lopes FAC, Georg RC, Ulhoa CJ. 2019. Morphological and molecular aspects of sclerotial development in the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiological Research*, 229: 1-7.
- Mendgen K, Hahn M, Deising H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology*, 34: 367-386.
- Moake MM, Padilla-Zakour OI, Worobo RW. 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4: 8-21.
- Mohsenzadeh S, Saupe-Thies W, Steier G, Scroeder T, Fracella F, Ruoff P, Rensing L. 1998. Temperature adaptation of house keeping and heat shock gene expression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 25: 31-43.

- Monroe Jr DS, Leitzel AK, Hannah LK, Matson SW. 2005. Biochemical and genetic characterization of HMI1p, a yeast DNA helicase involved in the maintenance of mitochondrial DNA. *Yeast*, 22: 1269-1286.
- Nawrocka J, Szczech M, Małolepsza U. 2018. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. *Plant Protection Science*, 54: 17-23.
- Nebauer R, Schuiki I, Kulterer B, Trajanoski Z, Daum G. 2007. The phosphatidylethanolamine level of yeast mitochondria is affected by the mitochondrial components Oxa1p and Yme1p. *FEBS Journal*, 274: 6180-6190.
- Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Stanley Kim H, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, et al. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 438: 1151-1156.
- O'Brien PA. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46: 293-304.
- Ojaghian S, Wang L, Xie GL, Zhang JZ. 2019. Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 136: 1-6.
- Oliveira-Garcia E, Deising HB. 2013. Infection structure-specific expression of b-1,3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of β -glucan-triggered immunity in maize. *The Plant Cell*, 25: 2356-2378.
- Ordóñez-Valencia C, Ferrera-Cerrato R, Quintanar-Zúñiga RE, Flores-Ortiz CM, Guzman GJM, Alarcon A, Larsen J, Garcia-Barradas O. 2015. Morphological development of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum*: a view from light and scanning electron microscopy. *Annals of Microbiology*, 65: 765-770.
- Orshinsky AM, Hu J, Opiyo SO, Reddyvari-Channarayappa V, Mitchell TK, Boehm MJ. 2012. RNA-Seq analysis of the *Sclerotinia homoeocarpa*-creeping bentgrass pathosystem. *Plos One*, 7: 1-13.
- Paoletti M, Clavé C. 2007. The fungus-specific HET domain mediates programmed cell death in *Podospora anserina*. *Eukaryot Cell*, 6: 2001-2008.
- Paoletti M, Saupe SJ. 2009. Fungal incompatibility: Evolutionary origin in pathogen defense? *BioEssays*, 31: 1201-1210.
- Perazzolli M, Herrero N, Sterck L, Lenzi L, Pellegrini A, Puopolo G, Peer YV, Pertot I. 2016. Transcriptomic responses of a simplified soil microcosm to a plant pathogen

- and its biocontrol agent reveal a complex reaction to harsh habitat. *BMC Genomics*, 17: 1-18.
- Peter C, Laliberte J, Beaudoin J, Labbe S. 2008. Copper distributed by Atx1 is available to Copper Amine Oxidase 1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 7: 1781-1794.
- Planas-Portell J, Gallart M, Tiburcio AF, Altabella T. 2013. Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 13: 1-13.
- Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49: 1-76.
- Puel O, Galtier P, Oswald IP. 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*, 2: 613-631.
- Purdy LH. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69: 875-880.
- Qiu D, Xu L, Vandemark G, Chen W. 2016. Comparative transcriptome analysis between the fungal plant pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum* using RNA sequencing. *Journal of Heredity*, 107: 163-172.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26: 139-140.
- Ryder LS, Talbot NJ. 2015. Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 26: 8-13.
- Sang H, Chang HX, Chilversa MI. 2019. A *Sclerotinia sclerotiorum* transcription factor involved in sclerotial development and virulence on pea. *mSphere*, 4: 1-7.
- Sato I, Shimizu M, Hoshino T, Takaya N. 2009. The Glutathione system of *Aspergillus nidulans* involves a fungus-specific Glutathione S-Transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 8042-8053.
- Saupe S, Turcq B, Bégueret J. 1995. A gene responsible for vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina* encodes a protein with a GTP-binding motif and G β homologous domain. *Gene*, 162: 135-139.
- Schenkel D, Lemfack, MC, Piechulla B, Splivallo R. 2015. A meta-analysis approach for assessing the diversity and specificity of belowground root and microbial volatiles. *Frontier Plant Science*, 6: 1-11.

- Schmalix W, Bandlow W. 1993. The ethanol-inducible YAT1 gene from yeast encodes a presumptive mitochondrial outer carnitine acetyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 27428-27439.
- Seifbarghi S, Borha MH, Wei Y, Coutu C, Robinson JS, Hegedus DD. 2017. Changes in the *Sclerotinia sclerotiorum* transcriptome during infection of *Brassica napus*. *BMC Genomics*, 18: 1-37.
- Shaw S, Cocq KL, Paszkiewicz K, Moore K, Winsbury R, Zabala MT, Studholme DJ, Salmon D, et al. 2016. Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* GD12 during antagonistic interactions with *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Molecular Plant Pathology*, 17: 1425-1441.
- Silva LR, Valadares-Inglis MC, Moraes MCB, Magalhães DM, Sifuentes DN, Martins I, Mello SCM. 2020. Morphological and protein alterations in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary after exposure to volatile organic compounds of *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 147: 1-7.
- Smolińska U, Kowalska B, Kowalczyk W, Szczech M, Murgrabia A. 2016. Eradication of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia from soil using organic waste materials as *Trichoderma* fungi carriers. *Journal of Horticultural Research* 24: 101-110.
- Smolińska U, Kowalska B. 2018. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* - a review. *Journal of Plant Pathology*, 100: 1-12.
- Srivastava M, Kumar V, Shahid M, Pandey S, Singh A. 2016. *Trichoderma* a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 11: 310-316.
- Stefanato FL, Abou-Mansour E, Buchala A, Kretschmer M, Mosbach A, Hahn M, Bochet CG, Métraux JP, Schoonbeek HJ. 2009. The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis Thaliana*. *The Plant Journal*, 58: 499-510.
- Steindorff AS, Ramada MHS, Coelho ASG, Miller RNG, Pappas Júnior GJ, Ulhoa CJ, Noronha EF. 2014. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics*, 15: 1-14.
- Stergiopoulos I, de Wit PJGM. 2009. Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 233-63.

- Svendsen I, Hofmann T, Endrizzi J, Remington SJ, Breddam K. 1993. The primary structure of carboxypeptidase SI from *Penicillium janthinellum*. FEBS Letters, 333: 39-43.
- The Gene Ontology Consortium. 2019. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing Strong. Nucleic Acids Research, 47: 330-338.
- Tong SM, Chen Y, Zhu J, Ying SH, Feng MG. 2016. Subcellular localization of five singular WSC domain-containing proteins and their roles in *Beauveria bassiana* responses to stress cues and metal ions. Environmental Microbiology Reports, 8: 295-304.
- Van Damme EJM, Barre A, Rougé P, Peumans WJ. 2004. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. Trends Plant Science, 9: 484-489.
- Van Damme EJM, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J, Rougé P, Peumans WJ. 2007. The *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin represents a novel family of fungal lectins remotely related to the *Clostridium botulinum* non-toxin haemagglutinin HA33/A. Glycoconjugate Journal, 24: 143-156.
- van de Geijn B, McVicker G, Gilad Y, Pritchard JK. 2015. WASP: allele-specific software for robust molecular quantitative trait locus discovery. Nature Methods 12: 1061-1063.
- van Loon AP, Young ET. 1986. Intracellular sorting of alcohol dehydrogenase isoenzymes in yeast: a cytosolic location reflects absence of an amino-terminal targeting sequence for the mitochondrion. The EMBO Journal, 5: 161-165.
- Vargas WA, Mukherjee PK, Laughlin D, Wiest A, Moran-Diez ME, Kenerley CM. 2014. Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. Microbiology, 160: 2319-2330.
- Vassilev AO, Plesofsky-Vig N, Brambl R. 1992. Isolation, partial amino acid sequence, and cellular distribution of heat-shock protein hsp98 from *Neurospora crassa*. Biochimica et Biophysica Acta, 1156: 1-6.
- Walter W, Sánchez-Cabo F, Ricote M. 2015. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. Bioinformatics, 31: 2912-2914.
- Wang DN, Toyotome T, Muraosa Y, Watanabe A, Wuren T, Bunsupa S, Aoyagi K, Yamazaki M, Takino M, Kamei K. 2014. GliA in *Aspergillus fumigatus* is required for its tolerance to gliotoxin and affects the amount of extracellular and intracellular gliotoxin. Medical Mycology, 52506-518.

- Wang Y, Duan Y, Wang J, Zhou M. 2015. A new point mutation in the iron–sulfur subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to boscalid in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Plant Pathology*, 16: 653-661.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10:57-63.
- Westrick NM, Ranjan A, Jain S, Grau CR, Smith DL, Kabbage M. 2019. Gene regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* during infection of *Glycine max*: on the road to pathogenesis. *BMC Genomics*, 20: 1-22.
- Wriessnegger T, Sunga AJ, Cregg JM, Daum G. 2009. Identification of phosphatidylserine decarboxylases 1 and 2 from *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 9: 911-922.
- Wu BM, Peng YL, Qin QM, Subbarao KV. 2007. Incubation of excised apothecia enhances ascus maturation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 99: 33-41.
- Zhao H, Zhou T, Xie J, Cheng J, Chen T, Jiang D, Fu Y. 2020. Mycoparasitism illuminated by genome sequencing and digital gene expression profiling of *Coniothyrium minitans*, an important biocontrol fungus of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Molecular Biology and Genetics*, 6: 1-19.
- Zinser E, Sperka-Gottlieb CDM, Fasch EV, Kohlwein SD, Paltauf F, Daum G. 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 173: 2026-2034.

Capítulo 4

Compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma azevedoi* promovem o crescimento de plantas de alface e retardam os sintomas de mofo-branco

Resumo

A alface (*Lactuca sativa* L.), cultivada o ano inteiro, pode ser acometida por diversas doenças limitantes à produção comercial, entre as quais cita-se o mofo-branco, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. O uso de fungos antagonistas, como os do gênero *Trichoderma*, tem se mostrado uma opção de controle para o mofo-branco. Algumas espécies de *Trichoderma* são produtoras de uma diversidade de compostos orgânicos voláteis (COVs), capazes de promover o crescimento de plantas e inibir o desenvolvimento de fitopatógenos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade dos COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 em promover o crescimento de plantas e retardar os sintomas do mofo-branco, em alface cv. “Elisa” (Sakata®). Neste estudo, plantas de alface foram expostas aos COVs de CEN1241 pela técnica de placa de Petri invertida, e em sacos de tecido voal, formando uma atmosfera compartilhada. Plantas de alface também foram inoculadas com micélio de *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto por três vezes consecutivas aos COVs de CEN1241. Foram identificados, por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG/EM), 33 COVs emitidos por CEN1241. Esses COVs promoveram o crescimento das plantas e aumentaram o teor de clorofila e carotenoides. A partir da segunda geração de *S. sclerotiorum* exposto *in vitro* aos COVs de CEN1241, os sintomas do mofo-branco foram retardados e a severidade da doença diminuída.

Palavras-chave: controle biológico, fungos antagonistas, inibição micelial, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea que possui diversas qualidades nutricionais importantes para o consumo humano, como vitaminas e sais minerais (Armas et al., 2017). Embora se desenvolva melhor sob certas condições climáticas, essa folhosa tem sido cultivada o ano inteiro em diversas partes do mundo. Temperaturas entre 16 e 25 °C e umidade relativa entre 60 a 80% são consideradas ideais para a produção

dessa hortaliça. Entretanto, em tais condições, a planta pode ser afetada por diversas doenças limitantes à produção comercial (Vàsquez et al., 2017; Claerbout et al., 2019).

Entre as doenças que afetam a alface, cita-se o mofo-branco, causado pelo fungo de solo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, como uma das mais importantes, pois as plantas doentes murcham e, em seguida, apodrecem, perdendo o seu valor comercial. Trata-se de um patógeno necrotrófico capaz de infectar mais de 400 espécies de plantas, fato que o torna uma ameaça econômica para a agricultura mundial (Taylor et al., 2018). As perdas na cultura da alface podem chegar a mais de 50% da produção, principalmente em viveiros de mudas, onde ocasionam o *damping off* ou tombamento de plântulas (Clarkson et al., 2014).

Sclerotinia sclerotiorum tem alta capacidade de produzir estruturas de sobrevivência, denominados escleródios. Estes são formados por aglomerações de hifas, envolvidas por uma camada protetora de coloração escura, com alto teor de melanina. Possuem forma arredondada, alongada ou irregular, com tamanho aproximado de 2-20 x 2-30 mm (Krause-Sakate et al., 2016). Tais estruturas podem permanecer viáveis no solo por até 10 anos (Smolińska & Kowalska, 2018).

A germinação dos escleródios pode ocorrer de duas maneiras: germinação miceliogênica e carpogênica (Le Torneau, 1979). Na germinação miceliogênica, há formação de um novo micélio que irá infectar o hospedeiro, enquanto na germinação carpogênica, inicia-se o ciclo sexual do patógeno com a formação de um corpo de frutificação (apotécio), no qual são gerados os esporos do fungo, denominados ascósporos. A germinação carpogênica ocasiona maior quantidade de doença no campo, onde, em média, 1-20 apotécios são capazes de gerar até 2.000.000 de ascósporos (Wu et al., 2007).

Independentemente da cultura afetada, o manejo da doença requer a integração de vários métodos de controle que possibilitem reduzir o número de escleródios no solo e/ou impedir a formação do apotécio e a liberação dos ascósporos. O uso de biofungicidas à base de fungos do gênero *Trichoderma* Persoon tem se mostrado uma opção de controle para o mofo-branco (Geraldine et al., 2013; Carvalho et al., 2015; Smolińska & Kowalska, 2018).

Fungos do gênero *Trichoderma* estão presentes no solo e apresentam a capacidade de estabelecer uma relação benéfica com as plantas, assim, tornando-se atraentes no controle de doenças e promoção de crescimento de plantas (Nawrocka et al., 2018; Macena et al., 2020). Eles atuam contra fungos fitopatogênicos por diferentes

mecanismos, como a competição por espaço e nutrientes, o hiperparasitismo que envolve a produção de enzimas líticas, indução de resistência e a antibiose, por meio da produção de compostos secundários (Kottb et al., 2015; Chen et al., 2016; González & Fuentes, 2017; González-Pérez et al., 2018).

Algumas espécies de *Trichoderma* são produtoras de uma diversidade de compostos orgânicos voláteis (COVs), capazes de inibir fitopatógenos e promover o crescimento de plantas (Chen et al. 2016; Jalali et al., 2017). Os COVs liberados por *Trichoderma* spp. pertencem a diferentes classes químicas como as cetonas, terpenos, ésteres, álcoois, aldeídos, entre outros (Estrada-Rivera et al., 2019; Guo et al., 2019; Kaddes et al., 2019). Tais compostos são moléculas pequenas com alta volatilidade à temperatura ambiente e podem difundir-se facilmente através do solo, evidenciando-se, assim, o seu potencial de uso na agricultura. Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade dos COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 em promover o crescimento de plantas e retardar os sintomas do mofo-branco, em alface cv. “Elisa” (Sakata®).

Material e Métodos

Origem e manutenção das linhagens

Foi utilizada uma linhagem do agente de controle biológico *T. azevedoi* CEN1241 e uma do patógeno *S. sclerotiorum* CEN1147, ambas pertencentes à Coleção de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil. As culturas mantidas em nitrogênio líquido (N₂) foram reativadas em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) sintético e mantidas em tubos de ensaio com tampa de rosca, contendo 20 mL do mesmo meio, à temperatura de 6 °C. Para cada experimento, amostras retiradas desses tubos de ensaio foram cultivadas por cinco dias em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 20 mL de meio BDA.

Coleta dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241

A coleta dos COVs foi realizada usando câmaras de vidro com volume interno de 2 L. Cada uma dessas câmaras recebeu 10 placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 20 mL de meio BDA e um disco de micélio (5 mm Ø) colonizado por *T. azevedoi* CEN1241. Nesse sistema de coleta de COVs, o ar entra através de um filtro de carvão ativado, garantindo, assim, a passagem de ar purificado. A saída do ar foi realizada com o uso de

uma bomba de vácuo com vazão $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, conectada a um tubo de vidro contendo 60 mg do polímero adsorvente Porapak Q (50-80 mesh, Supelco, PA, EUA), via conexões de politetrafluoretileno (PTFE). Os COVs foram coletados por 96 horas consecutivas. Após esse período, os COVs foram eluidos dos adsorventes com 500 μL do solvente orgânico *n*-hexano e concentrados para 100 μL , com fluxo de N_2 . As amostras obtidas foram armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análise em cromatógrafo gasoso conectado ao detector de ionização de chamas (CG-DIC) e CG acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM).

Análises químicas dos COVs coletados

Para as análises quantitativas dos COVs, as amostras provenientes da coleta foram acrescidas de 1 μL do composto 16-hexadecanolactona, como padrão interno (PI), preparado na concentração de $0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em *n*-hexano destilado. Posteriormente, 1 μL de cada amostra foi injetada no CG-DIC (Agilent 7890-A, coluna apolar DB-5MS, 0,32 mm de diâmetro x 30 m de comprimento e filme de 0,25 μm , Supelco, Bellefonte, PA, EUA), usando o modo de injeção *splitless* e tendo o Hélio como gás de arraste. A temperatura inicial da rampa foi de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos, aumentando gradualmente $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto até atingir $180 \text{ }^\circ\text{C}$, e posteriormente um segundo gradiente de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto até atingir $250 \text{ }^\circ\text{C}$, na qual foi mantida por 20 minutos. A temperatura do detector foi de $270 \text{ }^\circ\text{C}$ e do injetor $250 \text{ }^\circ\text{C}$. A quantificação dos compostos liberados foi realizada por meio de comparação das áreas de cada composto em relação à área do PI. Desta forma, foi considerado o fator de resposta do detector, para todos os compostos, igual a 1. Os dados foram coletados e analisados com o *software* GC Open Lab.

Na análise qualitativa, as amostras foram injetadas no CG-EM (Agilent 5975-MSD) equipado com um analisador quadrupolar, em coluna apolar DB-5MS (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento, com filme de 0,25 μm , Supelco, Bellefonte, PA, EUA), ionização de impacto de elétrons (70 $-\text{eV}$, à temperatura de $200 \text{ }^\circ\text{C}$) e injetor no modo *splitless*. O gás Hélio foi usado como gás de arraste. Os dados foram coletados e analisados com o *software* ChemStation. A identificação dos COVs foi realizada por comparação do padrão de fragmentação dos componentes da amostra com os dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST, 2008) e também pelo cálculo do índice de retenção (IR). Para calcular o IR, uma mistura de hidrocarbonetos alcanos lineares ($\text{C}_9\text{-C}_{21}$) foi injetada nas mesmas condições descritas anteriormente. Para a confirmação final, o padrão de fragmentação e o IR dos compostos foram comparados

com os dados obtidos da co-injeção de padrões autênticos com as amostras, quando existindo estes disponíveis.

Promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em meio Murashige & Skoog, mediada por COVs de *T. azevedoi* CEN1241

Tampas de placas de Petri (60 x 15 mm) foram colocadas invertidas na extremidade de placas de Petri maiores (150 x 25 mm), as quais continham 50 mL de meio Murashige e Skoog (MS). Na superfície dessas tampas foram fixadas suas bases contendo 6 mL de meio BDA e, ao centro, fixado um disco de BDA (5 mm Ø) colonizado por *T. azevedoi* CEN1241 (Figura 2). Em seguida, foram distribuídas em cada placa maior, cinco sementes de alface, espaçadas a 26 mm. As sementes foram previamente tratadas por 1 minuto com etanol (70%), seguido de 5 minutos com hipoclorito de sódio (50%) e, então, lavadas três vezes em água Milli-Q por 30 segundos. Posteriormente, outra placa (150 x 25 mm) foi sobreposta à placa contendo o meio MS e o conjunto envolvido com parafina plástica e filme plástico transparente, formando uma atmosfera compartilhada, de acordo com adaptação da metodologia descrita por Lee et al. (2016). O tratamento controle consistiu da placa menor, contendo apenas meio BDA. O sistema foi mantido à temperatura entre 23 e 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, por 14 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 14 repetições por tratamento e repetido duas vezes. Ao final, foi avaliado o peso de massa fresca total (MFT) e tomadas as medidas de comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CRA) e largura da folha mais expandida (LFE). Foi também avaliado o teor de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides, como descrito a seguir.

As partes aéreas das cinco plantas de cada repetição foram colocadas em um tubo de ensaio contendo 15 mL de metanol por 12 horas no escuro à 25 °C. Após esse período, alíquotas de 3 mL da suspensão foram adicionadas a cubetas de vidro para leituras espectrofotométricas (Espectrofotômetro UV/VIS Lambda 25 Perkin Elmer) nos comprimentos de onda de 470, 645, 652 e 663 nm. As quantificações de clorofila a (CCa), clorofila b (CCb), clorofila total (CT) e carotenoides foram determinadas de acordo com as equações abaixo, onde A é a absorbância no comprimento de onda utilizado, conforme metodologia de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987). Os resultados obtidos foram expressos em mg.mL⁻¹.

$$CCa = 12,7 (A_{663nm}) - 2,64 (A_{645nm})$$

$$CCb = 22,9 (A_{645nm}) - 4,68 (A_{663nm})$$

$$CT = CCa + CCb$$

$$\text{Carotenoides} = 1000 (A_{470\text{nm}}) - 1,82 CCa - 104,96 \left(\frac{CCb}{198} \right).$$

Experimento de captura de CO₂

Para avaliar a possível influência do acúmulo de dióxido de carbono (CO₂) liberado pela cultura fúngica no crescimento das plantas, foi conduzido o seguinte ensaio: em sistema placa menor dentro de uma placa maior, como no ensaio anterior, plantas e fungos foram cultivadas em atmosfera compartilhada. Para tanto, uma bola de algodão estéril contendo 3 mL de hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M, foi colocada dentro de outra placa menor (Figura 2D-E), para capturar o CO₂ na forma de carbonato de potássio (K₂CO₃). No final do período de exposição (14 dias), a bola de algodão foi totalmente liofilizada e o peso seco de K₂CO₃, determinado. Os valores de K₂CO₃ foram obtidos pela diferença do peso seco da bola de algodão antes e após os 14 dias.

Promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em solo, mediada por COVs de *T. azevedoi* CEN1241

Sacos fabricados em tecido voal com dimensões de 100 x 90 mm foram preenchidos com 100 gramas do composto contendo solo e substrato (Bioplant®) na proporção de 2:1. Antes de ser misturado ao substrato, o solo foi preparado na proporção de 3:1:1 (solo, areia e esterco bovino) + 3 g.dm⁻³ de fertilizante químico (NPK 10-10-10). A cada saco contendo esse composto preparado, adicionaram-se 80 mL de água, seguindo-se autoclavagem à 120 °C por 60 minutos. Frascos de vidro com capacidade de 250 mL, previamente autoclavados, foram preenchidos com 15 mL de meio BDA. Cada frasco recebeu ao centro, um disco de BDA (5 mm Ø) colonizado por *T. azevedoi* CEN1241. O saco contendo o solo foi então fixado ao frasco autoclavado com o auxílio de um cordão de algodão, de maneira a ser mantido suspenso à 10 mm do disco de BDA. Sementes de alface foram previamente tratadas com etanol (70%) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (50%) por 5 minutos e, então, lavadas três vezes em água Milli-Q por 30 segundos. Cada saco com solo recebeu ao centro, uma semente, depositada a 5 mm de profundidade. Por fim, outro frasco de vidro autoclavado com capacidade de 250 mL foi sobreposto ao frasco contendo as sementes de alface e, então envolvidos com parafina plástica e filme plástico transparente, formando uma atmosfera compartilhada (Figura 1). No momento da semeadura e também 10 dias após a mesma, foram

adicionados 10 mL de água autoclavada para garantir boas condições de umidade. O tratamento controle foi representado por frascos contendo apenas meio BDA. O sistema foi mantido por 21 dias à temperatura entre 23 e 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 14 repetições por tratamento e repetido duas vezes. Ao final, foram avaliados peso de massa fresca total (MFT), peso de massa seca total (MST) e tomadas as medidas de comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raízes (CRA).



Figura 1. Metodologia de promoção de crescimento em saco de tecido voal preenchido com solo para plantas de alface em atmosfera compartilhada com *Trichoderma azevedoi* CEN1241.

Inibição da germinação miceliogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* CEN1147 por COVs de *T. azevedoi* CEN1241 em fase de crescimento micelial

Foram depositados 10 discos de BDA (5 mm Ø) colonizado por *S. sclerotiorum* em sacos plásticos com filtro, contendo arroz autoclavado com 60% de umidade. Após 14 dias de cultivo, os escleródios maduros foram lavados em água corrente por 10 minutos e, em seguida, tratados com etanol (70%) por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio (50%) por 3 minutos e, então, lavados três vezes em água Milli-Q por 30 segundos. Placas de Petri (150 x 25 mm) contendo 60 mL de BDA, receberam 16 desses escleródios com tamanho aproximado de 4,59-9,70 x 3,28-5,95 mm, os quais foram espaçados em 15 x 22 mm. Os escleródios foram levemente inseridos no meio BDA. Em outra placa de Petri (150 x 25 mm) contendo 60 mL de BDA, foi colocado um disco de BDA (5 mm Ø) colonizado por *T. azevedoi* CEN1241. As placas contendo antagonista e escleródios foram sobrepostas formando uma atmosfera compartilhada. O conjunto foi selado com

parafina plástica e filme plástico transparente, de forma que as placas contendo os escleródios ficassem na posição superior. A distância entre antagonista e escleródios foi de aproximadamente 28,6 mm. O tratamento controle foi representado por placas também com os escleródios, mas sem o antagonista na parte inferior. O sistema foi mantido à temperatura entre 23 e 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Ao final do ensaio, foi quantificado o número de escleródios germinados. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento e repetido duas vezes.

Inibição da germinação miceliogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* CEN1147 por COVs de *T. azevedoi* CEN1241 em fase de esporulação

Este ensaio foi realizado como no experimento anterior, porém o agente de biocontrole foi cultivado por 96 horas antes da exposição aos escleródios de *S. sclerotiorum*. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento e o ensaio foi repetido duas vezes.

Avaliação da severidade de mofo-branco em plantas de alface inoculadas com micélio de *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto por três vezes aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241

- **Cultivo das plantas de alface:** sementes de alface foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células, contendo o substrato comercial BioPlant Plus[®]. Em cada célula foram depositadas três sementes, e aos sete dias após a semeadura foi realizado um desbaste deixando apenas uma planta por célula. As bandejas receberam irrigação diária. Quando as plantas apresentavam três pares de folhas definitivas, foi realizado o transplante para vasos de polietileno de 4 L, preenchidos com a mistura de solo, areia fina e esterco bovino, na proporção 3:1:1 + 3 g.dm⁻³ de fertilizante químico (NPK 10-10-10).
- **Preparo de inóculo do patógeno exposto aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241:** *Sclerotinia sclerotiorum* foi cultivado por três gerações consecutivas em atmosfera compartilhada com o agente de biocontrole. Placas de Petri (150 x 25 mm) contendo 60 mL de meio BDA, receberam ao centro discos de BDA com micélio (5 mm Ø) colonizado por *T. azevedoi* CEN1241. Da mesma forma, em outra placa de Petri foi colocado um disco de BDA com micélio (5 mm Ø) colonizado pelo patógeno. As placas contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas formando uma atmosfera compartilhada. A distância entre as culturas foi de aproximadamente 28,6 mm. O conjunto foi selado com

filme de parafina plástica e envolvido com plástico transparente, de forma que as placas contendo o patógeno ficassem na posição superior (Dennis & Webster, 1971). O tratamento controle foi representado por placas também com *S. sclerotiorum*, mas sem o antagonista na parte inferior. O sistema foi mantido à temperatura entre 23 e 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após a total colonização do meio BDA nos tratamentos controles, tomaram-se as medidas do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess[®]). Os valores médios de inibição foram calculados com o uso da fórmula: $I = (C - T)/C \times 100$, onde I representa a porcentagem de inibição, C os valores do tratamento controle e T os valores dos tratamentos com a presença do antagonista, em milímetros. Ao final de cada exposição, discos (5 mm Ø) de BDA colonizado pelo patógeno foram coletados e utilizados para uma nova exposição *in vitro* e também inoculação nas plantas de alface *in vivo*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento e repetido duas vezes.

- **Inoculação de *S. sclerotiorum* CEN1147 em plantas de alface:** plantas de alface foram inoculadas aos 40 dias de cultivo com discos de BDA (5 mm Ø) colonizado pelo patógeno após uma, duas e três etapas de exposição aos COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241, como descrito acima. A inoculação foi realizada com o auxílio de uma alça de platina, provocando quatro ferimentos no terço inferior das plantas e fita adesiva para fixação do micélio. As plantas foram mantidas em casa de vegetação à temperatura média de 20 e 25 °C, com umidade relativa entre 80-90% e fotoperíodo aproximado de 12 horas. Além do controle positivo, neste experimento foi inserido um tratamento controle negativo, sem a inoculação do patógeno nas plantas de alface. Após sete dias da inoculação, a severidade da doença foi avaliada por quantificação de folhas com sintomas e folhas sem sintomas induzidos pelo patógeno. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento e repetido por duas vezes.

Análises estatísticas

Para a quantidade total dos COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241, foi realizado teste de normalidade e transformação logarítmica dos dados para a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), com o uso do *software* PAST (version 2.17C). Todos os dados referentes à promoção de crescimento e severidade da doença foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas,

comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Foi realizado também o desdobramento estatístico da interação: Etapa de exposição x Severidade da doença. Todas essas análises foram realizadas com o auxílio do *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

Resultados

Análises químicas dos COVs coletados

Após 96 horas de coleta, foram detectados 33 COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241, abrangendo seis classes químicas distintas: álcoois, ésteres, cetonas, compostos aromáticos, aldeídos e sesquiterpenos (Tabela 1). Dos 33 COVs detectados, 16 foram identificados e 6 foram inferidos. De acordo com a Tabela 1, o composto nº16 apresentou a maior média de emissão ($17581,75 \pm 997,50$ ng/24 h), sendo este uma cetona. Já o composto nº 18, um sesquiterpeno, apresentou a menor média de emissão dentre os compostos identificados ($1,50 \pm 1,84$ ng/24 h). A maior diversidade dos COVs foi apresentada pelos sesquiterpenos, seguida pelas cetonas, ésteres, álcoois, aromáticos e aldeídos.

Tabela 1. Compostos orgânicos voláteis emitidos por *Trichoderma azevedoi* CEN1241 em ng/24h.

Nº	Composto	IR	Classe	Média	±	Erro Padrão
1	2-Metil-1-butanol	879	Álcool	101,05	±	49,13
2	Acetato de isobutila	888	Éster	61,69	±	39,80
3	2-Metil-3-hexanona	893	Cetona	16,42	±	10,45
4	3-Metilbutilacetato	936	Éster	41,89	±	19,55
5	Acetato de 3-hidróxi-2-butanona	944	Éster	31,34	±	6,97
6	3-Hidroxibutirato	963	Éster	9,36	±	5,76
7	3-Metil-2-heptanona	973	Cetona	34,87	±	34,12
8	Composto não identificado 1	976	-	113,57	±	68,93
9	1-Octen-3-ol	985	Álcool	2012,07	±	698,04
10	3-Octanona	987	Cetona	375,96	±	47,32
11	Composto não identificado 2	1028	-	120,16	±	23,37
12	Fenilacetaldeído	1049	Aromático	401,19	±	57,60
13	Nonanal	1105	Aldeído	318,45	±	50,42
14	β-Feniletanol	1128	Aromático	5314,37	±	4143,75
15	Composto não identificado 3	1132	-	1027,34	±	1258,23
16	Composto não identificado 4	1141	Cetona	17581,75	±	997,50
17	6-Metil-5-nonen-4-ona	1326	Cetona	517,33	±	257,35
18	Composto não identificado 5	1348	Sesquiterpeno	1,50	±	1,84
19	γ-Muroleno*	1437	Sesquiterpeno	1508,68	±	387,25
20	β-Bergamoteno*	1440	Sesquiterpeno	834,30	±	122,30
21	Composto não identificado 6	1447	Sesquiterpeno	190,31	±	64,76
22	β-Farneseno	1454	Sesquiterpeno	260,02	±	66,45
23	Composto não identificado 7	1457	Sesquiterpeno	79,24	±	8,90
24	Acoradieno*	1485	Sesquiterpeno	261,04	±	13,28
25	Composto não identificado 8	1490	Sesquiterpeno	365,38	±	49,36
26	β-Bisaboleno	1512	Sesquiterpeno	274,72	±	64,15
27	Composto não identificado 9	1520	Sesquiterpeno	618,79	±	19,35
28	β-sesquifelandreno	1529	Sesquiterpeno	276,68	±	57,09
29	Composto não identificado 10	1543	Sesquiterpeno	183,87	±	49,40
30	1-Isopropil-4,8-dimetilespiro[4,5] dec-8-em-7-ol*	1681	Sesquiterpeno	1080,47	±	322,85
31	1-Isopropil-4,8-dimetilespiro[4,5] dec-8-em-7-ona (acorenona)*	1699	Sesquiterpeno	604,25	±	140,31
32	Composto não identificado 11	1763	Sesquiterpeno	488,73	±	189,01
33	Cembreno*	2010	Sesquiterpeno	105,62	±	18,43

*Compostos com identificação não confirmada. IR: Índice de Retenção.

Promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em meio Murashige & Skoog, mediada por COVs de *T. azevedoi* CEN1241

Nos dois ensaios conduzidos, as plantas expostas aos COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 apresentaram-se mais vigorosas, mais uniformes e com melhor desenvolvimento de raízes secundárias, comparadas às plantas controle (Figura 2).

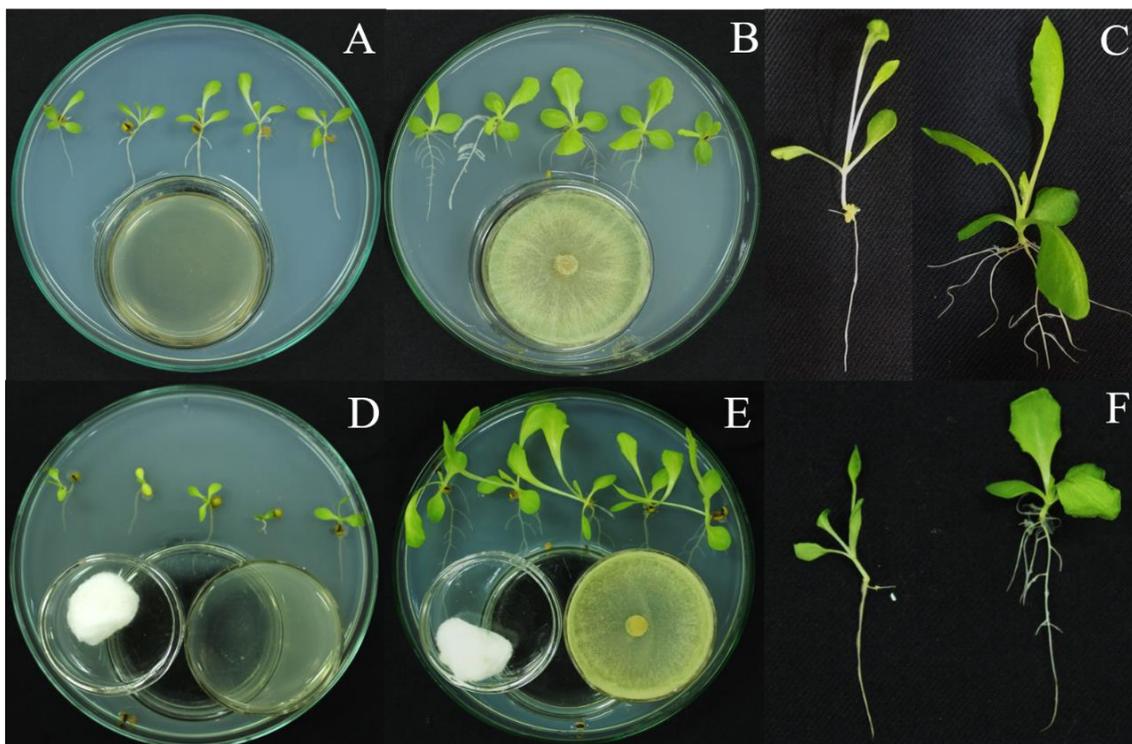


Figura 2. Plantas de alface em atmosfera compartilhada com *Trichoderma azevedoi* CEN1241 por 14 dias em meio Murashige e Skoog. **A:** Plantas controle sem KOH, **B:** Plantas sem KOH e expostas aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de CEN1241, **C:** Comparativo lado a lado de plantas não expostas e expostas aos COVs, **D:** Plantas controle na presença de KOH, **E:** Plantas na presença de KOH e expostas aos COVs, **F:** Comparativo lado a lado de plantas não expostas e expostas aos COVs.

Pelas variáveis analisadas, as plantas de alface cultivadas na presença dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 foram estatisticamente superiores quando comparadas às plantas controle (Tabela 2). Os COVs emitidos por CEN1241 aumentaram em média 133% a MFT, 30% o CPA, 28% o CRA e 86% a LFE das plantas de alface. Os resultados em meio MS também mostraram aumento de aproximadamente 98% no teor de CCa, 80% de CCb, 109% de CT e 97% para carotenoides (Figura 3).

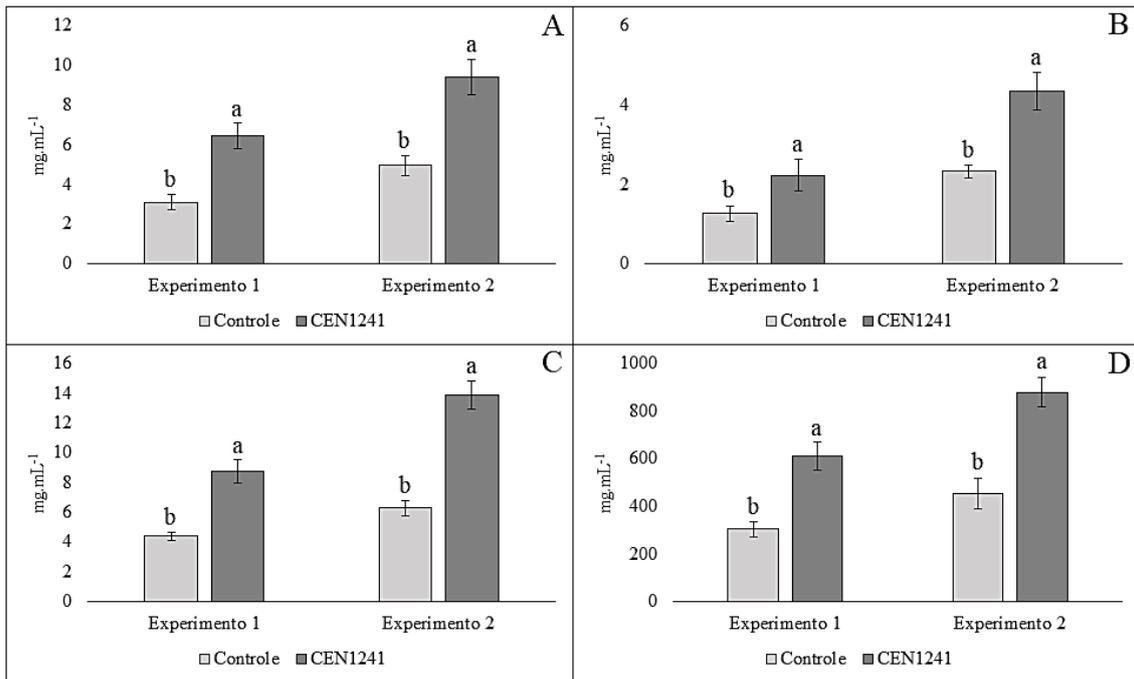


Figura 3. Teor de clorofila e carotenoides de folhas de alface cv. “Elisa” em atmosfera compartilhada com *Trichoderma azevedoi* CEN1241 por 14 dias. **A:** clorofila A, **B:** clorofila B, **C:** clorofila total, **D:** carotenoides. As barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Experimento de captura de CO₂

A utilização de KOH 0,1 M não eliminou os efeitos benéficos dos COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 sobre as plantas de alface. De maneira semelhante ao experimento sem a presença de KOH, as plantas expostas aos COVs apresentaram-se mais vigorosas, mais uniformes e com melhor desenvolvimento de raízes secundárias, quando comparadas às plantas controle (Figura 2). Pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), não se detectou diferença significativa nas concentrações de CO₂ capturado em ambas atmosferas. Na presença de *T. azevedoi* CEN1241, foi verificado $0,0021 \pm 0,0002$ g de CO₂, já para o tratamento controle $0,0018 \pm 0,0007$ g de CO₂.

Promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em solo mediada por COVs de *T. azevedoi* CEN1241

Esse ensaio foi conduzido com o objetivo de verificar a capacidade dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 em promover o crescimento das plantas em uma condição mais próxima do campo. Para que o efeito benéfico ocorresse como no experimento anterior, os COVs tiveram que permear o solo e então atingir as raízes das plantas. Esse é o primeiro estudo com esse tipo de metodologia. Ao final dos 21 dias, os dois ensaios conduzidos mostraram resultados semelhantes aos ensaios conduzidos em meio MS. As

plantas expostas aos COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 apresentaram-se mais vigorosas, mais uniformes e com melhor desenvolvimento radicular, comparadas às plantas controle (Figura 4).



Figura 4. Plantas de alface em atmosfera compartilhada com *Trichoderma azevedoi* CEN1241 por 21 dias em solo. **A:** Plantas controle, **B:** Plantas expostas aos compostos orgânicos voláteis de CEN1241.

Em todas as variáveis analisadas, as plantas de alface cultivadas na presença dos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 foram estatisticamente superiores, quando comparadas às plantas controle (Tabela 3). Os COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 foram capazes de aumentar, em 67% a MFT, 76% a MST, 21% o CPA, 41% o CRA e 30% a LFE das plantas de alface.

Tabela 2. Valores médios de Massa Fresta Total (MFT), Comprimento de Parte Aérea (CPA), Comprimento de Raiz (CRA) e Largura da Folha Expandida (LFE) de alface cultivada em meio Murashige & Skoog por 14 dias em atmosfera compartilhada com *Trichoderma azevedoi* CEN1241.

Tratamentos ⁽¹⁾	MFT (g)		CPA (mm)		CRA (mm)		LFE (mm)	
	Exp. 1 ⁽²⁾	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
CEN1241	0,06±0,007a	0,08±0,010a	32,40±4,88a	41,77±5,56a	43,10±3,91a	42,61±4,36a	9,30±0,46a	10,44±1,19a
Controle	0,03±0,002b	0,03±0,005b	26,07±3,23b	30,67±5,13b	35,22±3,23b	31,61±4,57b	5,23±0,78b	5,32±0,41b
C.V. (%)	13,46	16,77	13,99	12,76	10,70	9,15	8,68	12,60

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey (P≤0,05).

⁽²⁾ Experimentos 1 e 2.

Tabela 3. Valores médios de Massa Fresca Total (MFT), Massa Seca Total (MST), Comprimento de Parte Aérea (CPA), Comprimento de Raiz (CRA) e Largura de Folha Expandida (LFE) de alface cultivada em solo por 21 dias em atmosfera compartilhada com *Trichoderma azevedoi* CEN1241.

Tratamentos ⁽¹⁾	MFT (g)		MST (g)		CPA (mm)		CRA (mm)		LFE (mm)	
	Exp. 1 ⁽²⁾	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
CEN1241	0,88±0,12a	0,86±0,13a	0,026±0,004a	0,025±0,004a	115,4±5,31±a	110,36±5,89a	80,25±7,59a	73,65±6,52a	21,45±1,28a	19,64±1,30a
Controle	0,55±0,10b	0,49±0,15b	0,014±0,005b	0,015±0,007b	107,23±7,12b	80,56±18,21b	58,28±8,36b	50,93±9,52b	17,55±3,72b	14,41±2,65b
C.V. (%)	16,07	22,98	19,27	23,75	3,58	16,20	11,06	12,38	13,54	12,37

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey (P≤0,05).

⁽²⁾ Experimentos 1 e 2.

Inibição da germinação miceliogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* CEN1147 por COVs de *T. azevedoi* CEN1241 em fase de crescimento micelial

Nos dois ensaios conduzidos, o tratamento controle apresentou 100% de germinação miceliogênica dos escleródios após 48 horas de cultivo. A germinação miceliogênica não foi afetada pela exposição aos COVs emitidos pelo agente de biocontrole na fase de crescimento micelial, alcançando também 100% de germinação (Figura 5). Após 48 horas, já foi possível observar as colônias bem formadas em ambos os tratamentos.

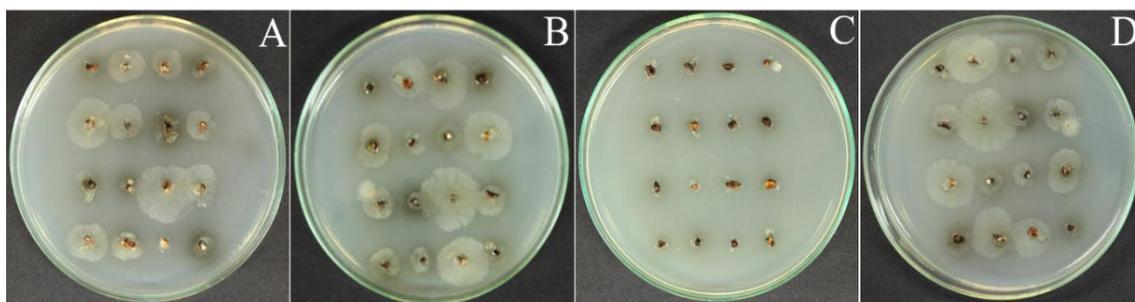


Figura 5. Germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147. **A:** Escleródios expostos aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Trichoderma azevedoi* CEN1241 em fase de crescimento micelial, **B:** Controle, **C:** Escleródios expostos aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 em fase de esporulação, **D:** Controle.

Inibição da germinação miceliogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* CEN1147 mediada por compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241 em fase de esporulação

Nos dois ensaios conduzidos, o tratamento controle apresentou 100% de germinação miceliogênica dos escleródios após 48 horas de cultivo, enquanto o tratamento com exposição aos COVs teve a germinação drasticamente afetada pela exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 na fase de esporulação (Figura 5). Nesta condição os COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 foram capazes de inibir em 100% a germinação dos escleródios.

Avaliação da severidade de mofo-branco em plantas de alface inoculadas com *S. sclerotiorum* CEN1147 exposto por três vezes aos compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* CEN1241

Nos dois ensaios conduzidos, o tratamento controle de *S. sclerotiorum* colonizou toda a superfície do meio BDA após 96 horas de cultivo. Foi observado que além da redução do crescimento micelial, as culturas de *S. sclerotiorum* expostas aos COVs de

T. azevedoi CEN1241 apresentaram menor abundância de micélio aéreo, comparado ao controle. As médias de inibição micelial na primeira exposição foram de 31,84% no primeiro experimento e 33,25% no segundo experimento (Tabela 4). Na segunda geração do patógeno exposto aos COVs, as médias de inibição micelial foram de 50,26% no primeiro experimento, e 49,07% no segundo. Já na terceira exposição não houve aumento de inibição em relação a segunda, mantendo-se os índices próximos, tanto no primeiro quanto no segundo experimento. Estatisticamente, a inibição micelial referente à primeira geração de *S. sclerotiorum* com exposição aos COVs, foi inferior às duas subsequentes, em ambos os experimentos.

Tabela 4. Inibição micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147 após três exposições aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241.

Tratamentos	Inibição micelial (%) ⁽¹⁾	
	Experimento 1	Experimento 2
CEN1147 (primeira exposição)	31,84b	33,25b
CEN1147 (segunda exposição)	50,26a	49,07a
CEN1147 (terceira exposição)	50,70a	49,74a
C.V. (%)	1,69	1,49

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Houve 100% de incidência de mofo-branco nas plantas inoculadas com *S. sclerotiorum*, contudo, sendo observados níveis de severidade diferentes, independentemente do tratamento, exceto para o controle negativo. As plantas do controle positivo mostraram sintomatologia de mofo-branco 48 horas após inoculação (HAI) e no momento da avaliação apresentaram 100% de severidade (plantas mortas) em todos os experimentos conduzidos.

A primeira exposição aos COVs mostrou não alterar o comportamento do patógeno. Nos dois experimentos conduzidos, as plantas inoculadas com micélio do patógeno exposto e não exposto aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 apresentaram sintomas de murcha, podridão e presença do micélio branco cotonoso (Figura 6), culminando em morte. Independentemente do tratamento, os primeiros sintomas foram observados 48 HAI.

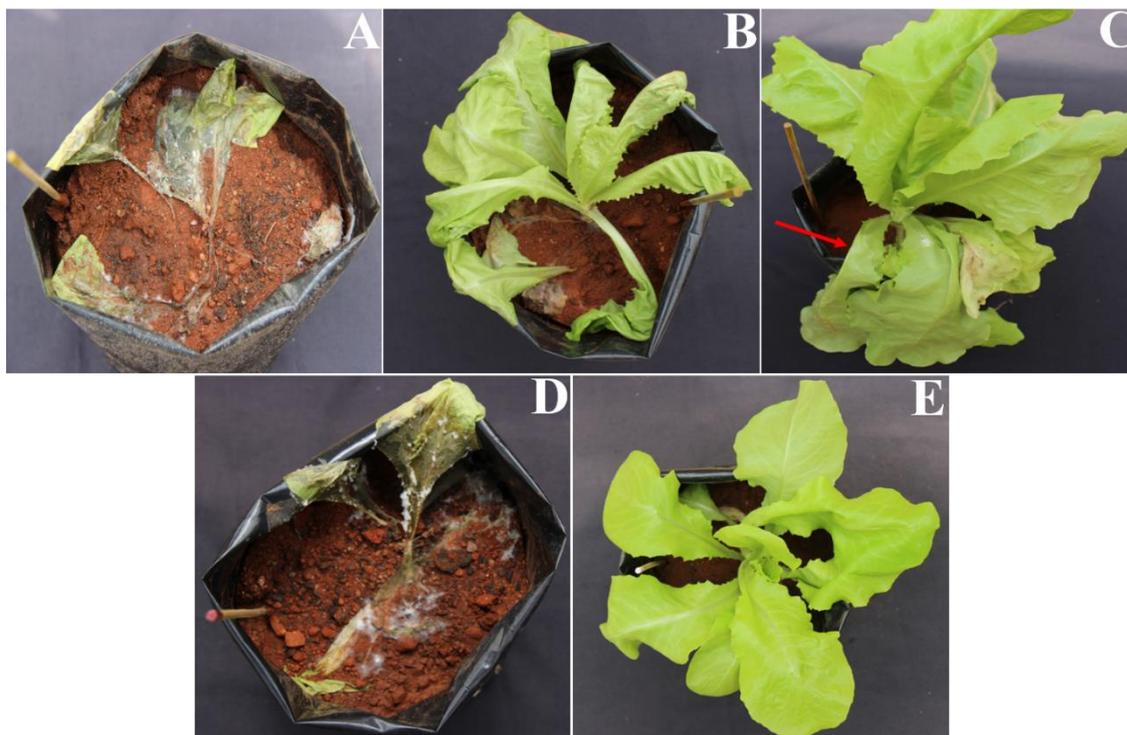


Figura 6. Severidade de mofo-branco em plantas de alface após sete dias de inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147. **A:** Inoculação com micélio da primeira geração do patógeno exposto aos COVs de *Trichoderma azevedoi* CEN1241, **B:** Inoculação com micélio da segunda geração do patógeno exposto aos COVs de CEN1241 **C:** Inoculação com micélio da terceira geração do patógeno exposto aos COVs de CEN1241, **D:** Controle positivo, **E:** Controle negativo.

Nos experimentos referentes à segunda exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, foi possível observar um atraso no surgimento dos sintomas (Figura 6). As plantas que foram inoculadas com o micélio exposto pela segunda vez, exibiram os primeiros sintomas 72 HAI. No primeiro experimento cinco plantas morreram e, no segundo, as plantas mostravam sintomas, porém nenhuma planta estava morta no momento da avaliação.

Na terceira exposição foi observado retardo ainda maior no surgimento dos sintomas. As plantas inoculadas com micélio de *S. sclerotiorum* após exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, em três ciclos de cultivo, mostraram sintomas 96 HAI. Além disso, esses sintomas eram menos severos quando comparados ao controle positivo e às exposições 1 e 2 (Figura 6).

Em relação ao desdobramento estatístico, observou-se interação significativa para as etapas de exposição 1, 2 e 3 e severidade da doença (Tabela 5). A terceira geração foi a que exibiu menor severidade de mofo-branco nas plantas de alface, com média de 19,39% para o primeiro experimento e 22,95% para o segundo, diferindo estatisticamente da primeira e segunda gerações. Houve diferença significativa entre a primeira e a

segunda, porém os valores de severidade da doença na segunda exposição foram elevados, com médias de 70,82% de severidade para o primeiro experimento e 42,34% para o segundo experimento.

Tabela 5. Severidade de mofo-branco em plantas de alface após três exposições (Expos.) aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma azevedoi* CEN1241.

Tratamentos	Severidade da doença (%) ⁽¹⁾					
	Experimento 1			Experimento 2		
	1ª Expos.	2ª Expos.	3ª Expos.	1ª Expos.	2ª Expos.	3ª Expos.
CEN1241	100aA	70,82bB	19,39bC	100aA	42,34bB	22,95bC
Controle Pos.	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
Controle Neg.	0,0bA	0,0cA	0,0cA	0,0bA	0,0cA	0,0cA
C.V. (%)	0,00	31,37	13,84	0,00	42,40	26,27

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A colheita das plantas foi realizada aos 65 dias de cultivo. A colheita de todas as plantas só foi possível no controle negativo. As plantas desse tratamento apresentaram em média 105 gramas. No tratamento exposto por duas vezes aos COVs, apenas uma planta pesando 78 gramas resistiu à infecção causada por *S. sclerotiorum* e não havia morrido no momento da colheita, porém apresentava-se com severos sintomas de mofo-branco. Já na terceira exposição, no experimento 1, remanesceram cinco plantas, com média de 85,42 gramas e quatro plantas no experimento 2, com média 101,4 gramas. Mesmo com menor severidade de doença no momento da avaliação, ao final do ciclo, 55% das plantas estavam mortas. As plantas remanescentes possuíam sintomas de murcha e início de podridão nas folhas mais próximas do ponto de inoculação.

Discussão

A gama de COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 está em conformidade com outros estudos que indicaram a diversidade de COVs produzidos por espécies desse gênero de fungo (Chen et al., 2016; Estrada-Rivera et al., 2019; Guo et al., 2019). Curiosamente, não identificamos em *T. azevedoi* CEN1241, o composto 6-pentil- α -pirona (6PP) e nenhum outro COV pertencente à classe das pironas. O 6PP é um dos mais conhecidos COVs emitido por *Trichoderma* spp. e alguns estudos demonstraram sua capacidade de inibir o crescimento de fitopatógenos e promover o crescimento de plantas (Kottb et al., 2015; Garnica-Vergara et al., 2016; Nieto-Jacobo et al., 2017; Estrada-Rivera et al., 2019). Outros COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 já foram relatados em estudos anteriores com *Trichoderma* spp., a exemplo de 3-Metilbutil acetato, 3-

Octanona, Nonanal, β -Farneseno, β -Bisaboleno, β -Sesquifelandreno (Lee et al, 2016); 1-Octen-3-ol, 3-Octanona (Nieto-Jacobo et al., 2017); 1-Octen-3-ol, 3-Octanona, β -Sesquifelandreno (Estrada-Rivera et al., 2019); β -Bisabolene, β -Sesquifelandreno, γ -Muroлено e Acoradieno; (Guo et al., 2019). A diversidade dos COVs emitidos por *Trichoderma* spp. está relacionada à biossíntese desses metabólitos secundários, sendo esta, modulada pelas condições ambientais e/ou experimentais, espécies e/ou linhagens do fungo (Lopes et al., 2012; Guo et al., 2019) ou à medida em que o fungo se desenvolve e inicia o processo de esporulação (Lee et al., 2016).

A capacidade de microrganismos de solo, como fungos e bactérias, de produzir COVs que melhoram o crescimento e aumentam a biomassa das plantas já foi descrito anteriormente com o cultivo das plantas em meio artificial (Blom et al., 2011; Nieto-Jacobo et al., 2017; Wonglom et al., 2020). Verificou-se aqui a necessidade de demonstrar que os COVs podem permear o solo e estabelecer uma relação benéfica com as plantas, promover o crescimento e aumento da biomassa. A metodologia descrita neste trabalho, usando sacos de tecido voal preenchidos com solo, torna-se pioneira para tal objetivo, uma vez que os estudos conduzidos em meio MS são menos abrangentes do que uma situação real em nível de campo, pois a atmosfera compartilhada em placas com meio MS facilita o contato entre COVs e raízes, o que não acontece de maneira tão simplificada em condições naturais.

Neste estudo, *T. azevedoi* CEN1241 produziu um arsenal de COVs capazes de promover significativamente o crescimento de plantas de alface em meio MS e em solo. O potencial dos COVs emitidos por *Trichoderma* spp. em promover o crescimento de plantas, como no caso estudado neste trabalho, pode estar relacionado ao aumento na síntese de hormônios vegetais como auxinas e etileno (Estrada-Rivera et al., 2019). As auxinas são importantes no desenvolvimento vegetal e estão associadas com funções vitais da planta, como divisão, multiplicação e alongamento celular. Já o etileno pode reorganizar as microfibrilas da parede celular. Essa reorganização reduz o crescimento em altura e proporciona maior crescimento radial dos tecidos vegetais, tornando-os mais vigorosos (Taiz & Zeiger, 2013). Essas informações da literatura nos ajudam a compreender melhor os resultados encontrados com *T. azevedoi* CEN1241, em relação ao crescimento das plantas de alface expostas aos COVs liberados pelo fungo no ambiente. Ressalta-se ainda a importância do manejo adequado do solo para obtenção dos benefícios para as plantas advindos do uso de *Trichoderma* na agricultura. Diante disso, o solo dos experimentos com sacos de tecido voal foi peneirado e manuseado de forma a

proporcionar boa aeração, facilitando assim, a difusão dos COVs e o posterior contato desses metabólitos com as plantas de alface.

Os COVs de *T. azevedoi* CEN1241 também aumentaram o teor de clorofila e carotenoides das plantas de alface. Similar a este estudo, outros autores já demonstraram esse atributo dos COVs de *Trichoderma* spp., verificado com as espécies *Solanum lycopersicum* (Lee et al., 2016), *Arabidopsis thaliana* (Nieto-Jacobo et al., 2017) e *L. sativa* (Wonglom et al., 2020). Os COVs sintéticos 3-metil-1-butanol, limoneno e acetoína aumentaram a concentração de clorofila em plantas de *A. thaliana* em comparação com o controle (Hung et al., 2014). Fisiologicamente, as clorofilas participam da fase fotoquímica da fotossíntese, contribuindo diretamente para produção de energia química na forma Adenosina Trifosfato (ATP) e Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH). Essas duas moléculas juntamente com o CO₂ são subsídios para que ocorra a fase bioquímica da fotossíntese, em sequência a produção de glicose e, por fim, o crescimento vegetal (Taiz & Zeiger, 2013). Estudos têm demonstrado que diversos COVs de microrganismos capazes de promover ações benéficas para as plantas foram também relatados em perfis de COVs de espécies vegetais (Mohanta et al., 2012; Llorens et al., 2016). Isso reforça a teoria de que os COVs emitidos por *Trichoderma* spp. e outros microrganismos presentes no solo atuam como mediadores das relações bioquímicas dos mesmos com os vegetais e, conseqüentemente, podem desencadear respostas capazes de estimular o crescimento de plantas (Hung et al., 2014; Kanchiswamy et al., 2015; Kaddes et al., 2019).

Estudos sobre a capacidade dos COVs de microrganismos promoverem o crescimento das plantas devem ser capazes de assegurar que a promoção do crescimento não ocorra por eventuais efeitos de maiores concentrações de CO₂ liberado pelos microrganismos na atmosfera compartilhada (Kai & Piechulla, 2009; Jalali et al., 2017). Isso deve ser mais evidenciado em plantas com o mecanismo fotossintético C₃, como a alface. As plantas C₃ possuem em seu metabolismo de fixação de CO₂, a enzima Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase Oxigenase (RuBisCo). Essa enzima possui menor afinidade com o CO₂ em comparação com a enzima PEP Carboxilase (PEPcase) presentes nas plantas com mecanismo fotossintético C₄ (Taiz & Zeiger, 2013). Diante disso, poderíamos inferir que o CO₂ liberado por *T. azevedoi* CEN1241 durante os 14 dias de ensaio proporcionaria maiores taxas de fixação de CO₂ pelas plantas de alface, em consequência, contribuindo para crescimento das mesmas. Entretanto, as concentrações de CO₂ encontradas foram semelhantes em ambos tratamentos aqui testados. Nossos

resultados mostraram que a captura do CO₂ através do KOH também não foi capaz de reduzir os efeitos benéficos observados pelos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 nas plantas de alface. De maneira similar, Lee et al. (2016) e Jalali et al. (2017) também não encontraram diferenças nas concentrações de CO₂ e nos efeitos benéficos observados em *A. thaliana*.

Os escleródios produzidos por *S. sclerotiorum* são a principal fonte de inóculo do patógeno e desempenham um papel importante no aumento da incidência do mofo-branco no campo (Ordóñez-Valencia et al., 2015; Smolińska & Kowalska, 2018). Já foi demonstrado anteriormente a capacidade dos COVs de *Trichoderma* em reduzir a germinação miceliogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum* (Ojaghian et al., 2019). Entretanto, no presente estudo, os COVs liberados por *T. azevedoi* CEN1241 na fase de crescimento micelial, não foram capazes de inibir a germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum*. Os escleródios germinaram muito rapidamente e, nesse curto período de tempo, as colônias de *T. azevedoi* CEN1241 possivelmente ainda não expressavam todo o arsenal de COVs necessários para inibir a germinação miceliogênica. Nemcovic et al. (2008) inferem que a transição do crescimento vegetativo para a fase de esporulação, em muitos fungos, é marcada pelo aumento da produção de metabólitos secundários. Outros autores postulam que o perfil de COVs é característico para cada espécie de fungo, porém pode ser alterado com as condições nutricionais do substrato de cultivo, durante interação antagonica com outros fungos e a idade da cultura fúngica (Bruce et al., 1996; Hynes et al., 2007).

Neste trabalho, optou-se por utilizar culturas de *T. azevedoi* CEN1241 com 96 horas de cultivo, de forma que a colônia estivesse com esporulação intensa no momento inicial do ensaio. Nessa condição, curiosamente, a inibição da germinação miceliogênica dos escleródios foi de 100%, demonstrando bastante divergência entre as duas condições aqui testadas. *Sclerotinia sclerotiorum* é conhecido por possuir rápido crescimento vegetativo, fato que pode dificultar a ação do agente de biocontrole. Os fungicidas biológicos requerem um tempo para se estabelecerem no solo, desenvolvendo a fase vegetativa e reprodutiva antes de ativarem os mecanismos de ação contra os patógenos (Machado et al., 2012; Mutawila et al., 2016; O'Brien, 2017). Dessa forma, podemos inferir que a aplicação preventiva do agente de biocontrole poderia gerar melhores resultados no controle do mofo-branco, por exemplo, na forma de tratamento de sementes (Carvalho et al., 2011; Macena et al., 2020).

A metodologia de exposição *in vitro* de *S. sclerotiorum* aos COVs com posterior inoculação nas plantas de alface é descrita pela primeira vez no presente estudo e os resultados apresentados mostram que exposições de gerações sucessivas do patógeno aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241 podem afetar a sua agressividade e reduzir a severidade de mofo-branco. No estudo de Silva et al. (2020) foi demonstrado que os COVs de *T. azevedoi* CEN1241 reduzem a largura das hifas de *S. sclerotiorum*. A partir desses resultados, infere-se que os COVs podem enfraquecer o patógeno e dificultar o processo infectivo nas plantas. O potencial de *Trichoderma* spp. no controle *Sclerotinia* spp. em alface já foi descrito anteriormente (Rabeendran et al., 2006; Elias et al., 2016). Entretanto, esses resultados foram alcançados por metodologias que demonstram o mecanismo de hiperparasitismo de *Trichoderma*. Os resultados encontrados no presente estudo reforçam que a capacidade de biocontrole de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* pode ocorrer também pelo mecanismo de antibiose, através da emissão de COVs. Curiosamente, a maioria dos estudos sobre COVs de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos têm mostrado resultados apenas em condições *in vitro*, limitando a abordagem do mecanismo de antibiose à observação diretamente sobre o patógeno (Castillo et al., 2011; Kottb et al., 2015; Ojaghian et al., 2019), fato até recentemente justificado pela dificuldade de condução de ensaios *in vivo*.

Estudos futuros devem ser conduzidos a fim de elucidar cada vez mais o papel dos COVs no controle de doenças de plantas. Novas tecnologias, como o uso de nanopartículas que proporcionem a liberação lenta dos COVs em condições de campo, poderão responder algumas das inúmeras perguntas sobre esse mecanismo de ação de *Trichoderma*. A importância deste e de novos estudos sobre controle biológico se fazem necessários, principalmente levando-se em conta que culturas de ciclo curto como alface, são passíveis de chegarem ao mercado consumidor com taxas elevadas de resíduos de fungicidas sintéticos.

Conclusão

Os COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 promovem o crescimento de plantas de alface e aumentam o teor de clorofila e carotenoides.

Os COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 durante a fase de esporulação apresentam alto potencial para inibir a germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum* CEN1147.

A partir da segunda geração de *S. sclerotiorum* CEN1147 sob exposição *in vitro* aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, os sintomas do mofo-branco em alface são retardados e a severidade da doença é diminuída.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado concedidas.

Referências

- Armas I, Pogrebnyak N, Raskin I. 2017. A rapid and efficient *in vitro* regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Methods*, 13: 1-9.
- Arnon DJ. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- Blom D, Fabbri C, Connor EC, Schiestl FP, Klauser DR, Boller T, Eberl L, Weiskopf L. 2011. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental Microbiology*, 13: 3047-3058.
- Bruce A, Kunzewicz A, Wheatley RE. 1996. Influence of culture age on the volatile organic compounds produced by *Trichoderma aureoviride* and associated inhibitory effects on selected wood decay fungi. *Material und Organismen*, 30: 79-84.
- Carvalho DDC, Geraldine AM, Lobo Junior M, Mello SCM. 2015. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50: 1220-1224.
- Carvalho DDC, Mello SCM, Lobo Júnior M., Geraldine AM. 2011. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 822-828.
- Castillo FDH, Padilla AMB, Morales GG, Siller MC, Herrera RR, Gonzales CNA, Reyes FC. 2011. *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 6: 410-417.

- Chen JL, Sun SZ, Miao CP, Wu K, Chen YW, Xu LH, Guan HL, Zhao LX. 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40: 315-324.
- Claerbout J, Decombel A, Volckaert A, Venneman S, Vandeveldel I, Bleyaert P, Neukermans J, Viaene N, Höfte M. 2019. Glasshouse-specific occurrence of basal rot pathogens and the seasonal shift of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups in lettuce. *European Journal of Plant Pathology*, 155: 841-858.
- Clarkson JP, Fawcett L, Anthony SG, Young C. 2014. A model for *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce, based on the effects of temperature, relative humidity and ascospore density. *Plos One*, 41: 1-14.
- Dennis C, Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotic. *Transactions British Mycological Society*, 57: 41-48.
- Elias LM, Domingues MVPF, Moura KE, Harakava R, Patrício FRA, 2016. Selection of *Trichoderma* isolates for biological control of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* in lettuce. *Summa Phytopathologica*, 42: 216-221.
- Estrada-Rivera M, Rebolledo-Prudencio OG, Pérez-Robles DA, Rocha-Medina MADC, González-López MDC, Casas-Flores S. 2019. *Trichoderma* Histone Deacetylase HDA-2 modulates multiple responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 179: 1343-1361.
- Ferreira DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 1039-1042.
- Garnica-Vergara A, Barrera-Ortiz S, Muñoz-Parra E, Raya-González J, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, Ruiz-Herrera LF, López-Bucio J. 2016. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, 209: 1496-1512.
- Geraldine AM, Lopes FAC, Carvalho DDC, Barbosa ET, Rodrigues AF, Brandao RS, Ulhoa CJ, Junior ML. 2013. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 67: 308-316.

- González FH, Fuentes MN. 2017. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciências Agrícolas*, 34: 17-31.
- González-Pérez E, Ortega-Amaro MA, Salazar-Badillo FB, Bautista E, Douterlungne D, Bremont JFJ. 2018. The *Arabidopsis-Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific Reports*, 8: 1-14.
- Guo Y, Ghirardo A, Weber B, Schnutzier JP, Philip Benz J, Rosenkranz M. 2019. *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1-15.
- Hung R, Lee S, Rodriguez-Saona C, Bennett JW. 2014. Common gas phase molecules from fungi affect seed germination and plant health in *Arabidopsis thaliana*. *AMB Express*, 4: 1-7.
- Hynes J, Müller CT, Jones TH, Boddy L. 2007. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 43-57.
- Jalali F, Zafari D, Salari H. 2017. Volatile organic compounds of some *Trichoderma* spp. increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Ecology*, 29: 67-75.
- Kaddes A, Fauconnier ML, Sassi K, Nasraoui B, Jijakli MH. 2019. Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules*, 24: 1-15.
- Kai M, Piechulla B. 2009. Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles - an effect of CO₂? *FEBS Letters*, 583: 3473-3477.
- Kanchiswamy CN, Malnoy M, Maffei ME. 2015. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends in Plant Science*, 20: 1-7.
- Kottb M, Gigolashvili T, Großkinsky DK, Piechulla B. 2015. *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-14.
- Krause-Sakate R, Pavan MA, Moura MF, Kurozawa C. 2016. Doenças da alface. In: Amorim L, Bergamim Filho A, Rezende JAM, Camargo LEA. *Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. Volume 2. 5ª edição. Ouro Fino-MG. Agrônoma Ceres. p.33-40.*
- Le Torneau D. 1979. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*, 69: 887-890.

- Lee S, Yap M, Behringer G, Hung R, Bennett W. 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3: 1-16.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer L, Douce R. (Eds). *Methods in enzymology*. Academic Press, 148: 350-382.
- Llorens E, Camañes G, Lapeña L, García-Agustín P. 2016. Priming by hexanoic acid induce activation of mevalonic and linolenic pathways and promotes the emission of plant volatiles. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-12.
- Lopes FAC, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandão RS, Monteiro VN, Lobo Júnior M, Coelho ASG, Ulhoa CJ, Silva RN. 2012. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, 116: 815-824.
- Macena AMF, Kobori NN, Mascarin GM, Vida JB, Hartman GL. 2020. Antagonism of *Trichoderma*-based biofungicides against Brazilian and North American isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion of soybean. *BioControl*, 65: 235-246.
- Machado DFM, Parzianello FR, Da Silva ACF, Antonioli ZI. 2012. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 35: 274-288.
- Mohanta TK, Occhipinti A, Atsbaha Zebelo S, Foti M, Fliegmann J, Bossi S, Maffei ME, Berteza CM. 2012. *Ginkgo biloba* responds to herbivory by activating early signaling and direct defenses. *Plos One*, 7: 1-14.
- Mutawila C, Vinale F, Halleena F, Lorito M, Mostert L. 2016. Isolation, production and *in vitro* effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathology*, 65: 104-113.
- Nawrocka J, Małolepsza U, Szymczak K, Szczech M. 2018. Involvement of metabolic components, volatile compounds, PR proteins, and mechanical strengthening in multilayer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. *Protoplasma*, 255: 359-373.
- Nemcovic M, Jakubikova L, Viden I, Farkas V. 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 284: 231-236.

- Nieto-Jacobo MF, Steyaert JM, Salazar-Badillo FB, Vi Nguyen D, Rostás M, Braithwaite M, De Souza JT, Jimenez-Bremont JF, Ohkura M, Stewart A, Mendoza-Mendoza A. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers Plant Science*, 8: 1-18.
- O'Brien PA. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46:293-304.
- Ojaghian S, Wang L, Xie GL, Zhang JZ. 2019. Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 136: 1-6.
- Ordóñez-Valencia C, Ferrera-Cerrato R, Quintanar-Zúñiga RE, Flores-Ortiz CM, Guzmán GJM, John AA, García-Barradas O. 2015. Morphological development of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum*: a view from light and scanning electron microscopy. *Annals of Microbiology*, 65: 765-770.
- Rabeendran N, Jones EE, Moot DJ, Stewart A. 2006. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. *Biological Control*, 39: 352-362.
- Silva LR, Valadares-Inglis MC, Moraes MCB, Magalhães DM, Sifuentes DN, Martins I, Mello SCM. 2020. Morphological and protein alterations in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary after exposure to volatile organic compounds of *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 147: 1-7.
- Smolińska U, Kowalska B. 2018. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* - a review. *Journal of Plant Pathology*, 100: 1-12.
- Taiz L, Zeiger E. 2013. *Plant Physiology*. 5^o ed. Sinauer. Sunderland. 952 p.
- Taylor A, Rana K, Handy C, Clarkson JP. 2018. Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in wild *Brassica* species and the importance of *Sclerotinia subarctica* as a *Brassica* pathogen. *Plant Pathology*, 67: 433-444.
- Vàsquez H, Ouhibia C, Lizzia Y, Azzouza N, Forgesa M, Bardinc M, Nicotc P, Urbana L, Aarroufa J. 2017. Pre-harvest hormetic doses of UV-C radiation can decrease susceptibility of lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.) to *Botrytis cinerea* L. *Scientia Horticulturae*, 222: 32-39.
- Wonglom P, Ito S, Sunpapao A. 2020. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity,

defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). *Fungal Ecology*, 43: 1-10.

Wu BM, Peng YL, Qin QM, Subbarao KV. 2007. Incubation of excised apothecia enhances ascus maturation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 99: 33-41.

Conclusões Gerais

1. Todas as linhagens de *Trichoderma* estudadas foram capazes de inibir o crescimento micelial e reduzir a largura das hifas de *S. sclerotiorum* CEN1147, pela produção de COVs. Os componentes moleculares diferenciais do patógeno foram mais suprimidos em exposição aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241.
2. A inibição micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147 por COVs emitidos por *Trichoderma* spp. foi mais evidenciada ao se utilizar as metodologias de esporulação e pareamento com o patógeno. A maior produção de conídios de *T. lentiforme* CEN1416 não está relacionada à maior capacidade de inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* CEN1147, pela produção de COVs.
3. Os dados de RNA-Seq gerados pelo sequenciamento de próxima geração de milhões de leituras curtas do RNA de *S. sclerotiorum* CEN1147 mostraram que os COVs de *T. azevedoi* CEN1241 alteram significativamente a expressão de cerca de 840 transcritos. Dentre os transcritos DE com maior diferença significativa entre os grupos controle e tratamento, na resposta transcricional de *S. sclerotiorum* CEN1147 aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, destacam-se aqueles relacionados à parede celular, defesa e respiração celular.
4. Os COVs emitidos por *T. azevedoi* CEN1241 promovem o crescimento de plantas de alface. A partir da segunda geração de *S. sclerotiorum* CEN1147 sob exposição *in vitro* aos COVs de *T. azevedoi* CEN1241, os sintomas do mofo-branco em alface são retardados e a severidade da doença é diminuída.

Anexos

Anexo 1. Artigo científico referente ao Capítulo 1.

Biological Control 147 (2020) 104279

Contents lists available at ScienceDirect

Biological Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybcon

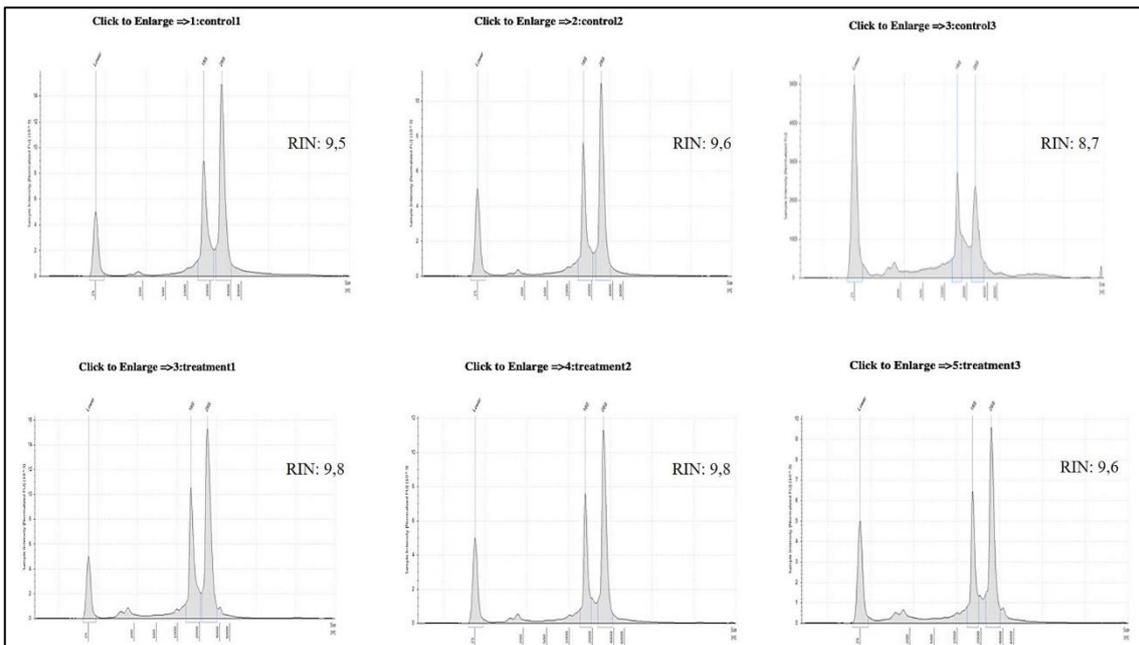
Morphological and protein alterations in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary after exposure to volatile organic compounds of *Trichoderma* spp.

Lincon Rafael da Silva^a, Maria Cléria Valadares-Inglis^b, Maria Carolina Blassioli Moraes^b, Diego Martins Magalhães^b, Daniel Nogoceke Sifuentes^b, Irene Martins^b, Sueli Corrêa Marques de Mello^{b,*}

^a Department of Phytopathology, University of Brasília, Brasília/Federal District, Brazil
^b Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília/Federal District, Brazil



Anexo 2. Dados referentes ao Capítulo 3. Análise de qualidade das amostras por eletroforese automática (Bioanalyzer). Integridade de RNA indicada por valores de RIN (*RNA integrity number*).



Anexo 3. Artigo científico referente ao Capítulo 4.

Biological Control xxx (xxxx) xxx-xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Biological Control

journal homepage: <http://ees.elsevier.com>

Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma azevedoi* promote the growth of lettuce plants and delay the symptoms of white mold

Lincon Rafael da Silva^a, Maria Cléria Valadares-Inglis^b, Gustavo Henrique Silva Peixoto^a,
Bruna Eliza Gonçalves de Luccas^a, Paulo Henrique Pereira Costa Muniz^c, Diego Martins Magalhães^b,
Maria Carolina Blassioli Moraes^b, Sueli Corrêa Marques de Mello^{b,*}

^a Department of Phytopathology, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil
^b Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Federal District, Brazil
^c Department of Phytopathology, State University of Goiás, Ipameri, Goiás, Brazil