



Trichoderma: SUAS INTERAÇÕES E UMA ABORDAGEM METODOLÓGICA APLICADA AO ESTUDO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PARA O MOFO-BRANCO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Lincon Rafael da Silva^{1,3}; Ana Beatriz Zacaroni¹; Paulo Henrique Pereira Costa Muniz²; Amanda Silva Botelho³; Sueli Corrêa Marques de Mello^{1*}

RESUMO

Várias espécies de *Trichoderma* são reconhecidamente capazes de estabelecer interações benéficas com as plantas. Essas interações são complexas e envolvem diferentes mecanismos e modos de ação que podem atuar individualmente ou em conjunto. A produção de metabólitos secundários, entre os quais, compostos orgânicos voláteis (COVs) está implicada nessas interações e centenas desses compostos foram detectados e caracterizados. Metodologias para avaliar o papel dos COVs de *Trichoderma* no controle biológico e na promoção de crescimento de plantas são algumas das dificuldades para os estudos no tema. Essa revisão apresenta uma sumarização de avanços nos conhecimentos dos COVs de *Trichoderma* e metodologias/adaptações para avaliar os efeitos desses compostos na seleção de linhagens para o controle biológico. A ação desses COVs é mencionada principalmente para *Sclerotinia sclerotiorum*, um destrutivo patógeno da agricultura mundial. Além disso, nesta revisão, são apresentadas possíveis classes químicas e COVs isolados que possuem capacidade de promover o crescimento de plantas.

PALAVRAS-CHAVE: Controle Biológico, *Sclerotinia sclerotiorum*, Fungo antagonista, Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Several *Trichoderma* species are known to be able to establish beneficial interactions with plants. These interactions are complex and involve different mechanisms and modes of action that can act individually or together. The production of secondary metabolites, including volatile organic compounds (VOCs) is involved in these interactions and these compounds have been detected and characterized. Methodologies to evaluate the role of VOCs from *Trichoderma* in the biological control and in the plant growth promotion are some of the difficulties to study the subject. This review summarizes advances in knowledge of VOCs from *Trichoderma* and the methodologies/adaptations to evaluate the effects of VOCs in the selection of strains for biological control. The action of these VOCs is mainly mentioned for *Sclerotinia sclerotiorum*. This review also shows the possible classes and VOCs, which have the capacity to promote plant growth.

KEYWORDS: Biological control, *Sclerotinia sclerotiorum*, Antagonistic fungus, Secondary metabolites.

***Trichoderma*: ITS INTERACTIONS AND A METHODOLOGICAL APPROACH APPLIED TO THE STUDY OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS TO WHITE MOLD AND PLANT GROWTH PROMOTION**

¹Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/Distrito Federal, Brasil. ²Laboratório de Fitopatologia, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri/Goiás, Brasil. ³Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília/Distrito Federal, Brasil. *Autor para correspondência: sueli.mello@embrapa.br

1. Aspectos gerais de *Trichoderma* e seu potencial de uso na agricultura

De acordo com Mycobank (2021), *Trichoderma* Persoon (1794) pertence ao Reino Fungi; Filo Ascomycota; Ordem Hypocreales; Família Hypocreaceae; Gênero: *Hypocrea* (Teleomorfo) e *Trichoderma* (Anamorfo). O gênero compreende um grande número de espécies que se reproduzem assexuadamente; está amplamente distribuído em solos de regiões de clima temperado e tropical, sendo 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 podem apresentar tufo ou pústulas de coloração geralmente esverdeadas, conidióforos ramificados e conídios formados nas extremidades de fiáides (Figura 1). Os conídios são globosos a 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).

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 das espécies de *Trichoderma* são feitos com o uso de sequenciamento de regiões genômicas, usando marcadores moleculares como o espaçador interno transcrito (ITS1 e ITS2), fragmentos de genes que codificam para o alongamento da tradução (TEF), 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, permitindo contornar os problemas de identificação baseadas apenas na morfologia.

Chaverri et al. (2015), reavaliando a identidade de algumas espécies comerciais de *T. harzianum*, pela combinação de dados morfológicos, ecológicos, biogeográficos e filogenéticos (regiões ITS, ACT, CAL1, RPB2 e TEF1), concluíram que nenhuma das linhagens comerciais de *Trichoderma* pertence à espécie *T. harzianum*. A correta identificação das espécies é fundamental para o uso de *Trichoderma* na agricultura, pois os mecanismos de ação podem ser diferentes entre as espécies e/ou linhagens utilizadas, sendo que a eficiência dos mesmos para propósitos específicos pode ser aumentada pela combinação de linhagens de diferentes espécies.

Várias espécies de *Trichoderma* são reconhecidamente capazes de estabelecerem relações benéficas com as plantas. Algumas dessas espécies são utilizadas como inoculantes para o controle de doenças (biofungicidas), biofertilizantes e fitoestimuladores. Com suas habilidades hiperparasitas e seus efeitos antagônicos, são capazes de induzir genes relacionados à defesa e proteger o

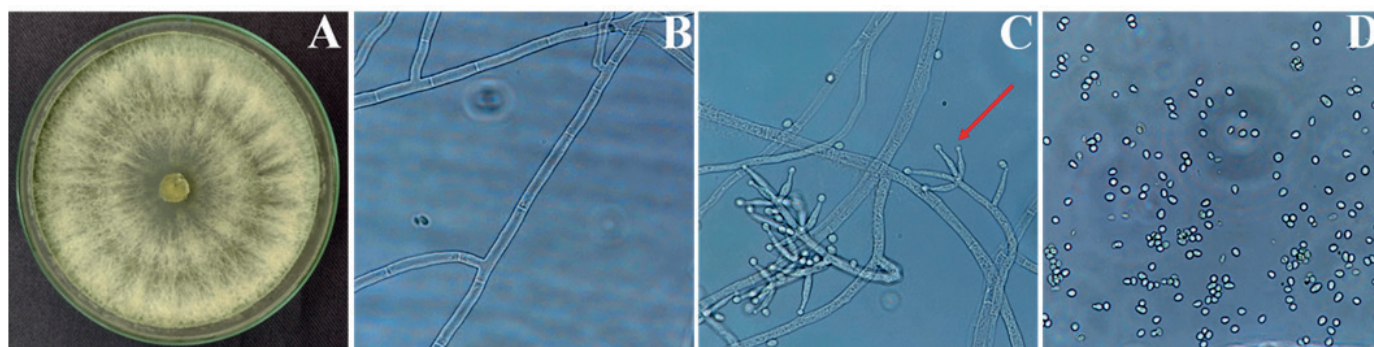


Figura 1. *Trichoderma azevedoi* CEN1241. **A:** Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar ; **B:** Hifas sem a presença de conidióforos; **C:** Hifas com conidióforos maduros liberando conídios; **D:** Conídios ovóides e globosos.

hospedeiro contra infecções por fungos e bactérias fitopatogênicas. Através de seus compostos bioativos e elicitores esses fungos interagem com as raízes das plantas hospedeiras, induzindo resistência sistêmica a doenças, ou ainda, promovendo diretamente o crescimento e a tolerância destas a vários estresses abióticos, como a seca e a salinidade do solo através do aumento do crescimento das raízes, absorção de nutrientes e induzindo proteção contra o estresse oxidativo (HIDANGMAYUM & DWIVERDI 2018).

Estudos sobre *Trichoderma* spp. vêm confirmando a capacidade desses fungos em controlar fitopatógenos habitantes do solo, como *Fusarium* Link 1809, *Rhizoctonia solani* Khün 1858, *Sclerotium cepivorum* Berk 1840 (anamorfo) de *Stromatinia cepivora* Whetzel 1945, *Sclerotium rolfsii* Saccardo 1911 (anamorfo) de *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Amp; Kimbr 1978 (teleomorfo), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 1884, entre outros (ALVARADO-MARCHENA & RIVERA-MÉNDEZ 2016; SRIVASTAVA et al. 2016; NAGAMANI et al. 2017; O'BRIEN 2017). O potencial para 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 de *Trichoderma* spp., na maioria dos solos agricultáveis.

Diversos biofungicidas à base de *Trichoderma* spp. são atualmente comercializados no mundo, como Vinevax TM®, Trichozam®, Trichosil®, Trichodermus WP®, Trichodermil®, Trichodermax®, Trianum®, Trichobiol WP®, Trichoturbo®, Trichomax®, Quality WG®, Nicoderma®, Ecotrich ES®, Lycomax®, Bioderma®, Bio Traz®, Esquive®, Shocker®, Organic WP®, SoilGard 12®, Trifender®, Tricodamp®, StimuControl entre outros (BETTIOL et al. 2012; ADAPAR 2021). O produto pode ser aplicado de várias maneiras: misturado ao substrato ou incorporado ao solo; em pulverizações foliares ou via água de irrigação; inoculado às sementes antes do plantio; aplicado especificamente no sulco antes do plantio ou por imersão de mudas em suspensões aquosas 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 utilizados por *Trichoderma* spp. contra os fitopatógenos e o fato de não serem patogênicos às plantas, são caracterís-

ticas que tornam as espécies desse gênero atraentes como agentes de controle de biológico (HADDAD et al. 2017; MARQUES et al. 2018). Tais mecanismos envolvem a competição por espaço físico, água, luz e nutrientes; o parasitismo, que pode ser mediado pela produção de enzimas líticas e a antibiose, decorrente da síntese de metabólitos secundários com ação antimicrobiana (MACHADO et al. 2012; KOTTB et al. 2015; CHEN et al. 2016; GONZÁLEZ & FUENTES 2017). Adicionalmente, certas linhagens de *Trichoderma*, além de possuírem habilidade para suprimir o crescimento de fitopatógenos, podem induzir resistência sistêmica (RSI) a doenças e/ou promover o crescimento das plantas, aumentando germinação das sementes, ramificação e crescimento de raízes, brotação de estacas, crescimento de ramos, incremento de área foliar e aumento no rendimento das culturas (MELLO et al. 2020). Esses dois mecanismos adicionais (promoção de crescimento e indução de resistência de plantas) são considerados indiretos e podem ser resultantes da atividade do agente de biocontrole sobre o patógeno.

Competição é um mecanismo de ação que possui destacada importância devido à eficiência demonstrada por linhagens desse fungo em colonizar os substratos, atribuída à particular aptidão para utilizar uma diversidade de nutrientes e à vulnerabilidade de muitos fungos fitopatogênicos frente à falta de alguns desses nutrientes (BENÍTEZ et al. 2004). Metabolicamente, os fungos do gênero *Trichoderma* são adaptados para utilizar diversas fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio e ferro, habilidade que lhes permite multiplicar-se rapidamente e colonizar a rizosfera antes do patógeno, ocupando os espaços onde há água, luz e outros meios para sobrevivência disponíveis. Desta forma, *Trichoderma* forma verdadeiras barreiras, impedindo que o patógeno atinja os sítios de infecção (MACHADO et al. 2012).

Já o parasitismo (ou hiperparasitismo) representa um enfrentamento direto, pelo qual *Trichoderma* spp. respondem a estímulos químicos produzidos pela hifa do patógeno hospedeiro, crescendo em direção ao mesmo. Em muitos casos o hiperparasita é capaz de enrolar-se fortemente em toda a extensão do patógeno, penetrar as células e digerir seu conteúdo (CONSOLO et al. 2012; MACHADO et al. 2012). Contudo, a penetração não é de importância primordial e muitas vezes o simples contato físico de *Trichoderma* com as hifas do fungo são su-

ficientes para que enzimas liberadas pelo primeiro cause alteração da permeabilidade de membrana e morte das células do fungo hospedeiro.

Antibiose é outro mecanismo de biocontrole direto que algumas linhagens de *Trichoderma* exercem contra fungos fitopatogênicos, em razão da produção de compostos antimicrobianos, principalmente metabólitos secundários (STADNIK & BETTIOL 2000; MELLO et al. 2020). Tais compostos são capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos, mesmo à distância, o que os torna atraentes no controle biológico de doenças de plantas. Espécies de *Trichoderma* são prolíferas produtoras de metabólitos secundários, que incluem substâncias voláteis e não voláteis. Estudos genéticos comparativos de diferentes espécies, cujas sequências genômicas completas estão publicadas, fornecem informações importantes sobre os genes relacionados a propriedades antifúngicas de *Trichoderma*, incluindo genes envolvidos na produção de metabólitos secundários (ZEILINGER et al. 2016).

Indução de resistência é um mecanismo de controle biológico indireto, pois a planta responde ao ataque dos patógenos por meio da ativação de seus mecanismos de defesa. A reação de resistência pode ocorrer por duas vias: a da resistência sistêmica adquirida (RSA) e da resistência sistêmica induzida (RSI). A primeira segue-se ao ataque do patógeno e caracteriza-se pelo acúmulo do ácido salicílico produzido com frequência após a infecção e, tipicamente, leva à expressão de proteínas ligadas à patogênese; já a segunda diz respeito à interação planta-microrganismos não patogênicos (MELLO et al. 2020). Esta é mediada pela produção de ácido jasmônico e/ou etileno, normalmente induzida por microrganismos e/ou insetos; no caso de microrganismos, a maioria dos indutores são bactérias e fungos não patogênicos, a exemplo do *Trichoderma* (CHOUDHARY et al. 2007; MELLO et al. 2020). A ativação de defesa pode ser local, quando somente a região que esteve em contato com o agente indutor da resistência é ativada, ou sistêmica, quando outras partes da planta que não estavam em contato com o agente indutor de resistência também produzem os compostos químicos relacionados à defesa contra o patógeno (MISAGHI 1982). A ativação dos mecanismos de defesa ocorre pela indução, na planta, da produção de fitoalexinas, lignina adicional, quitinases, glucanases, e compostos fenólicos (ROMEIRO 2007; BARROS et al. 2010; NAWROCKA

et al. 2018). De acordo com Harman et al. (2004b) e Romeiro (2007), fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de produzir eliciadores de resistência como serinoproteinasas, 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* (SARROCCO et al. 2017).

Certas linhagens de *Trichoderma* 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 maior eficiência de uso, aumento da disponibilidade e absorção de alguns 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 se comunicar por meio de vários mecanismos de sinalização. Os vegetais são capazes de perceber e responder a populações bacterianas e fúngicas que habitam a rizosfera e aos 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 promove 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, durante a comercialização do produto, em relação ao tratamento controle. Sousa et al. (2018) relataram aumento de 54% na matéria seca e um incremento de 35% de parte aérea e raiz, ao avaliarem o 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.

Zeng et al. (2012) mostraram o potencial de uso de *T. harzianum* no controle do mofo-branco (*S. sclerotiorum*), na cultura da soja. Segundo os autores, houve redução de 43,1% na severidade da doença e 38,5% na produção de escleródios do patógeno. Também Carvalho et al. (2015) ao avaliar, em condições de campo, a eficiência de diversos isolados de *Trichoderma* no manejo do mofo-branco, em duas safras de feijão, observaram redução no número médio de apotécios por metro quadrado de superfície do solo. Os isolados mais eficazes foram capazes de reduzir de 46 a 62% a germinação dos apotécios. Haddad et al. (2017) testaram 120 linhagens de *Trichoderma* quanto à capacidade de inibir a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, encontrando 22 que propiciaram 100% de inibição. Destas, nove linhagens mostraram ser capazes de proteger a soja durante a fase de germinação da semente e de crescimento das plantas. As linhagens que se destacaram foram identificadas como pertencentes às espécies *T. koningiopsis*, *T. asperelloides*, *T. atroviride* e *T. virens*.

O potencial de uso de *Trichoderma* tem sido melhor comprovado pela presença física do fungo, tanto na interação antagonista-patógeno ou antagonista-planta. Nos últimos anos, esforços têm sido direcionados a desvendar a importância da emissão dos compostos orgânicos voláteis (COVs) durante o controle biológico por *Trichoderma*. Diversos resultados mostraram que esses COVs possuem características importantes que também justificam o uso de *Trichoderma* na agricultura.

2. Compostos Orgânicos Voláteis de *Trichoderma*

Plantas, fungos e bactérias podem produzir COVs com diversas funções e em diferentes proporções. Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os organismos mais estudados quanto à produção de COVs (KADDES et al. 2019); estes exercem papel crucial nas interações com as plantas e com os fitopatógenos. Fatores como temperatura, luz, fase de crescimento e disponibilidade de nutrientes afetam a produção desses metabólitos (GUO et al. 2019; SPECKBACHER et al. 2020). Os mecanismos que governam as etapas desde o reconhecimento dos COVs pelo microrganismo-alvo até a expressão da resposta pelo microrganismo ainda não foram claramente explicados. Alguns autores sugerem que os COVs atuam na alteração da expressão de proteínas

e atividades de enzimas específicas, podendo refletir no crescimento dos vegetais ou indução de resistência (MALMIERCA et al. 2012; BITAS et al. 2013; BAE et al. 2016; NIETOJACOBO et al. 2017).

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 (PICHESKY et al. 2006; SIDDIQUEE et al. 2012; HUNG et al. 2013). Dessa forma, esses compostos costumam servir como mediadores na comunicação, interação e/ou competição entre organismos ou entre organismos e plantas.

Diversos COVs liberados por culturas de *Trichoderma* spp. foram detectados e caracterizados. A ação desses compostos contra os fitopatógenos difere de acordo com o isolado e o patossistema (LAZAZZARA et al. 2021) e várias questões nesse campo necessitam, ainda, serem elucidadas. Por exemplo, como os COVs de *Trichoderma* podem suprimir os patógenos, como misturas voláteis causam efeitos antifúngicos e, como a promoção de crescimento é desencadeada nas diferentes espécies vegetais, são perguntas ainda sem respostas. Porém, nos últimos anos vêm sendo direcionados esforços para a exploração do potencial de uso de *Trichoderma* na agricultura sob diferentes aspectos, entre os quais, desvendar o repertório de genes envolvidos na síntese desses metabólitos secundários, a implicação dos mesmos na habilidade de biocontrole dos microrganismos, bem como na promoção de crescimento de plantas. Até o momento, perfis de emissão de COVs de cerca de 600 espécies microbianas foram obtidos (SCHULZ-BOHM et al. 2017; SCHULZ-BOHM et al. 2018), incluindo *Trichoderma* spp. Esses compostos estão diretamente envolvidos nas interações microrganismo-planta e microrganismo-microrganismo, sendo que a maioria deles ativam alterações de crescimento e resposta de defesa, em plantas e, provocam alterações fisiológicas em fungos (PIECHULLA et al. 2017).

O conhecimento molecular do genoma de várias espécies de *Trichoderma* indica que esse gênero é rico em genes que codificam enzimas responsáveis pela produção de metabólitos secundários. Apesar de se tratar de substâncias que não são vitais para o fungo, alguns desses metabólitos podem contribuir

para uma vantagem competitiva, que traria benefícios no que se refere à promoção do crescimento de plantas e à inibição de fitopatógenos. Segundo Kubicek et al. (2011) e Mukherjee et al. (2012), muitos dos genes que codificam para produção de metabólitos secundários representam um subconjunto importante relacionado à produção de COVs.

No gênero *Trichoderma*, aproximadamente 480 COVs diferentes foram detectados em diversas espécies (GUO et al. 2019). Entre esses compostos, incluem-se principalmente terpenóides e derivados de ácidos graxos, os quais podem pertencer a diferentes classes químicas, como terpenos, álcoois, cetonas, lactonas, compostos aromáticos, aldeídos e ésteres (SCHENKEL et al. 2015, ZEILINGER et al. 2016; KADDES et al. 2019). Alguns compostos produzidos por espécies de *Trichoderma* são: 3-Octanona, 3-Octanol e 1-Octen-3-ol (NEMCOVIC et al. 2008); 6Pentil-Pirona (EL-HASAN & BUCHENAUER 2009; KOTTBET al. 2015; GARNICA-VERGARA et al. 2015); 3-Metilbutil Acetato, Nonanal, β -Farneseno, β -Bisaboleno, β -Sesquifelandreno (LEE et al. 2016); N-metil-N-nitrosoisobutiramida (HUTCHINGS et al. 2017); δ -Cadineno, β -Elemeno, 2-Pentilfurano, γ -Muuroleono (GONZÁLEZ-PÉREZ et al. 2018).

A biossíntese dos COVs é altamente dependente da disponibilidade de carbono, nitrogênio, enxofre e de energia fornecida pelo metabolismo primário (KADDES et al. 2019). Sendo assim, 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.

Speckbacher et al. (2020) estudando a influência da luz na conidição e na biossíntese de COVs de *T. atroviride* IMI 206040 e *T. atroviride* P1, verificaram diferenças significativas entre os isolados, quanto à dependência de luz para a produção de diversos COVs, além de constatarem que a conidição do isolado *T. atroviride* P1 é independente da luz.

Quanto à regulação molecular de COVS, Cruz-Magalhães et al. (2019) verificaram que as NADPH oxidases *Nox1* e *Nox2* regulam diferentemente os COVs, a atividade fungistática, a promoção do crescimento de plantas e a assimilação de nutrientes em *T. atroviride*. *Nox1* e o regulador *NoxR* parecem exercer papel regulatório em uma variedade de pro-

cessos em *T. atroviride*, como moduladores positivos ou negativos. *Nox2* parece ter um papel na regulação da produção de COVs que possuem atividade fungistática.

Os COVs estão envolvidos em diferentes processos biológicos e apresentam potencial para aplicação biotecnológica (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 a existência de aproximadamente 340 espécies e milhares de linhagens de *Trichoderma* (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), presume-se que exista um grande número desses compostos a serem conhecidos e explorados como insumo para a agricultura.

Nawrocka et al. (2018) demonstraram que os COVs Z-3-hexanal, Z-3-hexenol e E2hexenal, 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, os órgãos das plantas tornaram-se mais flexíveis, o que contribuiu para melhor absorção de água e nutrientes.

Ao investigarem os efeitos dos COVs produzidos por *T. asperellum* T34, *T. harzianum* T39 e *T. atroviride* SC1 contra o míldio da videira causado por *Plasmopara viticola*, Lazazzara et al. (2021), detectaram 31 compostos. Dentre eles, α -farneseno, cadineno, 1,3-octadieno, 2pentilfurano e 6-pentil-2H-pirano-2-ona reduziram a severidade da doença. Os compostos 6pentil-2H-pirano-2-ona e 2-pentilfurano também aumentaram o acúmulo de calose e a modulação de genes relacionados à defesa após a inoculação de *P. viticola*. Além disso, 6pentil-2H-pirano-2-ona ativou a resposta de hipersensibilidade após a inoculação de *P. viticola*. Já Rajani et al. (2021) relataram a atividade antimicrobiana de COVs de quatro espécies endofíticas de *Trichoderma*, usando a técnica de placas duplas. Nesse estudo, verificou-se a inibição do crescimento micelial de três fitopatógenos (*S. sclerotiorum*, *S. rolfii* e *Fusarium oxysporum*), enquanto *Macrophomina phaseolina* não foi afetado. Análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa de *T.*

longibrachiatum revelaram a presença de diversos COVs, incluindo hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, ácidos, éteres e diferentes classes de terpenos.

Nos últimos anos, o número de trabalhos demonstrando o papel dos COVs de microrganismos no controle biológico tem aumentado, devido principalmente aos avanços alcançados na caracterização dos perfis químicos desses compostos, impulsionada pelo uso das técnicas analíticas para identificação de COVs (CHEN et al. 2016; NIETO-JACOBO et al. 2017; GUO et al. 2019).

3. Metodologias para ensaios com compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma*

Os métodos para avaliar o potencial dos COVs de *Trichoderma* no controle biológico são, sem dúvida, a maior dificuldade para os estudos nesse tema. Isso porque as técnicas disponíveis possuem algumas limitações. Por exemplo, o tamanho reduzido das placas de Petri, dificulta estudos sobre promoção de crescimento com espécies vegetais de rápido desenvolvimento e alta estatura. Outro problema encontrado é a contaminação cruzada entre antagonista e patógeno. Isso ocorre, principalmente, porque muitas linhagens de *Trichoderma* possuem hábito agressivo de crescimento e tendem a ultrapassar as paredes divisórias das placas de Petri. Além disso, grande parte dos ensaios vem sendo conduzidos com placas de Petri de plástico, e o material plástico também pode ter a capacidade de emitir COVs (EVEN et al. 2019). Dessa forma, é recomendado que se utilizem materiais de vidro, sempre que possível, nos ensaios de laboratório. Outro fator relevante é a dificuldade de comparar dados produzidos em diferentes laboratórios, por causa das variações experimentais na planta e/ou patógeno em exposição.

A técnica proposta por Dennis & Webster (1971) é a mais utilizada para avaliar o efeito dos COVs de *Trichoderma* sobre fitopatógenos. Essa técnica de ensaios *in vitro* é conhecida como técnica de placas duplas, placa de Petri invertida, método sanduíche, método de duas placas de base selada ou placas de Petri impressadas. Entretanto, essa técnica também apresenta dificuldades como a difícil e demorada montagem, a impossibilidade de testar diferentes condições experimentais e a possível escassez de oxigênio (O₂) após alguns dias de incubação (NOGUCHI et al. 2002; SILVA et al. 2021a),

o que poderia refletir efetivamente na inibição micelial observada, haja visto que muitas linhagens de *Trichoderma* possuem rápido crescimento micelial, seguido de intensa esporulação e, dessa forma, ter sua colônia totalmente formada muito antes do patógeno. Entretanto, essa possível concorrência por O₂ não seria totalmente prejudicial nos estudos com *Trichoderma*, apenas reforçaria o mecanismo de competição, exercido por ele.

Independentemente da metodologia utilizada, os resultados observados nos incontáveis ensaios conduzidos em diferentes laboratórios mostram efetivamente que os COVs de *Trichoderma* possuem capacidade de complementar os outros mecanismos de ação exercidos por este fungo durante o controle biológico e promoção de crescimento de plantas.

Abaixo estão descritas e ilustradas algumas das metodologias utilizadas para avaliar ensaios de inibição micelial, inibição de escleródios e promoção de crescimento de plantas, utilizando COVs de *Trichoderma*. São abordadas também algumas adaptações que podem ser executadas para contornar os problemas apontados nas metodologias descritas.

3.1. Placas duplas: nesta técnica, placas de Petri, contendo meio cultura solidificado, recebem ao centro discos de micélio (5 mm Ø) colonizado por *Trichoderma*. Da mesma forma, no centro de outra placa de Petri, é colocado um disco de micélio (5 mm Ø) colonizado pelo patógeno. As placas contendo antagonista e patógeno são sobrepostas formando uma atmosfera compartilhada (Figura 2). O conjunto é selado com filme de parafina plástica e envolvido com plástico transparente, de forma que as placas contendo o patógeno fiquem na posição superior. O tratamento controle é representado por placas também com o patógeno, mas sem o antagonista na parte inferior. Após a total colonização do meio de cultura nos tratamentos controles, são realizadas medidas do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro digital. Os valores médios de inibição do crescimento micelial são 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 das colônias do patógeno sem a presença do antagonista, e T os valores dos tratamentos com a presença do antagonista.

O posicionamento do antagonista na parte inferior da atmosfera compartilhada é extremamente necessário devido a dois fatores: 1) favorecer o

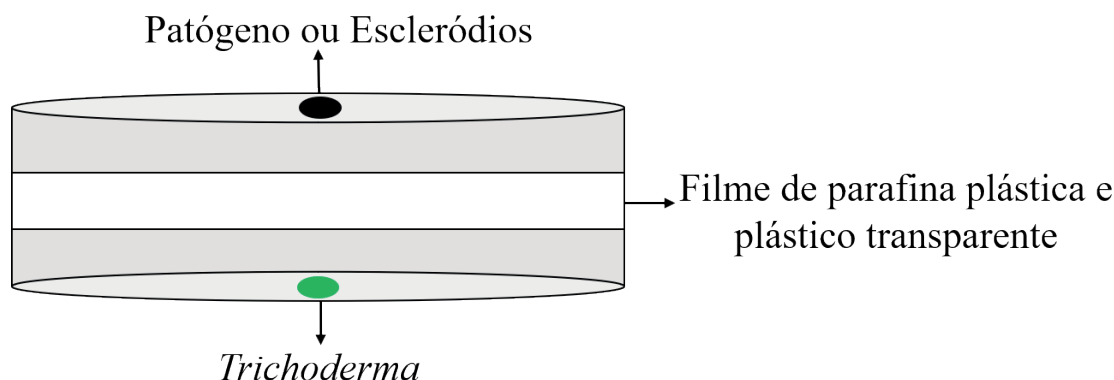


Figura 2. Representação da metodologia de placa dupla. (SILVA et al., 2020).

contato dos COVs com o alvo, pois o baixo peso molecular desses compostos, permite a movimentação para a parte superior da atmosfera compartilhada; 2) evitar que conídios da colônia do antagonista caiam e contaminem as placas com o patógeno. Essa técnica pode ser adaptada para avaliar também a capacidade dos COVs para inibir a germinação miceliogênica de escleródios. Para tanto, no momento da montagem dos ensaios, pode-se optar por colocar os escleródios na parte superior, ao invés do disco de micélio. É recomendado que os escleródios sejam previamente desinfestados com etanol (70%) por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio (50%) por 3 minutos e, então, lavados três vezes em água esterilizada por 30 segundos.

3.2. Placa dividida: esta também é uma técnica bastante utilizada, porém requer placas de Petri com dois compartimentos. No centro do primeiro compartimento é depositado um disco de micélio de (5 mm Ø) colonizado por *Trichoderma* e, no segundo compartimento, um disco de micélio (5 mm Ø) colonizado pelo patógeno (Figura 3A). Nesta abordagem, é possível também conduzir ensaios de promoção de crescimento (GONZÁLEZ PÉREZ et al. 2018), substituindo o disco de micélio do patógeno por sementes da cultura alvo. As sementes devem ser previamente desinfestadas por 1 minuto com etanol (70%), seguido de 5 minutos com hipoclorito de sódio (50%) e, então, lavadas três vezes em água esterilizada por 30 segundos. Após a desinfestação, as sementes são levemente inseridas no meio cultura. No tratamento controle, o patógeno ou a semente são depositados na superfície do meio em um dos compartimentos da placa, porém sem a presença de *Trichoderma* no outro compartimento. Ao final, o conjunto deve ser selado com

filme plástico transparente. O uso de placa de Petri com parede divisória evita qualquer contato físico entre *Trichoderma* e patógeno ou *Trichoderma* e sementes/plântulas, mas permite a livre troca de COVs (ELSHARBINY et al. 2020). Entretanto, em alguns casos, o *Trichoderma* pode sim colonizar a parede divisória das placas e contaminar o outro compartimento e, assim, gerar resultados não satisfatórios (LEE et al. 2015). Nessa situação, pode-se ajustar a técnica, como descrito por Lee et al. (2016). Resumidamente, uma placa de Petri (35 x 10 mm) contendo *Trichoderma* é colocada em uma placa de Petri particionada maior (100 x 15 mm), como descrito na Figura 3B.

As principais vantagens dessa técnica são: facilidade de montagem dos ensaios e a possibilidade de utilizar dois meios de cultura diferentes. Diversos gêneros de fungos adaptam-se melhor em determinado meio de cultivo, e isso deve ser levado em consideração nos experimentos de controle biológico, pois muitos resultados alcançados podem ser equivocados, devido a erro de execução. Entre as desvantagens, a principal seria que a maioria das placas de Petri com dois compartimentos são produzidas em material plástico e, esse tipo de material, pode também emitir COVs, como mencionado anteriormente. Além disso, pode acontecer contaminação cruzada das culturas, especialmente devido ao hábito agressivo de crescimento de algumas linhagens de *Trichoderma*.

3.3. Placa dentro de placa: nesta técnica são usadas placas de Petri maiores (150 x 25 mm), as quais irão comportar placas de Petri de menor diâmetro (60 x 15 mm). A montagem ocorre da seguinte maneira: uma placa de Petri de 60 x 15 mm preenchida com meio de cultura é colocada na ex-

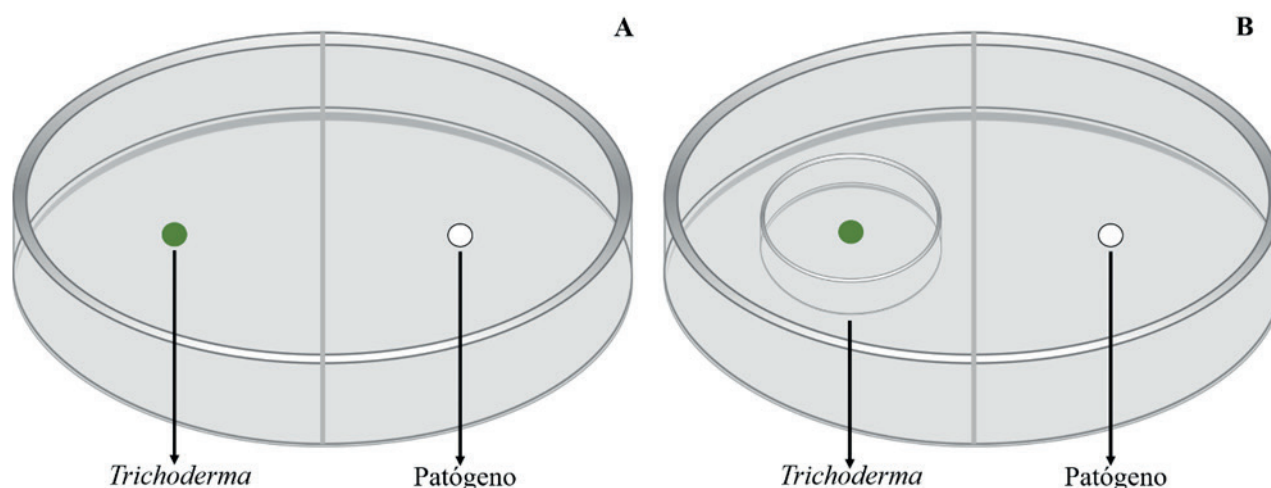


Figura 3. Representação da metodologia da placa de Petri dividida. **A:** placa de Petri particionada sem adaptação com placa de Petri menor. **B:** placa de Petri particionada com inserção de placa de Petri menor, para evitar contaminação entre as colônias.

tremidade de uma placa de Petri maior de 150 x 25 mm, sendo esta também preenchida com meio de cultura. Um disco de micélio de (5 mm Ø) colonizado por *Trichoderma* é depositado no centro da placa menor. Já na placa maior, é possível colocar diferentes materiais de estudo, a depender do objetivo da pesquisa. Alguns exemplos são: disco de micélio, escleródios ou sementes (ESTRADA RIVERA *et al.* 2019; KAMARUZZAMAN *et al.* 2021; SILVA *et al.* 2021b). Ao final, outra placa de 150 x 25 mm é sobreposta e o conjunto envolvido com parafina plástica e filme plástico transparente, formando uma atmosfera compartilhada (Figura 4). O tratamento controle é representado por placas de Petri de 60 x 15 mm com apenas meio de cultura. A sobreposição com outra placa de Petri maior favorece uma atmosfera compartilhada mais ampla, e isso permite a execução de testes de promoção de crescimento, pois possibilita mais tempo de incubação e consequentemente maior período para observação e coleta dos dados, especificamente porque em atmosferas menores, rapidamente as plantas podem sofrer interferência ou atraso no crescimento.

Uma das vantagens deste sistema é que ele, do mesmo modo que o anterior, possibilita o uso de meios de cultura diferentes. Entretanto, também pode ocorrer a contaminação cruzada, como mencionado anteriormente. Afim de contornar esse problema, pode-se optar por inserir tampas de placas de Petri menores invertidas na extremidade de placas de Petri maiores e, em seguida, fixar com fita adesiva, a própria placa de Petri menor em sua tampa. O sistema assim organizado manterá o *Tricho-*

derma mais distante do meio de cultura da placa de Petri maior, de modo a evitar o contato físico entre as colônias.

3.4. Sacos de tecido voal preenchidos com solo: sacos confeccionados em tecido voal com dimensões de 100 x 90 mm são preenchidos com 100 gramas de solo. A cada saco, adiciona-se 80 mL de água, seguindo-se de autoclavagem à 120 °C por 60 minutos. Frascos de vidro com capacidade de 250 mL, previamente autoclavados, são preenchidos com 15 mL de meio de cultura. Cada frasco, recebe ao centro, um disco (5 mm Ø) colonizado com *Trichoderma*. O saco contendo o solo é então fixado ao frasco com o auxílio de um cordão de algodão, de maneira a ser mantido suspenso à 10 mm do disco de micélio. Sementes são previamente tratadas com etanol (70%) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (50%) por 5 minutos, lavadas três vezes em água esterilizada por 30 segundos e distribuídas, uma semente para cada um dos sacos de tecido voal. As sementes são semeadas a 5 mm de profundidade, no solo. Por fim, outro frasco de vidro autoclavado (250 mL) é sobreposto ao frasco contendo as sementes e, então envolvidos com parafina plástica e filme plástico transparente, formando uma atmosfera compartilhada (Figura 5). O tratamento controle é representado por frascos cujo meio de cultura não recebe o disco de micélio de *Trichoderma* (SILVA *et al.* 2021b).

Essa metodologia tem como principal vantagem, evidenciar uma situação mais próxima daquela que ocorre durante a interação

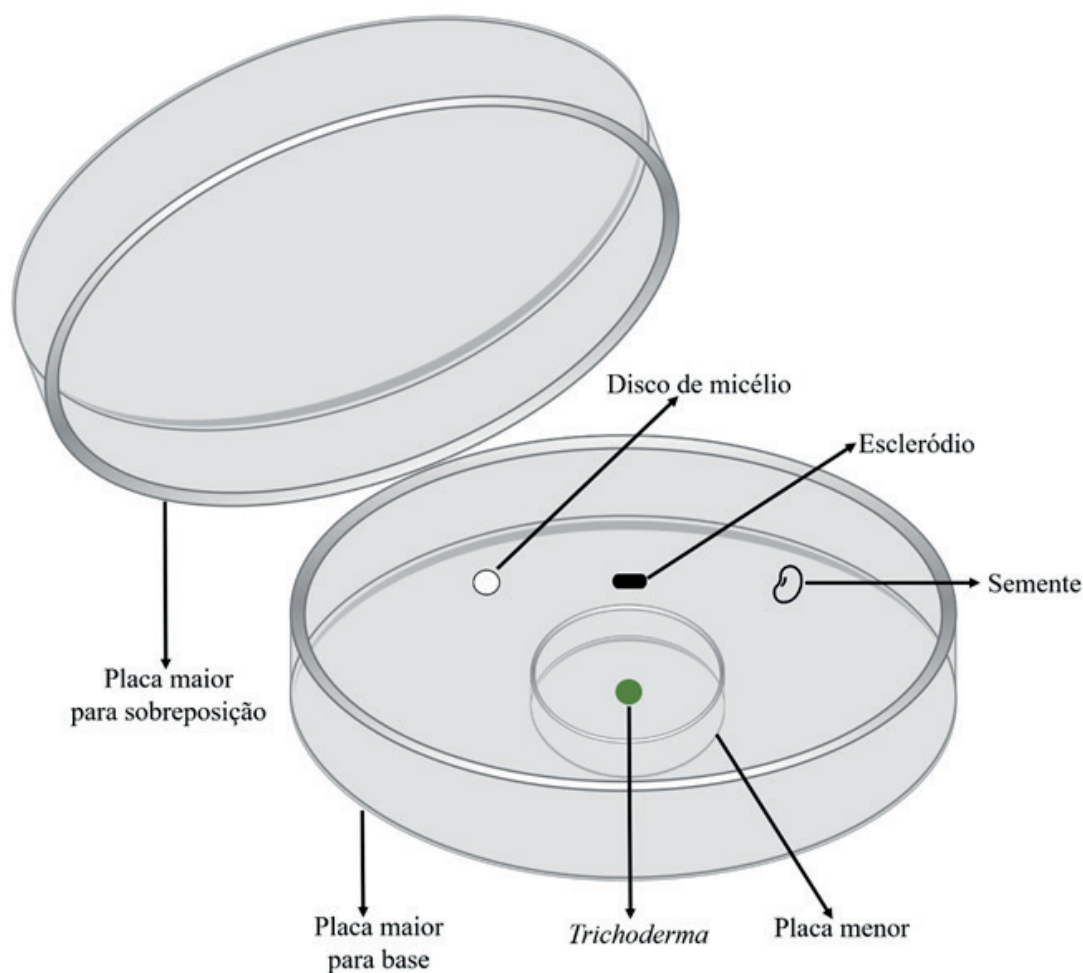


Figura 4. Representação da técnica da placa dentro de placa. A opção a ser avaliada pode ser o crescimento do patógeno, a germinação de estruturas de sobrevivência do patógeno ou promoção de crescimento da cultura em questão.

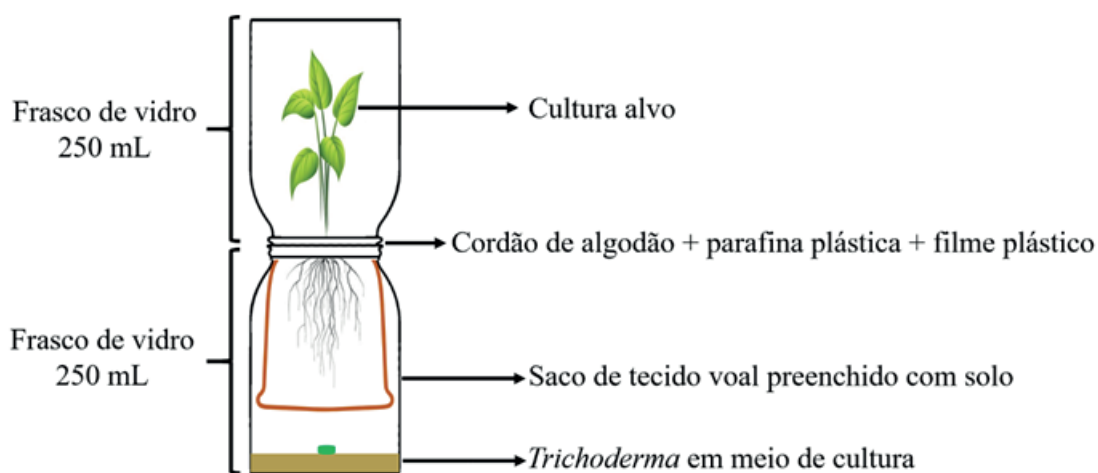


Figura 5. Representação da técnica de sacos voal preenchidos com solo.

COVs de *Trichoderma* e plantas, em solo nas condições naturais. Além disso, o uso de solo ao invés de meio de cultura é menos dispendioso. As principais desvantagens dessa técnica são a

dificuldade de montagem e o tempo gasto. Contaminações também podem ocorrer devido ao intenso manuseio dos materiais durante a montagem.

4. Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* no controle do mofo-branco

O fungo de solo *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary tem sido relatado causando a doença mundialmente conhecida como mofo-branco, podendo infectar mais de 400 espécies de plantas (DERBYSHIRE et al. 2017). Esse patógeno infecta folhas, flores, frutos e caules das plantas hospedeiras, causando doenças que podem se desenvolver desde o início do período vegetativo até a 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). Em regiões de clima mais seco, a ocorrência do mofo-branco, antes considerada esporádica, vem causando epidemias devido aos seguintes fatores: expansão agrícola; uso de sementes infectadas e/ou infestadas; emprego de irrigação, proporcionando as condições de umidade ideais para 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 6). Os escleródios são formados por três camadas: casca, córtex e medula. Cada camada é composta por uma massa compactada de hifas (LE TORNEAU 1979; ARSENIUK & MACEWICZ 1994; BUTLER et al. 2009).

A germinação dos escleródios e o acúmulo dessas estruturas no solo ano após ano é responsável pelo progressivo aumento da severidade da doença no campo. Os escleródios de *S. sclerotiorum* podem germinar de duas maneiras: germinação miceliogênica e carpogênica (LE TORNEAU 1979). Na germina-

ção 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 6), 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 (23 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 umidade elevada (ZENG et al. 2012).

O principal efeito esperado quando se utiliza *Trichoderma* spp. para manejo das doenças causadas por *S. sclerotiorum* é a diminuição do banco de escleródios no solo, considerando que algumas linhagens têm a capacidade de parasitar e digerir todo o conteúdo celular dos escleródios. Sendo assim, o parasitismo exercido por *Trichoderma* spp. pode contribuir para a redução do número dessas estruturas de sobrevivência próximo às plantas e acumuladas no solo ao longo dos anos. Adicionalmente, a redução do número de escleródios formados contribuirá para uma menor liberação de ascósporos durante o ciclo da cultura. Em média, 1 a 20 apotécios são capazes de gerar até 2.000.000 ascósporos (WU et al. 2007; TÖFOLI 2014). Logo, impedir

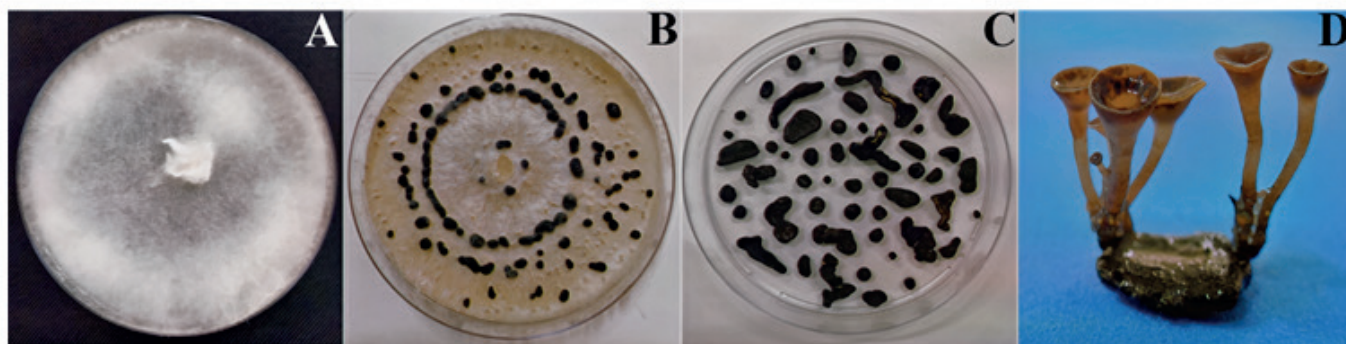


Figura 6. *Sclerotinia sclerotiorum*. **A:** Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar com escleródios ausentes; **B:** Colônia cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar com a formação de escleródios; **C:** Escleródios maduros de variados tamanhos e forma irregular; **D:** Germinação carpogênica de escleródio com a presença de apotécios maduros.

a formação desses corpos de frutificação é de suma importância, pois a infecção ocasionada pelo fungo na fase sexuada é a que mais contribui para maior incidência e severidade da doença nos cultivos.

Como mencionado anteriormente, o controle biológico das doenças causadas por *S. sclerotiorum* com o uso de *Trichoderma* spp., tendo por alvos os escleródios, tem sido atribuída à presença física do antagonista. Entretanto, estudos recentes utilizando exclusivamente o mecanismo de antibiose por emissão de COVs, mostraram a habilidade desses compostos em inibir a germinação, tanto miceliogênica como carpogênica dos escleródios. Em estudo conduzido por Ojaghian et al. (2019), eles utilizaram a técnica de placas de Petri divididas, onde em um compartimento foi depositado um disco colonizados por *Trichoderma* e, no outro, escleródios do patógeno. Tal exposição dos escleródios aos COVs liberados pelo *Trichoderma* reduziu a germinação miceliogênica. Esses autores demonstraram também que os COVs de *Trichoderma* podem afetar a formação de estipes e apotécios em *S. sclerotiorum*. A inibição da germinação carpogênica por COVs de *Trichoderma* também foi demonstrada por Silva (2020). Nesse trabalho, os escleródios de *S. sclerotiorum* foram enterrados em areia autoclavada e mantidos no sistema de atmosfera compartilhada com cultura de *T. azevedoi* CEN1241. Ao final de 40 dias, verificou-se que a exposição aos COVs de *T. azevedoi* reduziu significativamente a germinação carpogênica dos escleródios.

Silva et al. (2021b) também observaram a inibição da germinação miceliogênica de escleródios, adotando o método das placas invertidas, no qual se utilizaram duas bases de placas de Petri, uma contendo a colônia de *T. azevedoi* na fase de esporulação (96 horas de cultivo) e outra, escleródios de *S. sclerotiorum*. As placas foram sobrepostas e seladas, mantendo-se o antagonista na parte inferior. Nessa condição, 100% dos escleródios testados não germinaram. Contudo, esse resultado não foi alcançado quando utilizadas culturas de *T. azevedoi* ainda em crescimento micelial; possivelmente, o antagonista nesta fase do desenvolvimento ainda não é capaz de expressar todo o arsenal de COVs necessário para inibir a germinação dos escleródios.

Essa mesma técnica que promove uma atmosfera compartilhada entre antagonista e patógeno foi adotada no estudo de Hussein et al. (2020).

Dessa vez, a base da placa superior recebeu um disco de micélio de *S. sclerotiorum*. Os COVs emitidos pela cultura de *T. koningiopsis* T-403 localizada na placa inferior inibiram, em torno de 54%, o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

Com intuito de avaliar a severidade do mofo-branco causado por colônias do patógeno, após cultivo por até três gerações consecutivas em atmosfera compartilhada com *T. azevedoi*, plantas de alface foram inoculadas com discos de micélio de *S. sclerotiorum*. Observou-se que quando a colônia passou por apenas uma etapa de exposição ao antagonista, a severidade da doença foi de 100%, avaliada em termos de porcentagem de folhas infectadas em relação à de folhas sadias. Porém, quando as plantas foram inoculadas com culturas que passaram por duas ou três etapas de exposição, houve um atraso no aparecimento dos sintomas e a severidade da doença foi reduzida ao nível de 20%, nos tratamentos com três exposições (SILVA et al. 2021b).

Acredita-se que o perfil de COVs é característico para cada espécie de fungo, porém pode ser alterado por meio de mudanças nas condições nutricionais do substrato de cultivo, idade da cultura e, também, pela interação antagônica com outros fungos. Silva et al. (2021a), observaram a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por COVs de seis linhagens de *Trichoderma* emitido em fases distintas de desenvolvimento: crescimento micelial, esporulação e durante o pareamento com o patógeno. Quantificou-se também a esporulação das linhagens testadas. Em todas as três condições, os COVs produzidos por *T. azevedoi*, apresentaram efeito inibitório, embora a inibição tenha sido menos evidenciada quando as culturas de *S. sclerotiorum* estiveram expostas na fase de crescimento micelial do antagonista. Já a linhagem de *T. lentiforme* CEN1416 apresentou maior esporulação, fato não relacionado com melhor capacidade de inibir *S. sclerotiorum* pela produção de COVs.

Trabalhos de pesquisa são conduzidos com o objetivo de isolar compostos bioativos para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de doenças de plantas (SPITELLER 2015). Assim, Cai et al. (2013) caracterizaram o composto harzianolide produzido por *T. harzianum* SQR-T037. Relato dos autores indicam que harzianolide contribuiu para prevenir a infecção causada por *S. sclerotiorum* em plantas de tomate. As reduções das lesões nas fo-

lhas foram de 28,5 e 30,7%, quando o composto foi usado na concentração de 1 ppm e 0,1 ppm, respectivamente.

Em outro estudo realizado por Cruz-Magalhães et al. (2019), os COVs produzidos por *Trichoderma atroviride* IMI 206040 e linhagens mutantes de deleção dos genes *NoxR*, *Nox1* e *Nox2* foram comparados quanto à inibição micelial de *S. sclerotiorum*, pelo método da atmosfera compartilhada. Os resultados demonstraram que a linhagem selvagem e os mutantes de deleção dos genes *NoxR* e *Nox1* inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, ao contrário do mutante de deleção do gene *Nox2*. Esses achados sugerem que a produção de COVs com atividade antagonista é regulada pelo gene *Nox2*, enquanto os genes *NoxR* e *Nox1* poderiam estar relacionados a uma repressão das emissões dos COVs com efeitos inibitórios no crescimento micelial. Esses genes estão relacionados à transcrição de NADPAH oxidases, sendo essas as principais produtoras de espécies reativas de oxigênio em fungos (MARSCHALL & TUDZYNSKI 2016). Nesse mesmo estudo, foi analisado o perfil dos COVs emitidos pela linhagem selvagem e pelas linhagens mutantes, e ao se fazer uma correlação entre os compostos produzidos e os resultados de inibição micelial, foi possível sugerir que *Nox2* pode ser um regulador da produção de compostos pertencentes ao grupo das pironas e terpenos (CRUZ-MAGALHÃES et al. 2019). Ambos grupos estão relacionados a atividades antifúngicas de *Trichoderma* (RAMADA et al. 2019).

Silva et al. (2020) observaram a morfologia do micélio e o perfil proteico de *S. sclerotiorum* após a exposição aos COVs emitidos por seis linhagens de *Trichoderma*. Todas as linhagens do antagonista testadas diminuíram a largura das hifas do patógeno, com destaque para a linhagem de *T. atroviride* CEN1241, que também apresentou até 35% de inibição do crescimento micelial e maior efeito inibitório na produção de proteínas diferenciais, comparado ao tratamento controle de *S. sclerotiorum*.

Biofungicidas à base de *Trichoderma* são importantes aliados no manejo de doenças de plantas, incluindo o mofo-branco, em diferentes culturas. O uso desses produtos apresenta diversas vantagens e uma delas é o fato de atuarem em diferentes vias metabólicas dos patógenos, graças aos diferentes mecanismos de ação utilizados por esses fungos. Assim, vários desses produtos, além de dificulta-

rem a pressão de seleção de patógenos resistentes aos fungicidas, são capazes de controlar diversos agentes patogênicos. A atividade antimicrobiana dos COVs que os habilitam a atuar sobre micélio e escleródios de patógenos, incluindo *S. sclerotiorum* (OJAGHIAN et al. 2019), contribui para o controle preventivo da doença. Além do controle de patógenos, a emissão de COVs de *Trichoderma* também pode estar relacionada à promoção de crescimento de plantas, levando a um aumento de biomassa e crescimento de raízes secundárias (JALALI et al. 2017; WONGLOM et al. 2020).

5. Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* na promoção de crescimento de plantas

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, 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 entre si por meio de várias formas de sinalização. Os vegetais são capazes de sentir e responder à população bacteriana e fúngica que habita a rizosfera e aos seus produtos, como auxinas, citocininas e lactonas (ORTÍZ-CASTRO et al. 2009).

González-Peres & Acalde (2018), utilizando a técnica da placa de Petri dividida para avaliar o potencial de *T. virens* e *T. atroviride*, demonstraram que os COVs produzidos pelas duas espécies testadas influenciaram o crescimento de *Arabidopsis thaliana*. O incremento de peso fresco das plântulas foi maior com a linhagem de *T. virens* em meio BDA, cerca de 2,5 vezes o peso fresco obtido com a linhagem de *T. atroviride*. Além disso, as plântulas em contato com os COVs de *T. virens* em sistema dividido geraram um maior número de raízes laterais e um maior comprimento da raiz principal. Nesta interação, um total de 41 COVs foram detectados, compreendendo terpenos, álcoois, alcenos e cetonas, além de compostos aromáticos. Os terpenos foram os mais abundantes

(85,3%). Entre estes, a classe mais abundante foi a dos sesquiterpenos (SQTs), produzidos por ambas as espécies. Em relação às plântulas de *A. thaliana* sem interação com fungos, não foi detectada a produção de SQTs, o que comprova a produção dos compostos promotores do crescimento por linhagens de *Trichoderma*.

Estrada-Rivera et al. (2019), utilizando a técnica de placa dentro de placa observaram que a ausência de HDA-2 prejudica a capacidade de *Trichoderma* para colonizar raízes de *A. thaliana*, afetando assim a promoção do crescimento e modulação das defesas da planta. Além disso, os ensaios de placa dividida com nove COVs diferentes revelaram que 2-heptanol, 2-heptanona e 3-octanol promoveram o crescimento em mudas de *A. thaliana*, favorecendo a síntese de hormônios vegetais, como auxinas e etileno.

Outro estudo envolvendo a ação de COVs de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento de *A. thaliana* mostrou que esses compostos atuam em diferentes sistemas de defesa e desenvolvimento das plantas (JALALI et al. 2017). A presença de COVs de *Trichoderma* promoveu a formação de raízes laterais, o incremento de área foliar e intensificação da tonalidade verde escuro das folhas. As plantas expostas por 14 dias aos COVs de *T. koningii*, acumularam menos peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sob estresse salino. Esses resultados podem refletir o possível papel dos COVs produzidos por esta espécie de *Trichoderma*, na proteção de plantas contra o dano oxidativo sob estresse salino.

Lee et al. (2016) identificaram mais de 141 compostos exclusivos de *Trichoderma*, incluindo vários sesquiterpenos, diterpenos e tetraterpenos, os quais atuam como promotores de crescimento em plantas. A exposição de mudas de *Solanum lycopersicum* por 14 dias a esses compostos proporcionou um aumento significativo (41,2% de biomassa vegetal e 70% de teor de clorofila), em comparação com as plantas não expostas aos COVs do fungo. Os autores também observaram que o crescimento do tomateiro é dependente do período de exposição aos voláteis. A duração da exposição estendida em 21 dias levou a um aumento maior na biomassa vegetal (99,7%) e no teor de clorofila (100%). Além disso, os autores observaram que essas mudanças mediadas pelos COVs são espécie-específicas, mas variam entre linhagens de *Trichoderma*.

Lee et al. (2019) realizaram o primeiro relato

dos efeitos de concentrações de COVs sintetizados no crescimento de plantas e na expressão gênica em *A. thaliana*. Nesse estudo, sementes e plantas com 14 dias de idade foram submetidas à exposição de $0,5 \mu g L^{-1}$ de padrões químicos de 26 COVs emitidos por *Trichoderma* e identificados. Sete compostos (1-deceno, 2-heptilfurano, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-heptanona e 1-octen-3-ol) foram, ainda, testados à concentração fisiológica ($10 ng L^{-1}$). Os compostos 3-metil-1-butanol, 1-deceno e 2-heptilfurano promoveram aumentos significativos no peso fresco e no conteúdo total de clorofila. As plantas expostas ao 1-deceno apresentaram maior aumento no peso fresco da parte aérea (38,9%) e no teor de clorofila (67,8%). Uma análise de sequências de RNA foi realizada em plantas tratadas com vapores de 1-deceno. A expressão de 123 genes foi afetada diferencialmente, englobando genes envolvidos na modificação da parede celular, na indução de auxina, no estresse e respostas de defesa, bem como várias classes principais de genes relacionados ao estresse, mostrando regulação negativa.

Por sua vez, Nieto-Jacobo et al. (2017) mostraram que a produção de ácido indol-3-acético (IAA) é linhagem-dependente e diversos estímulos externos estão associados à sua produção. Esses autores mostraram que o comprimento da raiz primária de *A. thaliana* foi afetado negativamente pela interação com algumas linhagens de *Trichoderma*. Ensaios *in vivo*, utilizando solo como substrato, indicaram um efeito contínuo no crescimento da planta e isso também foi dependente da linhagem. Já ensaios *in vitro* revelaram que algumas linhagens de *Trichoderma* inibiram a expressão do gene repórter de auxina *DR5*, nas raízes primárias de *Arabidopsis*, mas não nas raízes secundárias. Quando culturas de *Trichoderma* e plantas de *A. thaliana* foram fisicamente separadas, observaram-se aumento da biomassa da parte aérea e da raiz, bem como aumento da produção de raízes e conteúdo de clorofila. Essas informações sugerem fortemente que a produção de voláteis pelo fungo exerceu influência sobre os parâmetros analisados. Em conjunto, os dados obtidos mostram que os mecanismos e moléculas envolvidas na promoção do crescimento vegetal por *Trichoderma* spp. são multivariáveis e são afetados pelas condições ambientais.

Wonglom et al. (2020), em estudos com plântulas de alface, utilizando a técnica de placa dividida,

constatarem que os COVs emitidos por *T. asperellum* T1 aumentaram significativamente o número de folhas e raízes, biomassa vegetal e teor de clorofila total na alface. Além disso, as análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massa revelaram que *T. asperellum* T1 emitiu 22 compostos voláteis, os quais estariam envolvidos na atividade antifúngica, induzindo respostas de defesa e promovendo o crescimento em alface.

Silva *et al.* (2021b) avaliaram também a promoção do crescimento de alface por *T. azevedoi* CEN1241, expondo as plantas aos COVs pela técnica de placa de Petri invertida, e, também, utilizando sacos de tecido voal preenchidos com solo, conforme descrita no item 3.3. Os resultados desses ensaios indicaram a presença de 33 COVs, os quais foram identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, cobrindo seis classes químicas diferentes: álcoois, ésteres, cetonas, compostos aromáticos, aldeídos e sesquiterpenos. Entre os 33 COVs detectados, 16 foram identificados e 6 foram inferidos. A maior diversidade de COVs foi de sesquiterpenos, seguidos por cetonas, ésteres, álcoois, aromáticos e aldeídos. Observou-se a promoção do crescimento das plantas, com incremento médio de 133% da massa fresca total, 30% da parte aérea, 28% do comprimento da raiz e 86% na largura da folha expandida, em plântulas de alface.

Como relatado, o número de trabalhos que mostram o efeito de COVs no crescimento de plantas ainda é limitado e foram conduzidos com um número restrito de culturas, em grande maioria utilizando *A. thaliana*. Esforços devem ser direcionados aos estudos com outras culturas, a fim de ampliar os conhecimentos sobre o papel dos COVs no controle biológico e na promoção do crescimento de plantas.

6. Perspectivas futuras

Do ponto de vista prático, a caracterização dos perfis químicos desses compostos pelo uso das técnicas analíticas de identificação é de vital importância, pois permite uma adequada seleção de isolados com maior eficiência e mais seguros para o controle de diferentes fitopatógenos.

Várias estratégias bioquímicas e moleculares podem ser aplicadas para identificar os genes e compostos envolvidos nas interações planta-patógeno-antagonista e possibilitam o entendimento das bases genéticas e moleculares do controle biológico de doenças. Sequenciamentos de nova geração

possibilitam o conhecimento do genoma completo de espécies de interesse e a identificação de genes transcritos durante essas interações tríplices. A edição genômica pela tecnologia Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9) possibilita a realização de alterações específicas no DNA genômico do organismo-alvo e vem trazendo grandes avanços nos estudos do genoma funcional de fungos agentes de controle biológico. Essa tecnologia foi utilizada em estudos com *T. reesei*, mostrando ser eficiente para introdução de deleções genômicas (VALADARES-INGLIS *et al.* 2020).

Compostos antimicrobianos contribuem significativamente para a atuação dos agentes de biocontrole e podem também ser isolados e sintetizados para produção em larga escala e comercialização. Entretanto, o maior problema quanto ao uso como fungicidas e/ou fertilizantes, no caso dos COVs, além da dificuldade para detecção de qual composto é realmente eficaz, é a rápida evaporação desses compostos à temperatura ambiente. Nesse contexto, a nanotecnologia apresenta grande potencial de aplicação, especialmente para liberação controlada de pesticidas e/ou fertilizantes, contribuindo para uma agricultura de precisão, na qual se busca a liberação de doses precisas desses produtos. Esta tecnologia também vem sendo estudada para melhorar a viabilidade e promover a liberação lenta dos produtos biológicos no ambiente, por conferir maior estabilidade a esses bioativos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a empresa Bionat Soluções Biológicas pelas bolsas de desenvolvimento tecnológico e industrial (DTI-A), concedidas.

REFERÊNCIAS

- ADAPAR (2021). Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Paraná. Available at: <https://www.adapar.pr.gov.br/>. Accessed on September, 11, 2021.
- AGRIOS GN (2005). Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Academic Press.
- 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 Bra-

- sileira de Ciência do Solo 40: 1-9. (<https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20150454>).
- ARSENIUK E, MACEWICZ J (1994). Scanning electron microscopy of sclerotia of *Sclerotinia trifoliorum* and related species. *Journal of Phytopathology* 141: 275-284. (<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1994.tb01471.x>).
- BAE SJ, MOHANTA TK, CHUNG JY, RYU M, PARK G, SHIM S, HONG SB, SEO H, BAE DW, BAE I, KIM JJ, BAE H (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control* 92: 128-138. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>).
- 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, BEZERRA, JL (2012). Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. Documentos 88. 155p.
- BISSET J (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. *Canadian Journal of Botany* 62: 924-931. (<https://doi.org/10.1139/b84-131>).
- BISSETT J, GAMS W, JAKLITSCH W, SAMUELS GJ (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus* 6: 263-295. (<https://doi.org/10.5598/ima fungus.2015.06.02.02>).
- BITAS V, KIM HS, BENNETT JW, KANG S (2013). Snining on microbes: Diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 835-843. (<https://doi.org/10.1094/mpmi-10-12-0249-cr>).
- BUTLER MJ, GARDINER RB, DAY A (2009). Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia* 101: 296-301. (<https://doi.org/10.3852/08-120>).
- 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. (<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.08.011>).
- 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. (<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015001200012>).
- 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. (<https://doi.org/10.3852/14-147>).
- 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. (<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.09.006>).
- CHOUDHARY DK, PRAKASH A, JOHRI BN (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology* 47: 289-297. (<https://dx.doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>).
- 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. (<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0938-5>).
- CRUZ-MAGALHÃES V, NIETO-JACOBO MF, VAN ZIJLL DE JONG E, ROSTÁS M, PADILLA-ARIZMENDI F, KANDULA D, KANDULA J, HAMPTON J, HERRERA-ESTRELLA A, STEYAERT JM, STEWART A, LOGUERCIO LL, MENDOZA-MENSOZA A (2019). The NADPH Oxidases Nox1 and Nox2 Differentially Regulate Volatile Organic Compounds, Fungistatic Activity, Plant Growth Promotion and Nutrient Assimilation in *Trichoderma atroviride*. *Frontiers in Microbiology* 9: 1-15. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03271>).
- DENNIS C, WEBSTER J (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotic. *Transactions British Mycological Society* 57: 41-48. ([https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80078-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5)).

- DERBYSHIRE M, DENTON-GILES M, HEGEDUS D, SEIFBARGHY S, ROLLINS J, KAN J, SEIDL MF, FAINO L, MBENGUE M, NAVAUD O, RAFFAELE S, HAMMOUN-KOSACK K, OLIVER SHR (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. (<https://doi.org/10.1093/gbe/evx030>).
- 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. (<https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>).
- EL-HASAN A, BUCHENAUER H (2009). Actions of 6-pentyl-alpha-pyrone in controlling seedling blight incited by *Fusarium moniliforme* and inducing defence responses in maize. *Journal of Phytopathology* 157: 697-707. (<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01565.x>).
- ELSHERBINY EA, AMIN BH, ALEEM B, KINGSLEY KL, BENNETT JW (2020). *Trichoderma* volatile organic compounds as a biofumigation tool against late blight pathogen *Phytophthora infestans* in postharvest potato tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68: 8163-8171. (<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03150>).
- ESTRADA-RIVERA M, REBOLLEDO-PRUDENCIO OG, PÉREZ-ROBLES DA, ROCHA-MEDINA MADC, GONZÁLEZ-LÓPEZ MDC, CASAS-FLORESA S (2019). *Trichoderma* Histone Deacetylase HDA-2 modulates multiple responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 179: 1343-1361. (<https://doi.org/10.1104/pp.18.01092>).
- EVEN M, GIRARD M, RICH A, HUTZLER C, LUCH A (2019). Emissions of VOCs from polymer-based consumer products: from emission data of real samples to the assessment of inhalation exposure. *Frontiers in Public Health* 7: 1-10. (<https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00202>).
- GARNICA-VERGARA A, BARRERA-ORTIZ S, MUÑOZ-PARRA E, RAYA-GONZÁLEZ J, MÉNDEZ-BRAVO A, MACÍAS-RODRÍGUEZ L, RUIZ-HERRERA LF, LÓPEZ-BUCIO J (2015). 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. (<https://doi.org/10.1111/nph.13725>).
- GONZÁLEZ FH, FUENTES MN (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciências Agrícolas* 34: 17-31. (<https://doi.org/10.22267/rcia.173401.61>).
- GONZALEZ-PEREZ D, ALCALDE M (2018). The making of versatile peroxidase by directed evolution. *Biocatalysis and Biotransformation* 36: 1-11. (<https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1363190>).
- 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: 114. (<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34500-w>).
- 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. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00891>).
- HADDAD PE, LEITE LG, LUCON CMM, HAKAKAVA R (2017). Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 52: 1140-1148. (<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017001200002>).
- HARMAN GE, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I, LORITO M (2004a). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56. (<https://doi.org/10.1038/nrmicro797>).
- 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. (<https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.2.147>).
- HATVANI L, VÁGVÖLGYI C, KREDICS L, DRUZHININA I (2014). DNA Barcode for species identification in *Trichoderma*. In: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Amsterdã: Elsevier. p.4155. (<https://doi.org/10.1016/C2012-0-00434-6>).
- HIDANGMAYUM A, DWIVEDI P (2018). Plant responses to *Trichoderma* spp., and their tolerance

- to abiotic stresses: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7: 758-766.
- 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. (<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.09.005>).
- HUSSEIN KA, LEE YD, JOO JH (2020). Effect of rosemary essential oil and *Trichoderma koningiopsis* T-403 VOCs on pathogenic fungi responsible for ginseng root rot disease. *Journal Microbiology Biotechnology* 30: 1018-1026. (<https://doi.org/10.4014/jmb.2002.02013>).
- HUTCHINGS ML, ALPHA-COBB CJ, HILLER DA, BERRO J, STROBEL SA (2017). Mycofumigation through production of the volatile DNA-methylating agent N-methyl-N-nitrosoisobutyramide by fungi in the genus *Muscodor*. *Journal Biological Chemistry* 292: 7358-7371. (<https://dx.doi.org/10.1074%2Fjbc.M117.779009>).
- 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. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228485>).
- 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. (<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.06.007>).
- KADDES A, FAUCONNIER ML, SASSI K, NASRAOUI B, JIJAKLI MH (2019). Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules* 24: 1-16. (<https://dx.doi.org/10.3390%2Fmolecules24061065>).
- KAMARUZZAMAN MD., ISLAM MD.S, MAHMUD S, POLASH SA, SULTANA R, HASAN MD.A, WANG C, JIANG C (2021). *In vitro* and *in silico* approach of fungal growth inhibition by *Trichoderma asperellum* HbGT6-07 derived volatile organic compounds. *Arabian Journal of Chemistry* 14: 1-21. (<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103290>).
- KOTTB M, GIGOLASHVILI T, GROSSKINSKY D, PIECHULLA B (2015). *Trichoderma* volatiles affecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-14. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00995>).
- KRAUSE-SAKATE R, PAVAN MA, MOURA MF, KUROSZAWA C (2016). Doenças da alface. In: Amorim L. Bergamim Filho A, Rezende JAM, Camargo LEA (Eds.). *Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas*. v.2, 5ª edição. Ouro Fino: Agrônoma Ceres. p.33-40.
- KUBICEK CP, HERRERA-ESTRELLA A, SEIDL-SEIBOTH V, MARTINEZ AD, DRUZHININA IS, THON M, ZEILINGER S, CASAS-FLORES S, HORWITZ BA, et al. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12: 1-15. (<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>).
- LAZAZZARA V, VICELLI B, BUESCHL C, PARICH A, PERTOT I, SCHUMACHER R, PERAZZOLI M (2021). *Trichoderma* spp. volatile organic compounds protect grapevine plants by activating defense-related processes against downy mildew. *Physiologia Plantarum* 172: 1950-1965. (<https://doi.org/10.1111/ppl.13406>).
- LE TORNEAU D (1979). Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology* 69: 887-890. (<https://doi.org/10.1094/Phyto-69-887>).
- 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. (<https://doi.org/10.1007/s00203-015-1104-5>).
- 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. (<https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>).
- LEE S, YAP M, BEHRINGER G, HUNG R, BENNETT W (2019). Effects of fungal volatile organic compounds on *Arabidopsis thaliana* growth and gene expression. *Fungal Ecology* 37: 19. (<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.08.004>).
- MACHADO DFM, PARZIANELLO FR, DA SILVA ACF, ANTONIOLLI ZI (2012). *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias* 35: 274-288 (<https://doi.org/10.19084/rca.16182>).
- MALMIERCA M, CARDOZA R, ALEXANDER N, MCCORMICK S, HERMOSA R, MONTE E, GUTIÉRREZ S (2012). Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and in the

- induction of plant defense related genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 4856-4868. (<https://doi.org/10.1128/AEM.00385-12>).
- MARQUES E, MARTINS I, MELLO SCM (2018). Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotropica* 18: 1-5. (<https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0418>).
- MARSCHALL R, TUDZYNSKI P (2016). Reactive oxygen species in development and infection processes. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 57: 138-146. (<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.020>).
- MELLO SCM, ECKSTEIN B, MARQUES E, CARVALHO DDC (2020). Controle de Doenças de Plantas. In: Fontes, EMG, Valadares-Inglis MC (Org.). *Controle Biológico de Pragas da Agricultura*. 1ed. Brasília: Embrapa, p.291-325.
- MISAGHI IJ (1982). *Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions*. Tucson: University of Arizona, 287p.
- MUKHERJEE PK, HORWITZ BA, KENERLEY CM (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology* 158: 35-45. (<https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0>).
- MYCOBANK (2020). Search on: Mycobank. Available at: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/39566>. Accessed on August, 12, 2021.
- 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. (<http://dx.doi.org/10.11648/j.ajls.s.2014020602.12>).
- NAWROCKA J, SZCZECHEM, MAŁOLEPSZA U (2018). *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. *Plant Protection Science* 54: 17-23. (<https://doi.org/10.17221/126/2016-PPS>).
- 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. (<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01202.x>).
- NIETO-JACOBO MF, STEYAERT JM, SALAZAR-BADILLO FB, VINGUYEN D, ROSTÁS M, BRAITHWAITE M, DE SOUZA JT, JIMENEZ-BREMONT JF, OHKURA M, STEWAR A, MENDOZA-MENDOZA, A (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. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>).
- NOGUCHI Y, SHIMBA N, TOYOSAKI H, EBISAWA K, KAWAHARA, Y, SUZUKI EI, SUGIMOTO S (2002). *In vivo* NMR system for evaluating oxygen-dependent metabolic status in microbial culture. *Journal of Microbiological Methods* 51: 73-82. ([https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(02\)00063-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00063-5)).
- O'BRIEN PA (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46: 293-304. (<https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>).
- 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. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.103999>).
- 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. (<https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047>).
- 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. (<https://doi.org/10.1111/jfq.12174>).
- PICHERSKY E, NOLE JP, DUDAREVA N (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811. (<https://doi.org/10.1126/science.1118510>).
- PIECHULLA B, LEMFACK MC, KAI M (2017). Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant, Cell and Environment* 40: 2042-2067. (<https://doi.org/10.1111/pce.13011>).
- PURDY LH (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69: 875-880. (<http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-69-875>).
- RAJANI P, RAJASEKARAN C, VASANTHAKUMARI MM, OLSSON SB, RAVIKANATH GR, UMA SHAANKER R (2021). Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research* 242: 1-12. (<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>).

- RAMADA MH, LOPES FAC, UHOA CJ (2019). *Trichoderma*: metabólitos secundários. In: Meyer MC, Mazaro SM, Silva JC. *Trichoderma*: uso na agricultura. 1ed. Brasília: Embrapa. pp.201-218.
- RIFAI MA (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116:1-56.
- ROBBERTSE B, STROPE 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: 114. (<https://doi.org/10.1093/database%2Fbax072>).
- 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. ([https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)).
- SARROCCO S, MATARESE F, BARONCELLI R, VAN NACCI 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. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-16-0139-R>).
- SCHENKEL D, LEMFACK, MC, PIECHULLA B, SPLIVALLO R (2015). A meta-analysis approach for assessing the diversity and specificity of below-ground root and microbial volatiles. Frontier Plant Science 6: 1-11. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00707>).
- SCHULZ-BOHM K, GERARDS S, HUNDSCHIED M, MELENHORST J, DE BOER W, GARBEVA P (2018). Calling from distance: attraction of soil bacteria by plant root volatiles. The ISME Journal, 12: 1252-1262. (<https://doi.org/10.1038/s41396-017-0035-3>).
- SCHULZ-BOHM, K, GEISEN S, WUBS EJ, SONG C, DE BOER W, GARBEVA P (2017). The prey's scent-volatile organic compound mediated interactions between soil bacteria and their protist predators. The ISME Journal, 11: 817-820. (<https://doi.org/10.1038/ismej.2016.144>).
- 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. (<https://doi.org/10.1093/chromsci/bms012>).
- 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. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104279>).
- SILVA LR (2020). Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle de mofo-branco e promoção de crescimento em alface. PhD Thesis, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.
- SILVA LR; MUNIZ PHPC, PEIXOTO GHS, LUCCAS BEGD, SILVA JBT, MELLO SCM (2021a). Mycelial inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. volatile organic compounds in distinct stages of development. Pakistan Journal of Biological Sciences 24: 527-536. (<https://doi.org/10.3923/pjbs.2021.527.536>).
- SILVA LR, VALADARES-INGLIS MC, PEIXOTO GHS, LUCCAS BEG, MUNIZ PHPC, MAGALHÃES DM, MORAES MCB, MELLO SCM (2021b). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma azavedoi* promote the growth of lettuce plants and delay the symptoms of white mold. Biological Control 152: 1-10. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104447>).
- 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. (<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0753-0>).
- 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. (<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012001100005>).
- SPECKBACHER V, RUZSANYI V, WIGGER M, ZEILINGER S (2020). The *Trichoderma atroviride* strains P1 and IMI 206040 differ in their light-response and VOC production. Molecules, 25: 1-16. (<https://doi.org/10.3390/molecules25010208>).
- SPITELLER P (2015). Chemical ecology of fungi. Natural Product Reports, 32: 971-993. (<https://doi.org/10.1039/c4np00166d>).
- 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. (<http://doi.org/10.5897/AJAR2015.9568>).
- STADNIK MJ, BETTIOL W (2000). Controle biológico de oídeos. In: Melo IS, Azevedo JL (Eds.) *Controle biológico*. v. 3. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 95-112.
- TÖFOLI JG, DOMINGUES RJ, FERRARI JT (2014). Míldio e mofo branco da alface: doenças típicas de inverno. *Biológico* 76: 19-24.
- VALADARES-INGLIS MC, FONTES EMG, FARIA MR (2020). Novas tecnologias aplicáveis ao controle biológico. In: Fontes, EMG, Valadares-Inglis MC (Org.). *Controle Biológico de Pragas da Agricultura*. 1ed. Brasília: Embrapa, v.1, p.291-325.
- 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. ([https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62593-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62593-1)).
- 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 (Eds.). *Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas*. v.2. 5ª ed. Ouro Fino: Agrônômica Ceres. pp. 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. (<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.100867>).
- WU BM, PENG YL, QIN QM, SUBBARAO KV (2007). Incubation of excised apothecia enhances ascus maturation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia* 99: 33-41. (<https://doi.org/10.3852/mycologia.99.1.33>).
- ZEILINGER S, GRUBERA S, BANSAL R, MUKHERJEE PK (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* - chemistry meets genomics. *Fungal Biology* 30: 74-90. (<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>).
- ZENG W, KIRK W, HAO J (2012). Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control* 60: 141-147. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.09.012>).