

Antagonismo de Fungos Filamentosos Sobre o Fungo Fitopatogênico *Alternaria* sp.

Antagonism of Filamentous Fungi Against Phytopathogenic Fungi *Alternaria* sp.

Ari Emerson Xavier Teodoro^a; Júlia Karoline Ferreira Moura^a; Maria Gabriela Gomes de Lima^a; Milena Campos de Oliveira Alencar Viana^a; Marcos Cabral de Vasconcellos Barretto^a; Regina Helena Marino^{*b}

^aUniversidade Federal de Sergipe, Departamento de Engenharia Agrônômica, Laboratório de Microbiologia Agrícola. SE, Brasil.

^bUniversidade Federal de Sergipe, Departamento de Engenharia Agrônômica, Laboratório de Microbiologia. SE, Brasil.

*E-mail: rehmarino@hotmail.com

Resumo

A busca por formas alternativas de controle de fitopatógenos ao controle químico vem crescendo, com o intuito de reduzir o consumo de pesticidas e a contaminação ambiental. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e avaliar o potencial de fungos das sementes e/ou das plântulas de alface no desenvolvimento *in vitro* do isolado ALT23 do fungo *Alternaria* sp. As cultivares de alface utilizadas foram: 'Brava', 'Hanson' e 'Itapuã'. A ação antifúngica dos isolados fúngicos obtidos foi avaliada pelo método de confronto duplo em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) durante cinco dias. Os fungos obtidos foram: BRF1 – *Aspergillus niger*, HSF1 – *Aspergillus* sp. e IF1 – *Trichoderma* sp. A porcentagem de inibição do crescimento do diâmetro micelial, da velocidade de crescimento e do número de esporos do fungo fitopatogênico variou de 30 a 54,9%, de 48,9 a 93,2% e de 88,3 a 100%, respectivamente. O aumento do período de cultivo dos isolados BRF1, HSF1 e IF1 favoreceu a inibição do crescimento do fungo ALT23. A avaliação do potencial antifúngica de fungos isolados das sementes de alface deve ser realizada a partir do 2º dia de cultivo, conforme o isolado. Todos os isolados fúngicos testados apresentam potencial antagonístico *in vitro* contra o isolado do fungo ALT23 de *Alternaria* sp.

Palavras-chave: *Aspergillus*. *Trichoderma*. Controle Biológico.

Abstract

The search for alternative forms of phytopathogen control to chemical control has been growing, with the aim of reducing pesticide consumption and environmental contamination. In this respect, the objective of this work was to isolate, identify and evaluate the potential of fungi from lettuce seeds and/or seedlings in the *in vitro* development of the ALT23 isolate of the fungus *Alternaria* sp. The lettuce cultivars used were: 'Brava', 'Hanson' and 'Itapuã'. The antifungal action of the fungal isolates obtained was evaluated by the double confrontation method in potato-dextrose-agar culture medium for five days. The fungi obtained were: BRF1 - *Aspergillus niger*, HSF1 - *Aspergillus* sp. and IF1 - *Trichoderma* sp. The percentage of inhibition of growth in mycelial diameter, growth rate and number of spores of the phytopathogenic fungus ranged from 30 to 54.9%, 48.9 to 93.2% and 88.3 to 100%, respectively. Increasing the cultivation period of isolates BRF1, HSF1 and IF1 favored the inhibition of ALT23 growth. The antifungal potential of fungi isolated from lettuce seeds should be assessed from the 2nd day of cultivation, depending on the isolate. All the fungal isolates tested showed antagonistic potential *in vitro* against *Alternaria* sp. isolate ALT23.

Keywords: *Aspergillus*. *Trichoderma*. Biological Control.

1 Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça rica em água, vitaminas, minerais e compostos bioativos, como polifenóis, carotenoides, antioxidantes importantes para uma dieta saudável (Shi *et al.*, 2022).

No cultivo desta hortaliça, a ocorrência do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. causa perdas significativas na produção, por causar manchas foliares, cuja principal forma de controle tem sido a aplicação de fungicidas químicos (Amorim; Bergamin Filho; Rezende, 2018; Miranda-Apodaca *et al.*, 2023). Entretanto, os fungicidas sintéticos possuem metais pesados e alta toxicidade no ambiente e para saúde (Castro *et al.*, 2020).

De forma alternativa e ecológica, o uso de micro-organismos no controle biológico contribui para produção de

alimentos sem resíduos químicos tóxicos e que não contamina o ambiente (Duré *et al.*, 2018; Franco *et al.*, 2022; Faberi *et al.*, 2023; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2023). Neste contexto, o uso de bactérias e de fungos filamentosos endofíticos, aquáticos e do solo tem se destacado por reduzirem a ocorrência de doenças em campo, por estimular o crescimento das plantas hospedeiras e possibilitar a sobrevivência das plantas em condições adversas (Alanzi *et al.*, 2023; Bhat *et al.*, 2023; Dethoup; Kumila; Kijjoa, 2015; Dong *et al.*, 2019; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018; Sridharma *et al.*, 2020; Silva; Dourado, 2022; Zhao *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2024).

No controle biológico de fitopatógenos, os fungos filamentosos *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. tem apresentado potencial antagonístico *in vitro* e *in vivo* contra os fungos *Alternaria alternata*, *A. solani* (Ramírez-Cariño

et al., 2020; Faberi et al., 2023), *Fusarium* spp. (Patil et al., 2017; Mangabiello et al., 2024), *Globisporangium ultimum* (Moussa et al., 2023), *Corynespora cassicola* e *Curvularia aerea* (Baiyee et al., 2019), *Pythium* sp. (Salem et al., 2019), *Macrophomina phaseolina* (Khan; Javaid, 2022), *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhang et al., 2024).

Além disso, o fungo *Aspergillus nomiae* também foi eficaz no controle das larvas de *Spodoptera litura*, *Chilo suppressalis* e *Ostrinia fumacalis* e aos adultos *Rhopalosiphum padi* e *Acyrtosiphon pisum* (Zhang et al., 2024), os quais podem ser considerados micro-organismos multifuncionais no controle de doenças e de pragas.

Os fungos filamentosos antagonísticos a fitopatógenos produzem compostos antimicrobianos fenólicos não voláteis e voláteis, enzimas líticas e oxidativas, induzem a resistência sistêmica na planta hospedeira e a lignificação da parede vegetal, bem como atuam diretamente sobre as hifas e os esporos por micoparasitismo. Além disso, os micro-organismos antagonísticos podem promover o crescimento da planta hospedeira e a resistência a fatores bióticos ou abióticos através da solubilização de fosfato e síntese de hormônios como ácido indol-acético (Salem et al., 2019; Azevedo et al., 2021; Faberi et al., 2023; Mangabiello et al., 2024; Philip et al., 2024)

Em alface, Manganiello et al. (2024) obtiveram que os isolados de *T. harzianum* Ts e T2 inibiram o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* *in vitro*. Da mesma forma, o *T. spirale* T76-1 reduziu o crescimento micelial dos fungos *Corynespora cassicola* e *Curvularia aerea* e a incidência da doença em alface (Baiyee et al., 2019). O inoculante comercial de *T. viride* e o fungo *Aspergillus niger* obtido do solo rizosférico da berinjela (*Solanum melongena* L.) também reduziu a ocorrência da doença causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* em relação ao tratamento controle (Patil et al., 2017).

Entretanto, os isolados de micro-organismos com potencial de biocontrole frequentemente são obtidos de espécies vegetais diferentes das plantas hospedeiras dos patógenos que se deseja controlar e/ou de ambientes aquáticos (Azevedo et al., 2021; Bhat et al., 2023; Dethoup; Kumila; Kijjoa, 2015; Gill et al., 2023; Martinuz, 2020; Sun et al., 2018; Wu et al., 2019), cuja eficiência pode ser influenciada pela interação microbiana com a planta hospedeira em específico (Yan et al., 2015).

Desta forma, a seleção *in vitro* de micro-organismos de hortaliças com potencial no controle de fitopatógenos nas mesmas espécies de hortaliças pode representar uma alternativa rápida, econômica e ecológica.

O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e avaliar o potencial antagonista de fungos presentes em sementes e/ou plântulas de cultivares de alface contra o fungo fitopatogênico *Alternaria* sp.

2 Material e Métodos

2.1 Inoculante do isolado fitopatogênico

O fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. utilizado foi o isolado ALT23 pertencente à micoteca do Laboratório de Microbiologia agrícola do Departamento de Engenharia Agrônômica (DEA), da Universidade Federal de Sergipe.

O isolado fúngico foi multiplicado em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, 39 g L⁻¹) e incubado em temperatura ambiente durante cinco dias. O meio de cultura contendo o micélio do fungo ALT23 foi utilizado como inoculante.

2.2 Cultivares de alface

As sementes das cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) utilizadas 'Brava', 'Hanson' e 'Itapuã' foram produzidas pela empresa Isla Sementes Ltda sem tratamento químico.

2.3 Isolamento e identificação de fungos filamentosos antagonísticos

Para obter os isolados fúngicos filamentosos foram selecionadas ao acaso 50 sementes de cada cultivar de alface. Em seguida, as sementes foram desinfestadas superficialmente pela imersão em solução de álcool 70% por 1 min, em solução de hipoclorito a 0,2% por 1 min e tríplice lavagem com água destilada autoclavada por 3 min (Alfenas; Mafía, 2007).

As sementes desinfestadas por cultivar foram depositadas sobre duas folhas de papel filtro autoclavadas acondicionadas em caixas Gerbox® e umedecidas com água destilada autoclavada. Foram realizadas duas repetições com 25 sementes em cada Gerbox®. A incubação foi realizada em temperatura ambiente e no terceiro dia da semeadura foram adicionados 5 mL de água destilada autoclavada.

No quinto dia de cultivo, as plântulas já germinadas e com maior desenvolvimento foram selecionadas, sendo retirados quatro fragmentos da radícula e da parte aérea. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo aproximadamente 15 mL de meio de cultura BDA. Foram realizadas quatro repetições, por cultivar. A incubação foi realizada também em temperatura ambiente durante sete dias.

Os fungos filamentosos isolados das sementes e/ou nas plântulas, por cultivar, foram identificados ao microscópio óptico com aumento de até 400x, com base nas estruturas reprodutivas, segundo Barnett e Hunter (1998).

Os isolados fúngicos obtidos foram identificados pelas siglas: HSF (cultivar Hanson), IF (cultivar Itapuã), BRF (cultivar Brava), seguido pelo número sequencial do fungo identificado.

2.4 Atividade antifúngica de fungos contra *Alternaria* sp.

A ação antifúngica dos isolados fúngicos obtidos foi avaliada pelo método de confronto duplo em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA comercial), por conter os

nutrientes necessários ao desenvolvimento de fungos e por promover a esporulação (Devi *et al.*, 2018; Syamsia *et al.*, 2021).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente causalizado no esquema fatorial 4 x 3, correspondente a quatro tratamentos fúngicos (Testemunha do fungo fitopatogênico - ALT23 e três isolados fúngicos: BRF1, HSF1 e IF1) e três períodos de avaliação (1º, 2º e 5º dia), com quatro repetições por tratamento.

Os isolados fúngicos BRF1, HSF1 e IF1 foram obtidos das sementes e/ou das plântulas, conforme descrito no item anterior.

Para avaliar o potencial antagonístico dos isolados fúngicos, um disco micelial de 5 mm de diâmetro do inoculante do isolado fitopatogênico ALT23 e do fungo endofítico com o micélio voltado para o meio de cultura BDA foram transferidos para placas de Petri (8 cm de diâmetro) distantes 2,0 cm da borda. No tratamento testemunha foi inoculado apenas o isolado ALT23. A incubação foi realizada em temperatura ambiente durante cinco dias.

As variáveis analisadas foram: o diâmetro micelial, a velocidade de crescimento, a intensidade de alteração do formato do crescimento micelial, número de esporos e porcentagem (%) de inibição do diâmetro micelial, da velocidade de crescimento e do número de esporos do fungo fitopatogênico.

O diâmetro micelial (DM, cm) foi avaliado com auxílio de uma régua milimetrada e obtido pela média de duas medições cruzadas do crescimento micelial no 1º, 2º e 5º dia após a inoculação.

A velocidade de crescimento micelial (VM; cm.dia⁻¹) foi calculada pela equação: $(DM_f - DM_i)/T$, em que DM_f = diâmetro micelial final, DM_i = diâmetro micelial inicial no 1º, 2º e 5º dia após a inoculação.

A intensidade de alteração do formato do crescimento micelial (IAFCM) do fungo fitopatogênico foi avaliada pelo critério subjetivo de notas, em que 1 = fraca, 2 = moderada e 3 = forte, após cinco dias de cultivo.

O número de esporos foi calculado segundo a metodologia de Carvalho *et al.* (2008) com modificações. Para tanto, um disco micelial de 5 mm do meio de cultura colonizado pelo isolado fúngico, após 14 dias de cultivo, foi transferido para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada autoclavada e submetido à agitação em Vortex por 1 min. Em seguida, foi retirada uma alíquota e transferida para câmara de Neubauer para contagem do número de esporos ao microscópio óptico com aumento de 400x.

A porcentagem de inibição do diâmetro (PIC-DM, %) e da velocidade de crescimento (PIC-VM, %) e do número de esporos (PIC-ESP) foi calculada pela equação: $PIC = (V_{test} - V_{trat})/V_{test} \times 100$, em que V_{test} = valor da variável analisada no tratamento testemunha e V_{trat} = valor da variável analisada no tratamento fúngico.

2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para análise de regressão foram aplicados o teste F e o teste t, respectivamente a 1% e 5% de probabilidade, utilizando o Software SISVAR versão 5.8.

3 Resultados e Discussão

3.1 Isolamento e identificação de fungos filamentosos antagonísticos

A taxa de germinação das sementes das cultivares de alface Brava, Hanson e Itapuã foi de 88%, 78% e 0%, respectivamente, valores estes abaixo da média de 95% mencionados pelo fabricante.

Dentre os fatores que pode ter influenciado este resultado pode-se citar a presença de contaminantes. Neste sentido, a taxa de contaminação das sementes não germinadas foi de 12% na alface cv. Brava pelo fungo *Aspergillus niger* (BRF1) e de 8% na cv. Itapuã pelo fungo *Trichoderma* sp. (IF1). Nas sementes não germinadas da cv. Hanson, 18,2% foram colonizadas por dois fungos não identificados.

Nas plântulas da cv. Brava não foram observados fungos endofíticos, mas na cv. Hanson foi identificado apenas o fungo *Aspergillus* sp. (HSF1).

Em sementes, o fungo filamentoso pertencente ao gênero *Aspergillus* causa podridão e redução da germinação, cuja ação caracteriza um fitopatógeno (Lima *et al.*, 2020; Houbraken; Kocsubé; Visagie, 2020), tal como observado nas sementes da cv. Brava não germinadas e colonizadas pelo BRF1 de *A. niger*. Da mesma forma, as sementes de alface cv. Grande Lagos Americana e cv. Delícia colonizadas pelos fungos *A. niger* não germinaram (Costa *et al.*, 2021).

Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* também podem ser considerados endofíticos, quando colonizam o tecido vegetal sem causar danos, conforme observado nas plântulas sadias de alface da cv. Hanson com o isolado HSF1.

Os micro-organismos endófitos podem estimular o crescimento da planta, induzir a resistência a patógenos e pragas (Azevedo, 1998; Barros *et al.*, 2023; Shankar *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2024), o que pode ser benéfico no cultivo desta cultivar de alface, em condições de campo e adversas, principalmente, com o aumento da temperatura com as mudança climática global.

O fungo filamentoso *Trichoderma* sp. também tem sido relatado como endofítico responsável por estimular o crescimento da planta hospedeira e por ser eficaz no controle biológico devido a síntese de mais de 150 compostos antimicrobianos e/ou promotores de crescimento (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2023). Entretanto, o isolado IF1 de *Trichoderma* foi obtido nas sementes não germinadas de alface cv. Itapuã, o que pode caracterizar uma ação fitopatogênica e/ou endofítico em sementes de baixo vigor, pois 100% das sementes não germinaram e apenas 8% apresentaram o fungo IF1. Neste

resultado, deve-se considerar que a ação fitopatogênica de micro-organismos endofíticos depende da interação com a planta hospedeira e dos fatores ambientais (Yan *et al.*, 2015), o que pode alterar o comportamento fitopatogênico dos isolados BRF1 e IF1 obtidos nas sementes de alface cv. Brava e Itapuã.

3.2 Atividade antifúngica de fungos contra *Alternaria* sp.

No confronto direto, os isolados BRF1 (*Aspergillus niger*), HSF1 (*Aspergillus* sp.) e IF1 (*Trichoderma* sp.) não influenciaram no diâmetro micelial e na porcentagem de inibição do diâmetro (PIC-DM) do fungo ALT23 de *Alternaria* sp., no 1º dia de cultivo (Quadro 1).

Quadro 1 - Diâmetro micelial e porcentagem de inibição do diâmetro micelial (PIC-DM) do isolado ALT23 do fungo *Alternaria* sp. na presença dos isolados fúngicos BRF1, HSF1 e IF1 no 1º, 2º e 5º dia de cultivo

Cultivo (dias)	Diâmetro micelial (cm)			
	Testemunha ¹	BRF1	HSF1	IF1
1º	1,13 ± 0,03 cA ²	1,10 ± 0,03 cA	1,00 ± 0,0 bA	1,05 ± 0,06 bA
2º	1,93 ± 0,06 bA	1,38 ± 0,10 bB	1,76 ± 0,12 aA	1,73 ± 0,12 aA
5º	4,13 ± 0,03 aA	1,86 ± 0,23 aB	1,76 ± 0,53 aA	1,88 ± 0,15 aB
CV	8,3%			
Regressão	Linear	Linear	Quadr.	Quadr.
R ²	1,00***	1,00**	1,00**	1,00**
Cultivo (dias)	PIC-DM (%) ⁴			
	Testemunha	BRF1	HSF1	IF1
1º	0,00 ± 0,00 aA	2,22 ± 2,57 cA ²	11,11 ± 0,00 bA	6,67 ± 5,13 bA
2º	0,00 ± 0,00 aB	28,57 ± 5,41 bA	8,44 ± 6,00 bB	10,39 ± 6,00 bB
5º	0,00 ± 0,00 aC	54,85 ± 5,47 aA	30,00 ± 12,83 aB	54,55 ± 3,70 aA
CV	38,9%			
Regressão	-	Linear	Linear	Linear
R ²	-	0,92***	0,89**	0,97**

¹ Tratamentos: Testemunha: ALT23 - *Alternaria* sp.; BRF1 - *Aspergillus niger*, HSF1 - *Aspergillus* sp. e IF1 - *Trichoderma* sp.; ² Médias seguidas de mesma letra minúscula (na coluna) e maiúscula (na linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ³(*) = significativo a 5%; (**) significativo a 1% e (ns) = não significativo pelo teste t; ⁴ Valores positivos = inibição do crescimento micelial

Fonte: dados da pesquisa.

Segundo Kamei e Singh (2020), a taxa de inibição do crescimento micelial de 29,4% a 45,7% do fungo fitopatogênico *Alternaria alternata* pelos isolados de *Trichoderma* spp. ocorreu no 2º ou no 3º dia de cultivo, a depender da espécie do fungo antagonista. Neste estudo, apenas o isolado BR1 de *Aspergillus niger* reduziu o diâmetro micelial do fungo ALT23 em relação aos demais tratamentos, cuja porcentagem de inibição (PIC-DM) foi de 28,57 ± 5,41%, no 2º dia de cultivo (Quadro 1).

O aumento do período de cultivo de até cinco dias estimulou o crescimento em diâmetro do ALT23 em todos os tratamentos, mas não houve diferença no diâmetro micelial

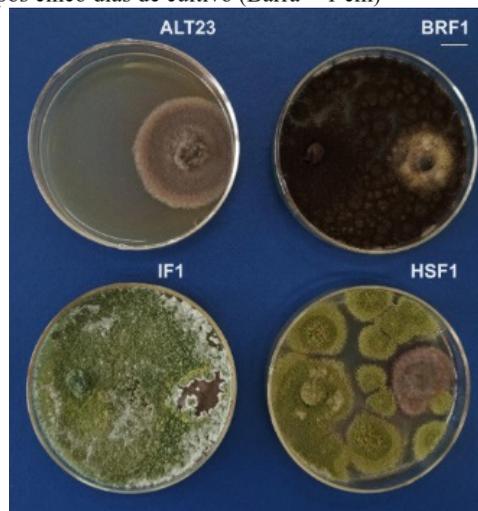
no HSF1 e no IF1 entre o 2º e 5º dia de cultivo. No 5º dia de cultivo, a porcentagem de inibição do diâmetro micelial (PIC-DM) nos tratamentos BRF1, HSF1 e IF1 foi superior aos valores observados no 1º e 2º dia (Tabela 1), tal como relatado por Morales-Sández *et al.* (2021) na ação antagônica do fungo *Aspergillus* sp. SPH2 sobre os fungos fitopatogênicos *A. alternata*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*.

Dentre os tratamentos, o BRF1 e o IF1 resultaram em PIC-DM de 54,85 ± 5,47% e 54,55 ± 3,70%, respectivamente, significativamente superior aos valores obtidos com o HSF1 após cinco dias de cultivo (Quadro 1).

Comparativamente, Salem *et al.* (2019) observaram que o isolado de *A. niger* inibiu 51,48 ± 7,88% do crescimento micelial do fungo *A. alternata*. E o fungicida Hexaconazole na concentração de 125 ppm inibiu em 50,29%, o crescimento micelial do fungo *A. alternata*, após sete dias de cultivo (Koka; Bhat; Wani, 2021), o que demonstra o potencial de biocontrole do fungo *Alternaria* sp. (ALT23) pelos isolados BRF1 (*Aspergillus niger*) e IF1 (*Trichoderma* sp.) *in vitro*.

Segundo Manganiello *et al.* (2024), o micélio dos isolados Ts e T2 de *Trichoderma harzianum* sobrepôs o crescimento do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* após cinco dias de cultivo, tal como observado nos tratamentos BRF1 e IF1 com ALT23 de *Alternaria* sp. (Figura 1).

Figura 1 - Crescimento micelial do isolado ALT23 do fungo fitopatogênico *Alternaria* sp. na presença dos fungos BRF1 (*Aspergillus niger*), HSF1 (*Aspergillus* sp.) e IF1 (*Trichoderma* sp.), após cinco dias de cultivo (Barra = 1 cm)



Fonte: os autores.

Faberi *et al.* (2023) também observaram que o crescimento micelial do inoculante comercial de *T. harzianum* cepa Th2 comercial se desenvolveu próximo do fungo *Alternaria* spp., no 3º dia de cultivo, tal como observado no tratamento HSF1 (*Aspergillus* sp.), mas no 5º dia de cultivo (Figura 1).

A limitação e a sobreposição do crescimento micelial do fitopatógeno podem ser consideradas uma competição por nutrientes e/ou de micoparasitismo (Azevedo *et al.*, 2021; Faberi *et al.*, 2023), cuja ação pode ser classificada como fungicida do fungo antagonístico (Morales-Sández *et al.*, 2021;

Oliveira; Pezzi; Silva, 2023).

Na velocidade de crescimento, o BRF1 foi o único que reduziu significativamente esta variável, a partir do 2º dia de cultivo. Todavia, todos os isolados testados reduziram a velocidade de crescimento do ALT23 em relação à testemunha, após cinco dias de cultivo. Dentre os isolados, o BRF1 e o IF1 promoveram inibição da velocidade de crescimento de 77,84 ± 6,01% e 93,18 ± 4,55%, respectivamente, significativamente maior que o HSF1 (Quadro 2).

Quadro 2 - Velocidade de crescimento e porcentagem de inibição da velocidade de crescimento (PIC-VM) do isolado ALT23 do fungo *Alternaria* sp. na presença dos isolados fúngicos BRF1, HSF1 e IF1, no 1º, 2º e 5º dia de cultivo em comparação ao tratamento testemunha

Cultivo (dias)	Velocidade de crescimento (cm.dia ⁻¹)			
	Testemunha	BRF1 ¹	HSF1	IF1
1º	0,53 ± 0,03 cA	0,50 ± 0,03 aA	0,40 ± 0,06 cA	0,45 ± 0,06 aA
2º	0,80 ± 0,07 bA	0,28 ± 0,12 aB	0,76 ± 0,10 bA	0,68 ± 0,10 aA
5º	2,20 ± 0,11 aA	0,49 ± 0,13 aC	1,13 ± 0,10 aB	0,15 ± 0,10 bD
CV	21,9%			
Regressão	Linear	Linear	Linear	Quadr.
R ²	0,99**	0,57 ns	0,92**	1,00**
Cultivo (dias)	PIC-VM (%) ⁴			
	Testemunha	BRF1	HSF1	IF1
1º	0,00 ± 0,00 aA	4,76 ± 5,50 bA	23,81 ± 0,00 bA	14,29 ± 11,00 bA
2º	0,00 ± 0,00 aB	65,63 ± 14,43 aA	4,69 ± 14,43 bB	15,63 ± 12,50 bB
5º	0,00 ± 0,00 aC	77,84 ± 6,01 aA	48,87 ± 18,92 aB	93,18 ± 4,55 aA
CV	46,3%			
Regressão	-	Quadr.	Quadr.	Quadr.
R ²	-	1,00*	1,00**	1,00*

¹ Tratamentos: Testemunha – ALT23 – *Alternaria* sp.; BRF1 – *Aspergillus niger*, HSF1 – *Aspergillus* sp. e IF1 – *Trichoderma* sp.; ² Médias seguidas de mesma letra minúscula (na coluna) e maiúscula (na linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ³ (*) = significativo a 5%; e (**) significativo a 1% pelo teste t; ⁴ Valores positivos = inibição do crescimento micelial.

Fonte: dados da pesquisa.

O aumento do período de cultivo de até cinco dias também favoreceu o incremento da velocidade de crescimento nos tratamentos testemunha e HSF1, mas reduziu esta variável no IF1. No BRF1, não houve influência do período de cultivo na velocidade de crescimento (Quadro 2).

Segundo Salem *et al.* (2019), os fungos filamentosos *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* demonstraram níveis distintos de inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos testados, a depender da espécie e da origem do fungo antagonista. Neste estudo, o fungo *A. niger* (BRF1) inibiu de 65,63 ± 14,43% a 77,84 ± 6,01% a velocidade de crescimento, no 2º e 5º período de cultivo, respectivamente, valores estes maiores que os observados no 1º dia de cultivo. Enquanto o isolado HSF1 de *Aspergillus* sp. apresentou PIC-VM de 48,87 ± 18,92% no 5º dia de cultivo, valor este

maior que os valores observados no 1º e 2º dia de cultivo e inferior ao obtido com o isolado BRF1 de *Aspergillus niger*. No tratamento IF1, o PIC-VM de 93,2 ± 4,55% no 5º dia de cultivo foi superior ao HSF1, mas sem diferença ao BRF1 (Quadro 2).

Na literatura, não foram encontrados relatos sobre a ação dos fungos antagonistas na velocidade de crescimento. Entretanto, Bhat *et al.* (2023) mencionaram que o isolado de *A. niger* CJ6 produziu no meio de cultivo fenóis, hidrocarbonetos e derivados de ftalatos com ação antimicrobiana. Gill *et al.* (2023) também observaram que o fungo *A. fumigatus* extraído solo liberou compostos fenólicos de ação antifúngica e antibacteriana.

Da mesma forma, Baiyee *et al.* (2019) relataram que o fungo *Trichoderma spirale* T76-1 inibiu o crescimento micelial dos fungos *Corynespora cassicola* e *Curvularia aeria* devido a liberação de compostos voláteis e de enzimas como quitinases e β-1,3-glucanase. E Philip *et al.* (2022) observaram que os compostos voláteis do isolado TR07 de *T. afroharzianum* inibiram o crescimento do fungo *Alternaria alternata* Alt3.

Na ação antagonista, a liberação de compostos voláteis e/ou o micoparasitismo nas hifas e/ou esporos (Kumar *et al.*, 2017; Sridharan *et al.*, 2020; Shankar *et al.*, 2024), pode ter influenciado também no formato do crescimento micelial do fungo ALT23 nos tratamentos BRF1 e IF1 em comparação ao HSF1 e na porcentagem de inibição do número de esporos dos isolados BRF1, HSF1 e IF1 sobre o fungo fitopatogênico ALT23 (Quadro 3).

Quadro 3 - Índice de alteração do formato do crescimento micelial (IAFCM, nota), número de esporos e porcentagem de inibição da esporulação do fungo fitopatogênico ALT23 de *Alternaria* sp. pelos isolados BRF1, HSF1 e IF1, após cinco e 14 dias de cultivo, respectivamente

Tratamentos ¹	IAFCM (notas) ²	PIC-ESP ^{4,5}
Testemunha	-	0,00 ± 0,00 c
BRF1	3,00 ± 0,00 a ³	94,74 ± 6,08 a
HSF1	1,75 ± 0,50 b	100,00 ± 0,00 a
IF1	3,00 ± 0,00 a	87,13 ± 8,65 a
CV	11,2%	7,7%

¹ Tratamentos: Testemunha: ALT23 – *Alternaria* sp.; BRF1 – *Aspergillus niger*, HSF1 – *Aspergillus* sp. e IF1 – *Trichoderma* sp.; ² IAFCM (notas): 1 = alteração fraca, 2 = alteração moderada e 3 = alteração forte do crescimento micelial em relação à testemunha; ³ Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ⁴ dado transformado por ; ⁵ Valores positivos = inibição do crescimento micelial.

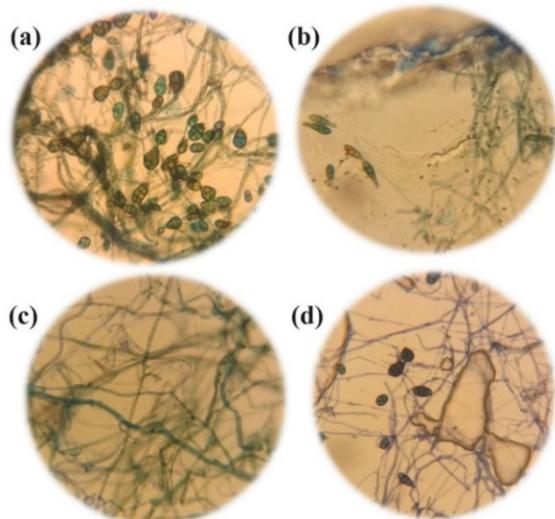
Fonte: dados da pesquisa.

Kaime e Singh (2020) observaram que o fungo *Trichoderma* spp. inibiu a taxa de esporulação do fungo *Alternaria alternata*, mas com valores de 67,25% a 89,6%, a depender da espécie fúngica. Enquanto, os isolados BRF1, HSF1 e IF1 reduziram de 87,13 ± 8,65 a 100,00 ± 0,00% o número de esporos do fungo ALT23, sem diferença entre os tratamentos (Quadro 3).

No BRF1, os conídios do fungo ALT23 apresentaram

morfologia distinta do tratamento testemunha (Figuras 2a e 2b). No HSF1, não houve esporulação do ALT23 (Figura 2c). Não houve alteração morfológica dos conídios do fungo ALT23 no tratamento IF1, em relação à testemunha (Figuras 2a e 2d). Misaghi *et al.* (1978) também observaram a alteração do tamanho e da morfologia dos conídios do fungo *Alternaria alternata*, mas a depender do meio de cultivo e da temperatura, fatores estes que não devem ter influenciado, pois foi utilizado o mesmo meio e mantidos em temperatura ambiente.

Figura 2 - Hifas com conidióforos e conídios do isolado ALT23 de *Alternaria* sp. nos tratamentos*: testemunha (a), BRF1 (b, c), HF (d) e IF1 (e, f) após 14 dias de cultivo (aumento de 400x)



*Tratamentos: Testemunha: ALT23 – *Alternaria* sp.; BRF1 - *Aspergillus niger*, HSF1 - *Aspergillus* sp. e IF1 - *Trichoderma* sp.

Fonte: dados da pesquisa.

Segundo Oliveira, Pezzi e Silva (2023), o emprego de 2,5% do óleo de guacatonga (*Casearia sylvestris*) apresentou ação fungicida por ter inibido o crescimento e a esporulação do fungo *A. alternata*, tal como observado com BRF1 (*Aspergillus niger*), HSF1 (*Aspergillus* sp.) e IF1 (*Trichoderma* sp.), o que demonstra o potencial *in vitro* destes isolados no controle do fungo *Alternaria* sp.

Em condições de campo, o *Trichoderma asperelloides* reduziu a severidade da doença causada pelos fitopatógenos *A. alternata* e *F. oxysporum* em tomateiros (Ramírez-Cariño *et al.*, 2020). Assim como, o isolado de *Aspergillus niger* inibiu em até 71% a ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* no cultivo de berinjela, valor este superior aos 68,08% obtidos com o fungicida Thiram (Patil *et al.*, 2017).

Segundo Stouvenakers, Massart e Jijakli (2023), o isolado G2 de *Aspergillus flavus* induziu a resistência da alface ao fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* no cultivo hidropônico. E o *Trichoderma asperellum* ZBW induziu a resistência de plantas de ervilhas contra o fungo *Globisporangium ultimum* NZW pela liberação de enzimas líticas e metabólitos bioativos, que estimulou a lignificação das paredes celulares das raízes, a síntese de peroxidases e polifenóis (Moussa *et al.*, 2023).

Os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* também podem apresentar ação nematicida, entomopatogênica, parasitária, solubilizadores de fosfato e promotores de crescimento (Azevedo *et al.*, 2021; Alanzi *et al.*, 2023; Bhat *et al.*, 2023; Gill *et al.*, 2023; Guzmán-Guzmán *et al.* 2023; Zhang *et al.*, 2024). Todavia, é importante realizar análises de fitotoxicidade *in vivo*, pois os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* podem causar podridões em diversas culturas de interesse econômico (Patil *et al.*, 2017).

4 Conclusão

Os isolados BRF1 de *Aspergillus niger*, HSF1 de *Aspergillus* sp. e IF1 de *Trichoderma* sp. apresentam potencial antagonístico *in vitro* sobre o fungo ALT23 de *Alternaria* sp.

A avaliação do potencial antifúngica de fungos isolados das sementes de alface deve ser realizada a partir do 2º dia de cultivo, conforme o isolado.

O aumento do cultivo dos isolados BRF1, HSF1 e IF1 favorece a inibição do crescimento do fungo ALT23.

Os isolados fúngicos obtidos das sementes de alface, podem representar uma fonte de micro-organismos com potencial de biocontrole de fitopatógenos e de pragas na própria cultura e de forma ecológica, sem contaminar o ambiente agrícola como os fungicidas químicos.

Referências

- ALANZI, A. *et al.* *Aspergillus* co-cultures: A recent insight into their secondary metabolites and microbial interactions. *Arch Pharm Res.*, v.46, n.4, p.273-298, 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s12272-023-01442-5>
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. *Métodos em fitopatologia*. Viçosa: UFV, 2007.
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J.A.M. *Manual de Fitopatologia*, v.1, Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres, 2018.
- AZEVEDO, J.L. *Microorganismos endofíticos*. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (*ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.
- AZEVEDO, P.F. *et al.* *In vitro* inhibition of *Fusarium solani* by *Trichoderma harzianum* and biofertilizer. *Res. Soc. Dev.*, v.10, n.3, e5210312994, 2021. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.12994>
- BAIYEE, B. *et al.* *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassicola* or *Curvularia aerea*. *Biol. Control*, v.129, p.195-200, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.018>
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1998.
- BARROS, B.N.D. *et al.* Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a espécies vegetais de ocorrência amazônica: uma revisão. *Contribuciones Cienc. Soc.*, v.16, n.1, p.27211-27234, 2023. doi: <https://doi.org/10.55905/revconv.16n.11-147>
- BHAT, M.P. *et al.* *Aspergillus niger* CJ6 extract with antimicrobial potential promotes *in-vitro* cytotoxicity and induced apoptosis

- against MIA PaCa-2 cell line. *Environm. Res.*, v.229, 116008, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116008>
- CARVALHO, J.B. *et al.* Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.10, n.1, p.88-93, 2008.
- CASTRO, T.M. *et al.* Vulnerabilidade do solo em área agrícola à contaminação por agrotóxicos. *FSA*, v.17, n.1, p.217-229, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.12819/2020.17.1.11>
- COSTA, N.J.F. *et al.* Microbiolização de sementes de alface com *Bacillus* spp. para controle de fungos fitopatogênicos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v.18, n.1, p.1-14, 2021.
- DETHOUP, T.; KUMLA, D.; KIJOA, A. Mycotoxic activity of crude extracts of marine-derived beneficial fungi against plant pathogenic fungi. *J. Biopest.*, v.8, n.2, p.107-115, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.57182/jbiopestic.8.2.107-115>
- DEVI, K.S. *et al.* Screening of suitable culture media for growth, cultural and morphological characters of *Pycnidia* forming fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, v.7, n.8, p.4207-4214, 2018. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.708.440>
- DONG, M. *et al.* Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* MS13 1 mutant generated by heavy ion mutagenesis and its efficient saccharification of pretreated sweet sorghum straw. *Process Biochem.*, v.84, p.22-29, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.006>
- DURÉ, L.M.M. *et al.* Seleção e prospecção de rizobactérias para o controle biológico do mofo branco em espécies de *Crotalaria* spp. *Ens. Ciênc.*, v.22, n.2, p.90-96, 2018. doi: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2018v22n2p90-96>
- FABERI, A.J. *et al.* Biocontrol de *Alternaria solani* y *A. alternata* en el cultivo de papa con *Trichoderma harzianum*. *Rev. Latinoam. Papa*, v.26, n.1, p.4-16, 2023. doi: <https://doi.org/10.37066/ralap.v26iN1.438>
- FRANCO, M.F.S. *et al.* Microrganismo endofítico para conservação de produtos hortícolas. *Res. Soc. Dev.*, v.11, n.2, e28111225761, 2022. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25761>
- GILL, H. *et al.* Isolation of bioactive metabolites from soil derived fungus - *Aspergillus fumigatus*. *Microorganisms*, v.11, n.3, p.590, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030590>
- GUZMÁN-GUZMÁN, P. *et al.* *Trichoderma* species: our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases: a review. *Plants*, v.12, n.3, p.432, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/plants12030432>
- HOUBRAKEN, K.; KOCSUBÉ, S.; VISAGIE, C.M. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud. Mycol.*, v.95, n.1, p.5-169, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
- KAMEI, D.; SING, A. *In vitro* studies of different culture media and biocontrol agents on growth and sporulation of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler an incitant of broad bean (*Vicia faba* L.) leaf blight disease. *Int. J. Environm. Agric. Res.*, v.6, n.11, p.29-36, 2020. doi: <https://zenodo.org/doi/10.5281/zenodo.4297878>
- KHAN, I.H.; JAVAID, A. Antagonistic activity of *Aspergillus versicolor* against *Macrophomina phaseolina*. *Braz. J. Microbiol.*, v.53, n.3, p.1613-1621, 2022. doi: <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00782-6>
- KOKA, J.A.; BHAT, M.Y.; WANI, A.H. *In vitro* efficacy of fungicides on mycelial growth and spore germination of *Alternaria alternata* and *Mucor plumbeus*. *J. Drug Del. Ther.*, v.11, n.3, p.17-22, 2021. doi: <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i3.4692>
- KUMAR, G. *et al.* *Trichoderma*: a potential fungal antagonist to control plant diseases. *SATSA Mukhapatra - Annual Technical*, v.21, p.206-218, 2017.
- LIMA, C.R. *et al.* Occurrence of microorganisms and their relationship with physiological quality of lettuce seeds. *Braz. J. Dev.*, v.6, n.11, p.90053-90067, 2020. doi: <http://doi.org/10.34117/bjdv6n11-424>
- MANGANIELLO, G. *et al.* *Trichoderma* biocontrol performances against baby-lettuce *Fusarium* wilt surveyed by hyperspectral imaging-based machine learning and infrared thermography. *Agriculture*, v.14, n.2, p.307, 2024. doi: <https://doi.org/10.3390/agriculture14020307>
- MARTINUZ, A. Interacción entre el hongo endofítico *Fusarium oxysporum* cepa 162 y la bacteria endofítica *Rhizobium etli* cepa G12. *La Calera*, v.20, n.34, p.1-9, 2020. doi: <https://doi.org/10.5377/calera.v20i34.9601>
- MIRANDA-APODACA, J. *et al.* Stress responde to climate change and postharvest handling in two differently pigmented lettuce genotype: impact on *Alternaria alternata* invasion and mycotoxin production. *Plants*, v.12, n.6, 1304, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/plants12061304>
- MISAGHI, I.J. *et al.* Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. *Phytopathol.*, v.68, p.29-34, 1978.
- MORALES-SÁNCHEZ, V. *et al.* Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. SPH2. *J. Fungi*, v.7, n.2, 109, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/jof7020109>
- MOUSSA, Z. *et al.* Domiciliation of *Trichoderma asperellum* suppresses *Globiosporangium ultimum* and promotes pea growth, ultrastructure, and metabolic features. *Microorganisms*, v.11, n.1, 198, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010198>
- OLIVEIRA, A.M.R.; PEZZI, A.; SILVA, M.S. Óleo essencial de guacatonga no controle alternativo de fungos causadores do mofo cinzento e alternarioses. *Pesq. Agrop. Pern.*, v.28, n.1, e218121812023, 2023. doi: <https://doi.org/10.12661/pap.2022.009>
- PATIL, V.M. *et al.* Biological control of brinjal wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* using soluble powder formulation of *Aspergillus niger*. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, v.4, n.11, p.66-71, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.11.009>
- PHILIP, B. *et al.* *Trichoderma afroharzianum* TRI07 metabolites inhibit *Alternaria alternata* growth and induce tomato defense-related enzymes. *Sci. Rep.*, v.14, 1874, 2024. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52301-2>
- RAMÍREZ-CARIÑO, H.F. *et al.* Biocontrol de *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum* por *Trichoderma asperelloides* e *Bacillus paralicheniformis* em tomateiro. *Anton Leeuw.*, v.113, p.1247-1261, 2020. doi: <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01433-2>
- SALEM, I.B. *et al.* Screening and interaction between pathogens and antagonistic seed-borne fungi, associated with some organic spices and vegetable crops in Tunisia. *Novel Res. Microbiol.*, v.3, n.1, p. 232-242, 2019. doi: <https://doi.org/10.21608/nrmj.2019.28109>
- SHANKAR, J. *et al.* Interplay of cytokines and chemokines in Aspergillosis. *J. Fungi*, v.10, n.4, 251, 2024. doi: <https://doi.org/10.3390/jof10040251>

- SHI, M. *et al.* Phytochemicals, nutrition, metabolism, bioavailability, and health benefits in lettuce: A comprehensive review. *Antioxid.*, v.11, n.6, 1158, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox11061158>
- SILVA, A.P.; DOURADO, M.N. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas. *Iniciação Científica Cesumar*, v.24, n.1, p.1-11, 2022. doi: <https://doi.org/10.17765/2176-9192.2022v24n1e10776>
- SRIDHARAN, A. *et al.* Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiol. Res.*, v. 236, p.1–13, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126436>
- STOUVENAKERS, G.; MASSART, S.; JIJAKLI, M.H. Application of aquaponic microorganisms alone or in consortium as original biocontrol method of lettuce root rots in soilless culture. *Acta Hortic.*, v.1378, p.289-294, 2023. doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2023.1378.38>
- SUN, Y. *et al.* New butenolide derivatives from the marine sponge-derived fungus *Aspergillus terreus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.28, n.3, p.315–318, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.12.049>
- SYAMSIA, A. *et al.* Alternative medium for the growth of endophytic fungi. *IOP Conference Series: Earth and Environm. Sci.*, v.886, 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/886/1/012045>
- WU, C.J. *et al.* Terretonin D1, a new meroterpenoid from marine-derived *Aspergillus terreus* ML-44. *Nat. Prod. Res.*, v.33, n.15, p.2262-2265, 2019. doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493583>
- YAN, J.F. *et al.* Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? *Fungal Ecol.*, v.13, n.1, p.53-59, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.07.005>
- ZHANG, Z. *et al.* First record of *Aspergillus nomiae* as a broad-spectrum entomopathogenic fungus that provides resistance against phytopathogens and insect pests by colonization of plants. *Front. Microbiol.*, v.14, 2024. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1284276>
- ZHAO, W.Y. *et al.* Recent studies on terpenoids in *Aspergillus* fungi: Chemical diversity, biosynthesis, and bioactivity. *Phytochem.* v.193, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113011>