

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS
GERAIS - *CAMPUS* SÃO JOÃO EVANGELISTA
BACHARELADO EM AGRONOMIA

Douglas de Souza Ferreira Sena

**POTENCIAL DE USO DE UM PRODUTO COMERCIAL À BASE DE
Trichoderma harzianum NO CONTROLE DE *Ralstonia solanacearum***

São João Evangelista

2025

DOUGLAS DE SOUZA FERREIRA SENA

**POTENCIAL DE USO DE UM PRODUTO COMERCIAL À BASE
DE *Trichoderma harzianum* NO CONTROLE DE *Ralstonia solanacearum***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* São João Evangelista como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Natália Risso Fonseca

São João Evangelista

2025

S474p Sena, Douglas de Souza Ferreira.
Potencial de uso de um produto comercial à base de *Trichoderma harzianum* no controle de *Ralstonia solanacearum*/ Douglas de Souza Ferreira Sena– 2025.
25f.: il.

Orientador: Dra. Natália Risso Fonseca.
Trabalho de Conclusão de Curso (bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal Minas Gerais. *Campus* São João Evangelista, 2025.

1. Biocontroladores. 2. Antagonismo. 3. Antibiograma. 4. Fitossanidade. I. Sena, Douglas de Souza Ferreira. II. Instituto Federal de Minas Gerais *Campus* SJE. III. Título.

CDD 632.96


Catálogo: Esther Soares Cunha - CRB-6/4333

Douglas de Souza Ferreira Sena


**POTENCIAL DE USO DE UM PRODUTO COMERCIAL À BASE DE
Trichoderma harzianum NO CONTROLE DE *Ralstonia solanacearum***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* São João Evangelista como exigência para parcial para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.


Aprovada em 26/02/2025 pela banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 NATALIA RISSO FONSECA
Data: 26/02/2025 20:28:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. *D.Sc.* Natália Risso Fonseca (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 ROSIANE FATIMA DE ALMEIDA
Data: 26/02/2025 21:19:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. *D.Sc.* Rosiane Fátima de Almeida

Documento assinado digitalmente
 ALISSON JOSE EUFRASIO DE CARVALHO
Data: 26/02/2025 21:53:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. *D.Sc.* Alisson José Eufrásio de Carvalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha gratidão por tudo que houve, tudo que há e tudo que haverá, pela dádiva da existência, por poder experienciar da vida em sua plenitude, por mais essa dentre todas as etapas e conquistas em minha jornada nessa terra.

Gratidão aos meus pais, Eliana e Montalvani pela vida, amor e pela forma que me prepararam para o mundo, por sempre me apoiarem, incentivarem e aconselharem em toda a minha vida, buscando me orientar a ser um indivíduo melhor a cada dia.

Gratidão em especial aos meus avós Arleite, Dalila e Ana Rosa, pelo amor e por sempre terem me incentivado, apoiado, aconselhado e, por muitas vezes, me permitido permanecer financeiramente na faculdade.

À minha família que sempre esteve presente em minha caminhada, mesmo distantes geograficamente, estiveram sempre próximos demonstrando seu apoio, carinho e amor para comigo e foram a base para me fortalecer em momentos de fraqueza.

À Escola Agrícola Terra Mãe IEDUCA, bem como todos os profissionais e amigos que lá conheci, pela formação que me serviu de base, ponto de partida a qual atribuo parte crucial na escolha de minha formação.

Registro aqui minha gratidão aos meus professores do IFMG-SJE outras instituições de ensino onde passei, que contribuíram para minha formação durante o curso, que proporcionaram as construções do conhecimento durante esse processo, representados aqui pela pessoa que aceitou ser minha orientadora, Dra. Natália Risso Fonseca.

Obrigado aos meus amigos e colegas, que estiveram comigo, apoiaram, conviveram e contribuíram para a minha formação de maneira direta ou indireta, representados aqui por meus amigos da Barro Preguento, Willian, Caique, Phablo, Elias, Pedro, Erik e Heraldo, onde tive a oportunidade de conviver e desenvolver como ser humano.

À Fazenda Santa Catarina, nas pessoas da saudosa Ana Angélica, do Sr. João, Dândio e Marcelo, por me oportunizar vivenciar a experiência indescritível que foi o estágio no Projeto Veredas.

Agradeço ao meu colega e amigo Erik pela sua dedicação e apoio na execução do experimento deste trabalho.

Dedico ainda minha gratidão a minha esposa Deiziane, por seu companheirismo, amor, amizade, incentivo e apoio nessa fase final de minha formação.

Recebam meu sincero, **MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

Ralstonia solanacearum é uma bactéria fitopatogênica causadora da murcha bacteriana das solanáceas, doença distribuída em todo o mundo, que acomete mais de 50 famílias de plantas. Devido as dificuldades no manejo da doença, surge a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de controle que possam contribuir para a redução dos danos causados pela fitobactéria. Uma alternativa, ainda pouco estudada no controle de bactérias fitopatogênicas, é o uso de microrganismos com potencial antagônico, como fungos do gênero *Trichoderma*, os quais possuem características que conferem a eles elevado potencial de uso como biocontroladores. Diante do exposto, o presente projeto visou avaliar o produto comercial Trichodermil SC 1306®, à base de *Trichoderma harzianum*, sobre o crescimento de *R. solanacearum* em condições *in vitro*. A sensibilidade de *R. solanacearum* ao antagonista foi avaliada por meio do método do antibiograma, utilizando a técnica de difusão em disco. O ensaio foi realizado com quatro concentrações do produto comercial (T1: 0 mL.L⁻¹, T2: 2,5 mL.L⁻¹, T3: 5 mL.L⁻¹ e T4: 7,5 mL.L⁻¹) e cinco repetições. O antibiótico rifamicina sódica (10 mg/ml) foi utilizado como controle positivo do ensaio. Foi possível observar a formação de halos de inibição apenas ao redor dos discos impregnados com o antibiótico, obtendo-se um diâmetro médio de 2,87 mm, desconsiderando-se o diâmetro do disco. No restante dos tratamentos não foram observados halos de inibição, sendo que a bactéria colonizou e ocupou toda a superfície da placa no período de 24 horas. Neste mesmo período foi possível observar o crescimento micelial de *T. harzianum* sobre e ao redor dos discos de papel, indicando a viabilidade do produto avaliado, porém, sem ação inibitória no crescimento da bactéria. Diante dos resultados obtidos, foram formuladas duas hipóteses: a primeira sugere que o isolado fúngico avaliado não apresenta atividade antagônica contra a cepa bacteriano testada; e a segunda, que o tempo de cultivo foi insuficiente para que o fungo produzisse e liberasse substâncias antibacterianas no meio de cultura, antes do início do crescimento da bactéria. Estes resultados apontam a necessidade de desenvolver uma adaptação metodológica que leve em consideração as diferenças nas velocidades de crescimento dos microrganismos testados.

Palavras-chave: Biocontroladores. Antagonismo. Antibiograma. Fitossanidade.

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is a plant pathogenic bacterium responsible for bacterial wilt in solanaceous plants, a disease widespread globally, affecting over 50 plant families. Due to the challenges in managing the disease, there is a need for the development of new control methods that can help reduce the damage caused by this phyto bacterium. One alternative, still underexplored in the control of phytopathogenic bacteria, is the use of microorganisms with antagonistic potential, such as fungi of the *Trichoderma* genus, which possess characteristics that make them highly promising biocontrol agents. In this context, the present study aimed to evaluate the commercial product Trichodermil SC 1306[®], composed of *Trichoderma harzianum*, on the growth of *R. solanacearum* under *in vitro* conditions. The sensitivity of *R. solanacearum* to the antagonist was assessed using the antibiogram method with the disk diffusion technique. The experiment was conducted with four concentrations of the commercial product (T1: 0 ml.L⁻¹, T2: 2.5 ml.L⁻¹, T3: 5 ml.L⁻¹, and T4: 7.5 ml.L⁻¹) and five repetitions. Rifamycin sodium (10 mg/ml) was used as a positive control. Inhibition halos were observed only around the discs impregnated with the antibiotic, with an average diameter of 2.87 mm, excluding the diameter of the disc. No inhibition halos were observed in the other treatments, where the bacterium colonized and covered the entire surface of the plate within 24 hours. During the same period, the mycelial growth of *T. harzianum* was observed on and around the paper discs, indicating the viability of the evaluated product, although without inhibitory action on bacterial growth. Based on the results obtained, two hypotheses were formulated: the first suggests that the fungal isolate evaluated does not exhibit antagonistic activity against the tested bacterial strain; and the second suggests that the cultivation period was insufficient for the fungus to produce and release antibacterial substances into the culture medium before bacterial growth began. These results highlight the need for methodological adaptations that account for differences in the growth rates of the microorganisms tested.

Keywords: Biocontrol agents. Antagonism. Antibiogram. Plant health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Teste de difusão em disco para avaliação do produto comercial Trichodermil SC 1306® contra a fitobactéria <i>R. solanacearum</i> , após 24 horas de cultivo	18
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	<i>Ralstonia solanacearum</i>.....	11
2.2	Controle biológico de doenças de plantas.....	12
2.3	<i>Trichoderma</i> spp	13
2.4	Antibiograma	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Caracterização experimental.....	15
3.2	Preparo da suspensão de <i>R. solanacearum</i>.....	15
3.3	Antibiograma - teste de difusão em disco.....	16
3.4	Delineamento experimental e avaliação	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5	CONCLUSÃO	20
	REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

As bactérias fitopatogênicas são responsáveis por grandes perdas econômicas na agricultura, pois são capazes de acometer diversas culturas, causando doenças que acarretam desde redução da produtividade até, em alguns casos, a morte das plantas. Entre esses patógenos, destaca-se *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (1995), a qual tem sua importância na agricultura brasileira justificada pela sua elevada agressividade, ampla gama de hospedeiros, causando danos acentuados em culturas de interesse florestal e agrônomico, facilidade de disseminação, presença de condições climáticas favoráveis à infecção e dificuldades de manejo (LANNA, 2015).

Uma vez que medidas de manejo mais tradicionais e o controle preventivo muitas vezes não se mostram suficientes para o controle da *R. solanacearum*, se torna necessária a busca por novas formas de controle e o desenvolvimento de técnicas que possam ser incorporados ao manejo desta doença, a fim de minimizar os seus efeitos deletérios sobre os sistemas produtivos.

O controle biológico tem sido um método de controle de doenças muito estudado e utilizado nos últimos anos, por ser uma alternativa mais abrangente, com o potencial de promover grandes avanços nos sistemas produtivos agrários de todo o mundo. No mercado brasileiro estão disponíveis diversos produtos biológicos comerciais à base de fungos, como *Hansfordia pulvinata* para o controle de *Pseudocercospora ulei*, causador do mal das folhas da seringueira, e *Trichoderma* spp. para o manejo de patógenos de solo e de parte aérea. Também estão disponíveis bactérias, como *Bacillus* spp. para o controle de diversas doenças e *Pasteuria nishizawae* para o manejo de fitonematoides, além de diversos outros produtos (POMELLA; RIBEIRO, 2009).

Os organismos utilizados como antagonistas no controle biológico podem apresentar apenas um ou uma combinação de mecanismos de ação, sendo eles a antibiose, competição, indução de resistência, hipovirulência, parasitismo, predação e proteção cruzada (MICHEREFF, 2005). Fungos do gênero *Trichoderma* são organismos bem conhecidos e explorados na indústria biotecnológica. O efeito antagônico a diversos fitopatógenos e benefícios no desenvolvimento das plantas, além da capacidade de adaptar-se ao meio e produzir uma variedade de metabólitos, são algumas das razões para seu uso (MARTINES, 2013). O mecanismo de ação de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos consiste na ação isolada ou combinada de antibiose, por meio da excreção de metabólitos secundários no meio, da competição por água, nutrientes e espaço físico, além do parasitismo (MELO, 1998).

A ampliação do uso do controle biológico nos mais variados sistemas de cultivo traz a possibilidade de redução no uso de produtos químicos sintéticos e, com isso, menores riscos ambientais, maior sustentabilidade aos sistemas produtivos e uma série de benefícios a agricultura de maneira geral (BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B., 2009).

Levando-se em consideração as dificuldades no manejo de *R. solanacearum*, a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de controle e o potencial de utilização de microrganismos produtores de metabólitos antagônicos, este trabalho teve como objetivo analisar o efeito de um produto biológico comercial à base de *T. harzianum* no desenvolvimento da fitobactéria *R. solanacearum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Ralstonia solanacearum*

A bactéria *R. solanacearum* é um patógeno de solo que juntamente com a espécie *R. pseudosolanacearum*, são conhecidos por serem os agentes causais da doença chamada murcha bacteriana. Com distribuição global, acomete uma grande variedade de espécies de plantas, com potencial de infectar mais de 50 famílias, afetando principalmente plantas herbáceas, mas apresentando manifestações em plantas lenhosas (COUTINHO; WINGFIELD, 2017; SALANOUBAT, 2002).

Ralstonia solanacearum foi inicialmente descrita por Smith no ano de 1896 nas culturas da batata, berinjela e tomate e posteriormente identificada em 1908 na cultura do tabaco. Com a intensificação de cultivos de plantas hospedeiras como a banana, beringela, amendoim, batata, tabaco e tomate em grande escala nas Américas e na Austrália, regiões propícias ao patógeno, a disseminação foi favorecida (ÁLVAREZ, 2010). No Brasil, além de ser conhecida por afetar importantes culturas agrônômicas como tomate e batata, é um importante patógeno da cultura do eucalipto, em que apesar da sua ocorrência ter sido relatada em 1980, causou prejuízos significativos em viveiros de produção de mudas clonais em 2005 (ALFENAS *et al.*, 2006).

Este patógeno infecta naturalmente as plantas hospedeiras por meio de ferimentos no sistema radicular ou no caule, se alojando no xilema e promovendo sua obstrução, o que acaba por provocar a murcha da parte aérea, iniciando-se pela parte superior da planta, podendo evoluir para o estágio de murcha completa e morte (AGRIOS, 2005).

Devido a complexibilidade do manejo de patógenos do solo, como *R. solanacearum*, é difícil realizar o controle da doença após estar instalada em uma lavoura. Dessa forma, medidas preventivas são as mais indicadas como, escolher locais com solo livre do patógeno e priorizar áreas sem histórico de plantio de culturas susceptíveis, além de optar por solos arenosos e bem drenados, para evitar a umidade excessiva, que favorece à infecção pela fitobactéria (CAVALCANTE, 1999).

Por causar uma infecção de natureza sistêmica, a resistência genética à *R. solanacearum* é considerada uma das formas de manejo mais eficientes para o controle da doença em diversas culturas, como tomate e batata, conforme citado por Pena *et al.* (2010) e Muthoni *et al.* (2014), respectivamente, que afirmam como sendo uma estratégia necessária para possibilitar o plantio da cultura em solos contaminados. Em eucalipto, o plantio de clones

avaliados previamente quanto à resistência à doença é uma prática recomendada a ser incluída em programas de manejo integrado da doença (MAFIA *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2016).

2.2 Controle biológico de doenças de plantas

As doenças bacterianas em plantas são em geral de difícil controle, fazendo-se necessário o uso de combinações de diversos métodos para buscar um tratamento mais efetivo (MICHEREFF, 2001). No entanto, muitas das práticas utilizadas não apresentam elevada efetividade contra fitobactérias, o que reforça a necessidade de desenvolver novas técnicas e métodos que possam ser utilizados em grande escala para o manejo desses microrganismos (BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B., 2009).

O conceito de controle biológico pode ser definido como a utilização de organismos ou derivados para reduzir as fontes de inóculo ou a atividade de patógenos que provocam doenças (COOK; BAKER, 1983). Os mecanismos de antagonismo podem ser de natureza diversa, como antibiose, em que metabólitos de um organismo causam efeitos negativos sobre outro; competição, que ocorre quando dois organismos compartilham de um mesmo nicho ecológico; parasitismo, que consiste em um organismo viver ou se alimentar de outro; hiperparasitismo, ocorre quando um organismo parasita outro que também é um parasita, podendo ocorrer entre vários tipos de organismos, como insetos, protozoários, fungos e bactérias; e hipovirulência, em que uma linhagem do patógeno menos agressiva ou não patogênica é introduzida no ambiente ou diretamente no hospedeiro infectado, podendo transmitir essa característica para as linhagens patogênicas e a indução de defesa do hospedeiro, em plantas, refere-se à ativação de mecanismos naturais de defesa que fortalecem a resistência da planta contra patógenos (BERGAMIN; AMORIM; REZENDE, 1995).

O controle biológico por meio do uso de organismos antagônicos já vem sendo aplicado para diversas culturas no manejo de fitopatógenos como no estudo de Santin (2008), em que os resultados evidenciaram o potencial de controle de *Meloidogyne incognita* por *Trichoderma* spp. em feijoeiro, e por Isaias *et al.* (2014), que observaram resultados positivos avaliando o efeito inibitório de metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. sobre os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*.

O controle de bactérias fitopatogênicas por meio de substâncias e, ou organismos produtores de substâncias que causam efeito antagônico é uma área que apresenta grande demanda por mais estudos (MICHEREFF, 2001), no entanto, alguns estudos vêm sendo realizados com esse intuito. Mendonça (2018) avaliou o uso de Timorex Gold[®], a base de

extrato de *Melaleuca alternifolia*, obtendo resultados positivos na redução da mancha aureolada causada pela *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* na cultura do café. Rocha & Moura (2013) ao avaliar o efeito das rizobactérias *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. e *Bacillus* spp. no controle dos patógenos causadores da murcha do tomateiro, *R. solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, observaram redução no progresso de ambas as doenças, além da redução da murcha de fusarium. Gava *et al.* (2002), ao realizar a seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *R. solanacearum* em tomateiro, obteve inibição do crescimento da bactéria *in vitro* com todos os isolados testados, sendo que um isolado foi capaz de reduzir a incidência da doença *in vivo*, com apenas 36% das plantas apresentando sintomas de murcha, aos 48 dias de avaliação.

Quanto ao uso de fungos como *Trichoderma* spp. no controle de fitobactérias, Mohamed *et al.* (2020), observou que o uso do isolado T34 de *Trichoderma asperellum* suprimiu com sucesso o crescimento de *R. solanacearum* em condições *in vitro*, em planta e em campo, da mesma forma que Guo *et al.* (2021) também obteve resultados satisfatórios, indicando que metabólitos de *Trichoderma* spp. possuem atividade eficaz contra *R. solanacearum*.

2.3 *Trichoderma* spp.

Trichoderma é um gênero fúngico cujo habitat é o solo, apresentam um rápido crescimento, capacidade de produzirem conídios em abundância e são capazes de produzir diversas enzimas, características estas que lhes atribuem uma boa plasticidade ecológica (MARTINEZ, 2013). Devido a mecanismos como, excreção de enzimas antifúngicas e capacidade de realizar hiperparasitismo, as espécies desse gênero são antagonistas em potencial a alguns organismos fitopatogênicos (CARVALHO, 2011). Este fungo é bastante estudado, pois apresenta a capacidade de produzir metabólitos secundários com propriedades antibióticas e enzimas líticas que podem inibir ou destruir propágulos de fungos e bactérias, sendo as enzimas líticas causadoras de degradação de parede celular de fungos (MELO, 1998).

Estudos realizados identificaram alguns metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. com atividade antibacteriana, como a trichodermamicina e a gliotoxina, que atuam contra patógenos bacterianos, interrompendo processos celulares, como a síntese da parede celular e levando à inibição do crescimento bacteriano (GUO, 2021). Além destes, a trichodermin e o harzianum A (harzianelactones A), metabólitos ésteres diterpenóides e lactonas, respectivamente, também contribuem para a atividade antibacteriana. A natureza não volátil

desses compostos sugere que seus efeitos ocorrem por meio do contato direto com o patógeno (GUO, 2022).

Além de seu potencial de uso como controle biológico, alguns isolados de *Trichoderma* podem apresentar-se como estimulantes de crescimento vegetal, por produzirem substâncias que atuam de forma similar às auxinas e, por disponibilizar alguns nutrientes, como fosfato, para as plantas (HARMAN, 2000; VINALE *et al.*, 2008).

No mercado de produtos fitossanitários são encontrados diversos produtos à base de *Trichoderma spp.*, sendo que algumas espécies se destacam como as mais utilizadas, como a espécie *T. harzianum*, além de outras como *T. viride* e *T. asperelloides*. Produtos comerciais como Trichodermil SC 1306[®] à base de *T. Harzianum*; Powerfung[®] a base de *Trichoderma asperellum*; KBR PDG07[®] a base de *Trichoderma harzianum* e Congregga[®] a base de *Trichoderma asperellum*. Dentre as finalidades apresentadas nos referentes bulas podemos citar: ação de fungicida microbiológico, nematicida microbiológico, produtor de fitohormônios, melhorias na assimilação de nutrientes, aumento de resistência da planta a condições abióticas e outras funções vantajosas aos sistemas agrícolas.

2.4 Antibiograma

A metodologia de antibiograma, também conhecido como teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA), é aplicada para avaliar o grau de sensibilidade de microrganismos a fatores e ou agentes antimicrobianos, sendo o modelo de disco de difusão o mais utilizado mundialmente, o que se justifica pelo seu baixo custo e benefícios, como simplicidade, potencial de testagem de grande número de organismos e flexibilidade (COSTA, 2016).

O método de disco de difusão em ágar baseia-se na difusão do agente antimicrobiano aplicado no disco de papel para o meio de cultura, criando um gradiente de concentração. Quando o microrganismo é suscetível ao antimicrobiano, um halo de inibição é formado ao redor do disco, indicando a área onde o crescimento foi inibido. A medição do diâmetro desse halo permite avaliar a sensibilidade ou resistência do microrganismo ao composto testado (MEDICAL LAB NOTES, [s.d.]).

Para a realização da técnica, discos de papel impregnados com o agente antimicrobiano são distribuídos sobre um substrato previamente inoculado com o microrganismo cuja sensibilidade se deseja testar. O efeito inibitório do agente antimicrobiano é avaliado ao final de 1 ou 2 dias de incubação em temperatura controlada, mensurando-se o halo de inibição (LEMOS, 2020). Este método permite identificar se há algum grau de inibição

do organismo alvo, possibilitando obter resultados relevantes acerca das interações de microrganismos e os potenciais produtos de controle. Dessa forma, se torna um método adequado para avaliar o potencial efeito inibitório de *T. harzianum* sobre *R. solanacearum*.

Trabalhos como de Bona *et al.* (2014) fizeram uso do método de disco de difusão, obtendo-se resultados satisfatórios sobre bactérias Gram-positivas, negativas e leveduras. Da Cruz *et al.* (2001), ao avaliar o método de disco de difusão em ágar utilizando suspensões à base de isolados de *Trichoderma* spp. obteve alto nível de inibição do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização experimental

O ensaio foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal de Minas Gerais – *campus* São João Evangelista, localizado na cidade de São João Evangelista - MG, a qual situa-se a uma altitude média de 689 metros, latitude sul de 18° 32'46" e longitude oeste de 42° 45'35".

O isolado de *R. solanaceum* utilizado no trabalho foi obtido a partir de plantas de eucalipto sintomáticas, armazenado e cedido pelo Laboratório de Patologia Molecular, da Universidade Federal de Viçosa.

O produto microbiológico testado foi o Trichodermil SC 1306[®], formulado a base *T. harzianum* (cepa ESALQ-1306), registrado no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 2007 pela empresa Koppert, comercializado em uma suspensão concentrada com concentração mínima de $2,0 \times 10^9$ conídios viáveis/ml.

3.2 Preparo da suspensão de *R. solanacearum*

A bactéria foi cultivada em placas de Petri de 90 x 15 mm, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) ajustado ao pH 7.0 e incubadas por 24 horas a $28 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, com fotoperíodo de 12h, em BOD. Em seguida, a bactéria foi repicada para frascos erlenmeyeres contendo meio batata-dextrose líquido, ajustado com auxílio de peagmetro de bancada ao pH 7.0 e incubadas a 28°C, sob agitação, por 18 a 24 horas ou até que o meio começasse a ficar nitidamente turvo. Em seguida, a concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{540 \text{ nm}} = 0,1$, aproximadamente 10^9 UFC/ml (MARQUES, 2012).

3.3 Antibiograma - teste de difusão em disco

Para o preparo dos discos de papel-filtro que foram utilizados para a realização do antibiograma, foi utilizado um furador de papel comum, de 0,6 mm de diâmetro. Após a confecção dos discos, eles foram acondicionados em um recipiente e esterilizados em estufa, por um período de 4 horas, a 100°C.

O produto Trichodermil SC 1306[®] foi testado em quatro concentrações, estabelecendo os seguintes tratamentos, T1: 0,0 mL.L⁻¹ (testemunha); T2: 2,5 mL.L⁻¹; T3: 5,0 mL.L⁻¹ e T4: 7,5 mL.L⁻¹. O produto foi diluído em água esterilizada, utilizando béqueres de 100 ml de capacidade. O antibiótico rifamicina sódica (10 mg.mL⁻¹) foi utilizado como controle positivo do ensaio (T5).

Para a realização do antibiograma, através do método de disco de difusão, adaptou-se a metodologia descrita por Romeiro (2005). Foi feita a montagem de duas camadas de meios de cultura nas placas de Petri, uma camada básica e uma sobrecamada. A primeira camada, denominada camada básica, ficou em contato com a placa de Petri, com a finalidade de garantir a uniformidade, em termos de espessura, corrigindo eventuais desníveis e irregularidades que pudessem existir no fundo da placa, para correto assentamento da sobrecamada. Para o seu preparo foi esterilizado meio ágar-água a 2%, em seguida, o meio foi resfriado a 50 °C e vertido nas placas, de maneira a formar uma camada uniforme.

A segunda camada, denominada “sobrecamada”, foi preparada com o meio BDA semissólido (0,6 a 0,8%). Foram adicionados 8 ml do meio semissólido em um tubo de ensaio, utilizando uma pipeta semiautomática. Com a temperatura inferior a 50 °C, medida com um termômetro de sonda externa, foi adicionado a cada tubo, de maneira asséptica, 100 µl de *R. solanacearum* cultivada anteriormente em meio batata dextrose líquido, na concentração de 10⁹ UFC/ml, fazendo o tubo girar na palma das mãos para homogeneizar rapidamente o conteúdo, atentando-se para não se formarem bolhas de ar. Em seguida, o conteúdo foi vertido na superfície da camada básica, formando a sobrecamada e as placas foram mantidas em geladeira por 10 a 20 minutos, a fim de acelerar o processo de solidificação do meio.

Após a solidificação do meio, cinco discos de papel foram embebidos com 10 µl de cada tratamento, com o auxílio de uma micropipeta automática, e foram depositados equidistantemente na superfície da sobre camada em cada placa de Petri. Como testemunha (T1) foram utilizados 10 µl de água esterilizada em cada disco e para o controle positivo foram utilizados 10 µl de rifamicina sódica sem diluição sobre cada disco. As placas foram seladas com plástico filme e incubadas em B.O.D. à temperatura de 28 °C por 24 horas.

3.4 Delineamento experimental e avaliação

O experimento foi realizado seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos referentes as três diferentes concentrações de Trichodermil SC 1306[®] e cinco repetições. O antibiótico rifamicina sódica (10mg.ml⁻¹) foi avaliado como controle positivo. Para o tratamento testemunha foi utilizada água destilada.

A unidade experimental constituiu de uma placa de Petri contendo cinco discos de papel embebidos com uma suspensão do produto referente a cada tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. A análise estatística foi realizada empregando o software R 3.5.2 (2018), ao nível de significância de 5% de probabilidade.

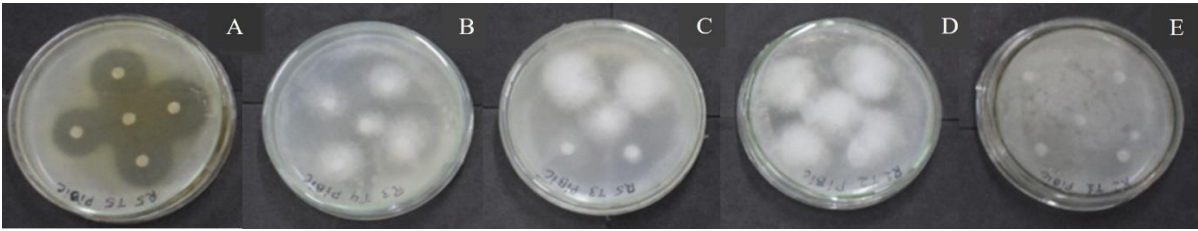
O potencial inibitório de cada concentração do produto foi avaliado por meio da mensuração do diâmetro dos halos de inibição, em dois eixos, com o auxílio de uma régua graduada, diariamente, a partir de 24h após a montagem do ensaio até o total crescimento das colônias na placa de Petri, realizado uma vez. Do valor obtido de cada diâmetro foi descontado o diâmetro do disco.

Os diâmetros dos halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo Committee For Clinical Laboratory Standards International (1997). A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi considerada como a menor concentração do tratamento testado capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes concentrações de uma suspensão à base de *T. harzianum* constituinte do produto Trichodermil SC 1306[®] para o controle de *R. solanacearum* foram testadas *in vitro*, pelo método de antibiograma de difusão em discos. Em todos os tratamentos, a bactéria se desenvolveu e ocupou toda a superfície da placa no período de 24 horas, exceto no controle positivo. Neste mesmo período foi possível observar o crescimento micelial de *T. harzianum* sobre e ao redor dos discos de papel, indicando a viabilidade do produto avaliado, porém, sem ação inibitória no crescimento da bactéria. A formação de halo de inibição foi verificada apenas no controle positivo, que foi empregado o antibiótico rifamicina sódica (10 mg.ml⁻¹), com uma zona de inibição média de 28,7 mm, desconsiderando-se o diâmetro do disco. No tratamento T1, testemunha, a colônia bacteriana de *R. solanacearum* ocupou toda a superfície do meio de cultura sem presença de crescimento micelial de *T. harzianum* (Figura 1).

Figura 1 - Teste de difusão em disco para avaliação do produto comercial Trichodermil SC 1306[®] contra a fitobactéria *Ralstonia solanacearum*, após 24 horas de cultivo:



A) Tratamento controle positivo com rifamicina sódica (10 mg.ml⁻¹); B) T4 com 7,5 ml.L⁻¹ de Trichodermil SC 1306[®]; C) T3 com 5,0 ml.L⁻¹ de Trichodermil SC 1306[®]; D) T2 com 2,5 ml.L⁻¹ de Trichodermil SC 1306[®] e; E) T1 com 0,0 ml.L⁻¹ de Trichodermil SC 1306[®].

Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

A ausência de formação de halos de inibição ao redor dos discos aponta que não houve efeito antagônico de *T. harzianum* sobre *R. solanacearum* nas condições avaliadas, porém, como houve o crescimento micelial do fungo sobre o disco de papel e meio de cultura, sobrepondo a mesma área ocupada pelas colônias bacterianas, pode-se inferir que a presença da bactéria no meio não constitui um fator limitante para o crescimento do fungo.

Segundo Sharma (2020), a antibiose do *Trichoderma* spp. está centrada na produção de metabólitos secundários difusíveis de baixo peso molecular que interagem e reduzem o crescimento de outros microrganismos, inibindo-os.

Guo *et al.* (2021), avaliando o efeito de metabólitos extraídos de isolados de *Trichoderma* spp. observaram atividade antagônica à *R. solanacearum* por meio da técnica de difusão em poços. Por meio de análise de microscopia eletrônica de varredura, os autores indicaram que nem todos os metabólitos produzidos por diferentes espécies de *Trichoderma* exibiram a mesma atividade antibacteriana. Os isolados de *T. harzianum* cultivados no meio STP apresentaram metabólitos com maior atividade antibacteriana, com zonas de inibição de 17,6 mm em teste contra *R. solanacearum* (cepa RS13). No entanto, os autores enfatizam que o efeito dos metabólitos pode variar conforme a cepa bacteriana testada. Em contraste, o presente estudo, utilizou isolados de *Trichoderma* cultivados por um período de 3 dias, enquanto no trabalho de Guo (2021) o tempo de cultivo foi de 7 dias. Esta diferença no período de cultivo pode talvez implicar em variações na produção dos metabólitos trichodermin e harzianum A, influenciando a síntese e atividade destes metabólitos antibacterianos.

Em seu trabalho, Yendyo (2017) ao analisar o antagonismo de *Trichoderma* spp. no crescimento de *Ralstonia* spp., obteve halos de inibição de 20,67 mm *in vitro* e em plantas de tomate inoculadas com a fitobactéria constatou uma eficácia de 92% na redução da doença,

sendo que, ao combinar com a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, obteve 97% de redução da infestação. Sutarman (2020) concluiu, a partir de testes de campo e laboratoriais, que *T. asperellum* proporcionou proteção para plantas jovens de tabaco contra *R. solanacearum*, em que a inoculação do fungo foi realizada 6 horas antes, em simultâneo e 6 horas após a inoculação do patógeno, retardando o início dos sintomas em 100, 162 e 154%, reduzindo o índice dos sintomas em 63, 56 e 56% e aumentando em 39, 42% e 53% da biomassa vegetal de plantas de tabaco, respectivamente, quando comparadas com as não inoculadas, concluindo que nos três momentos de aplicação há efeito positivo significativo.

De acordo com os estudos de Zhang Y (2021) e Yan (2021), metabólitos com atividade antibacteriana contra *Ralstonia* incluem compostos como a trichodermamicina e a gliotoxina. Além disso, ácidos orgânicos, como o ácido gálico e o ácido oxálico, desempenham um papel fundamental na inibição do patógeno, enquanto enzimas como quitinases e glucanases são essenciais na degradação da parede celular bacteriana, contribuindo significativamente para a inibição do crescimento da bactéria. No entanto, os mesmos autores destacam que a produção desses metabólitos pode ser afetada por diversos fatores como temperatura, disponibilidade de nutrientes e presença de metais. A produção de trichodermamicina e gliotoxina é mais eficaz quando o fungo atinge a fase de maturação, geralmente ocorrendo após 7 a 10 dias de cultivo e a produção de enzimas, como quitinases e glucanases, também é consideravelmente maior após 5 a 7 dias de cultivo.

Embora trabalhos anteriores demonstrarem o efeito antagônico de espécies de *Trichoderma* à *R. solanacearum*, verificamos que, nas condições testadas, não houve controle do crescimento bacteriano. Entre as hipóteses levantadas para esse resultado, a primeira sugere que o isolado fúngico que compõe o produto comercial utilizado não possui atividade antagônica sobre a cepa bacteriana testada. A segunda hipótese considera que não houve tempo de cultivo suficiente para o fungo produzir e difundir os metabólitos antibacterianos no meio de cultura, antes do crescimento da bactéria. De fato, estudos como o de Zhang X (2021) indicam que, inicialmente, os fungos realizam o seu crescimento vegetativo produzindo metabólitos antimicrobianos apenas em estágios subsequentes. Essa constatação, somada a outros estudos relatados anteriormente, evidencia a necessidade de uma adaptação metodológica que considere a diferença nas velocidades de crescimento dos microrganismos testados.

5 CONCLUSÃO

O produto Trichodermil SC 1306[®], a base de *T. harzianum*, não apresentou efeito contra a fitobactéria *R. solanacearum*, sob as condições testadas.

Os resultados obtidos destacam a necessidade de adaptar a metodologia utilizada para a avaliação de suspensões de isolados fúngicos contra bactérias em meio de cultura, a fim de compensar as diferenças nas velocidades de desenvolvimento entre os microrganismos analisados, de forma a obter resultados mais precisos.

Nesse sentido, recomenda-se a realização de novos experimentos com as devidas modificações metodológicas, a fim de avaliar de maneira mais eficaz o potencial de isolados e produtos à base de *Trichoderma* contra essa importante espécie fitopatogênica.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/slideshow/agrios-2005-plant-pathology-5-edpdf/257736607>>. Acesso em: 27 fev. 2025.
- ALFENAS, A. C. *et al.* *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 349-355, 2006. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/fb/a/bvtDks4BCR5T3xdHDpGqYHm/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 20 set. 2022.
- ÁLVAREZ, B. *et al.* On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, [s.l.], v. 1, p. 455-463, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/267772811_On_the_life_of_Ralstonia_solanacearum_a_destructive_bacterial_plant_pathogen>. Acesso em: 20 set. 2022.
- BERGAMIN, A. F.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. Piracicaba: Departamento de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1995.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/579954/1/livrobiocontrole.pdf>>. Acesso em: 07 mar. 2025.
- BONA, E. A. M. D. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, p. 218-225, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/aib/a/mwDLMCbVGPRvH4gdFNJMV4F/?lang=pt&format=html>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- CARVALHO, D. *et al.* Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 4-9, jan./fev. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762011000100004>. Acesso em: 25 set. 2022.
- CAVALCANTE, M. J. B. A murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em pimenta longa (*Piper hispidinervum*). **Instruções Técnicas** – Embrapa, n. 24, 1999. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/492541/1/it24.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2022.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, p. 135-139, 1983. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19841396200>>. Acesso em: 27 set. 2022.
- COSTA, L. F. R. **Sistema de automatização do antibiograma por disco-difusão em**

aplicação clínica e ambiental. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Faculdade Gama, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://www.realp.unb.br/jspui/handle/10482/22126>>. Acesso em: 20 set. 2022.

COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. *Ralstonia solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* on *Eucalyptus*: opportunists or primary pathogens? **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 8, p. 761, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00761/full>>. Acesso em: 20 set. 2022.

DA CRUZ, S. C. *et al.* Teste de produtos químicos e biológicos no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., patógeno da cebola. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 111-115, jul. 2001. In: EMPRABA SEMIÁRIDO, Artigo em anais de congresso. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/134305>>. Acesso em: 13 out. 2022.

FONSECA, N. R. *et al.* An efficient inoculation method of *Ralstonia solanacearum* to test wilt resistance in *Eucalyptus* spp. **Tropical Plant Pathology**, São Paulo, v. 41, p. 42-47, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-015-0056-2>>. Acesso em: 4 jan. 2023.

GAVA, C. A. T. *et al.* Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 1373-1380, 2002. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pab/a/VHTc3cZmFwrX3NDF3Ff/?lang=pt&format=html>>. Acesso em: 13 out. 2022.

GUO, Y. *et al.* Sustainable management of soil-borne bacterium *Ralstonia solanacearum* in vitro and in vivo through fungal metabolites of different *Trichoderma* spp. **Sustainability**, Basel, v. 13, n. 3, p. 1491, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2071-1050/13/3/1491#B51-sustainability-13-01491>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

GUO, R. *et al.* Structures and biological activities of secondary metabolites from *Trichoderma harzianum*. **Marine Drugs**, Basel, v. 20, n. 11, p. 701, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-3397/20/11/701>>. Acesso em: 25 nov. 2024.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>>. Acesso em: 12 out. 2022.

ISAIAS, C. O. *et al.* Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 40, p. 34-41, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/sp/a/McsgynHvwMmYysbwGVnqvvw/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 27 set. 2022.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Fortaleza, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/233140814.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2022.

LEMOS, M. **Antibiograma: como é feito e como entender o resultado**. Tua saúde, 2020. Disponível em: <<https://www.tuasaude.com/antibiograma/>>. Acesso em: 22 set. 2022.

MAFIA, R. G. *et al.* Avaliação da resistência do eucalipto à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, p. 649-656, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rarv/a/nY7F6mqtSLxwD5tRMYWGFwS/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 12 out. 2022.

MARTÍNEZ, B. *et al.* *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. **Rev. Protección Vegetal**, La Habana, v. 28, n. 1, p. 1-10, jan.-abr. 2013. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001>. Acesso em: 10 set. 2022.

MEDICAL LAB NOTES. **Antimicrobial Susceptibility Testing (AST): Introduction, Principle, Test Methods, Test Requirements, Procedure and Result Interpretation, Application and Keynotes**. [s.d.]. Disponível em: <<https://medicallabnotes.com/antimicrobial-susceptibility-testing-ast-introduction-principle-test-methods-test-requirements-procedure-and-result-interpretation-application-and-keynotes/>>. Acesso em: 8 out. 2024.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Vol. 1. Jaguariúna, SP: Embrapa, 1998. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/12980/2/Melo-controleV1-3536.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2022.

MENDONÇA, P. L. P. Avaliação do fungicida bactericida natural Timorex Gold no controle de mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 44., 2018, Franca. **Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeiras**. Brasília, DF: Embrapa Café, 2018. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/11556/63_44-CBPC-2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 13 out. 2022.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de fitopatologia**. Recife, PE: Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitopatologia, 2001. Disponível em: <<https://www.bibliotecaagpatea.org.br/agricultura/defesa/livros/FUNDAMENTOS%20DE%20FITOPATOLOGIA.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2022.

MICHEREFF, S. J. *et al.* **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. Disponível em: <http://repository.ufrpe.br/bitstream/123456789/2399/1/livro_patologiaemanejoradiculares.pdf>. Acesso em: 26 set. 2022.

MOHAMED, B. F. F. *et al.* Approving the biocontrol method of potato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) using *Enterobacter cloacae* PS14 and *Trichoderma asperellum* T34.

Egyptian Journal of Biological Pest Control, v. 30, p. 1-13, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s41938-020-00262-9>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

MUTHONI, J. *et al.* Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia*

solanacearum (Smith) (Yabuuchi *et al.*) in the tropical highlands. **American Journal of Potato Research**, v. 91, n. 2, p. 215-232, 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12230-013-9340-1>>. Acesso em: 12 out. 2022.

PENA, M. A. A. *et al.* Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de tomateiro sob cultivo em solos de terra firme e várzea da Amazônia infestados por *Ralstonia solanacearum*. **Bragantia**, v. 69, p. 27-37, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/brag/a/zv6HD6HwZJqTNb9fWCLHZQJ/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 13 out. 2022.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – uma visão empresarial. In: BETTIOL, W. (org.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 239-244. Disponível em: <<https://drauziorangel.wordpress.com/wp-content/uploads/2016/10/bettiol-2009-biocontrole-de-doencas-de-plantas.pdf#page=235>>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ROCHA, D. J.A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 423-430, 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/tpp/a/SmCQFvxk6SzsLK47cMDY5zs/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 13 out. de 2022.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. 1. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 279 p.

SALANOUBAT, M. *et al.* Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Laboratoire de Biologie Moléculaire des Interactions Plantes-Microorganismes INRA-CNRS**, BP27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France. 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/415497a>>. Acesso em: 20 set. de 2022.

SANTIN, R. C. M. **Potencial do uso dos fundos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2008. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/15383>>. Acesso em: 27 set. 2022.

SHARMA, A. *et al.* Trichoderma: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. **Plants**, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/9/6/762#metrics>>. Acesso em: 10 jul. 2024.

SUTARMAN, S. *et al.* Characterizations of *Trichoderma* sp. and its effect on *Ralstonia solanacearum* of tobacco seedlings. **Journal of Tropical Plant Pests and Diseases**, v. 21, n. 1, p. 8-19, 2021. Disponível em: <<https://jhptropika.fp.unila.ac.id/index.php/jhptropika/article/view/566>>. Acesso em: 27 nov. 2023. VINALE, F. *et al.* *Trichoderma* plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2008. Disponível em: <<https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOMYCJ-8-127>>. Acesso em: 12 out. 2022.

YABUUCHI, E. *et al.* Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb.

nov. **Microbiology and immunology**, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/mandi1977/39/11/39_11_897/_article/-char/ja/>. Acesso em: 12 out. 2022.

YAN, L. *et al.* Biological control of bacterial wilt in tomato through the metabolites produced by the biocontrol fungus, *Trichoderma harzianum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, 2021. Disponível em: <<https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-020-00351-9>>. Acesso em: 20 out. 2024.

YENDYO, S.; RIBEIRO, G. C.; PANDEY, B. R. Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* for biological control of *Ralstonia* wilt of tomato. **F1000Research**, v. 6, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5854981/>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

ZHANG, X. *et al.* *Trichoderma*: A Treasure House of Structurally Diverse Secondary Metabolites With Medicinal Importance. **Front. Microbiol.**, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.723828/full>>. Acesso em: 10 ago. 2024.

ZHANG, Y. *et al.* Sustainable Management of Soil-Borne Bacterium *Ralstonia solanacearum* In Vitro and In Vivo through Fungal Metabolites of Different *Trichoderma* spp. **Sustainability**, 2021. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/348943604_Sustainable_Management_of_Soil-Borne_Bacterium_Ralstonia_solanacearum_In_Vitro_and_In_Vivo_through_Fungal_Metabolites_of_Different_Trichoderma_spp>. Acesso em: 20 out. 2024.