

LAÍSY ALBERTI BERTANHA

**BIOPROSPECÇÃO DE *Trichoderma* ANTAGÔNICOS A *Sclerotinia sclerotiorum*
EM ÁREA DE PRODUÇÃO ORGÂNICA**

Botucatu

2024

LAÍSY ALBERTI BERTANHA

**BIOPROSPECÇÃO DE *Trichoderma* ANTAGÔNICOS A *Sclerotinia sclerotiorum*
EM ÁREA DE PRODUÇÃO ORGÂNICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Wagner Bettiol

Co-orientador: Gabriel Moura Mascarin

Botucatu

2024

B536b Bertanha, Laisy Alberti
Bioprospecção de Trichoderma antagônicos a Sclerotinia
sclerotiorum em área de produção orgânica / Laisy Alberti Bertanha. --
Botucatu, 2024
98 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu
Orientador: Wagner Bettiol
Coorientador: Gabriel Moura Mascarin

1. Sclerotinia sclerotiorum. 2. Controle biológico. 3. Isolamento e
seleção de antagonistas. 4. Trichoderma spp.. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

AUTORA: LAISY ALBERTI BERTANHA

ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL

COORDENADOR: GABRIEL MOURA MASCARIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia
(Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER BETTIOL (Participação Presencial)
Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente



Pesquisador Dr. GILENO VIEIRA LACERDA JÚNIOR (Participação Presencial)
Laboratório de Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente



Pesquisadora Dr.^a ZAYAME VEGETTE PINTO (Participação Virtual)
Pesquisa e Desenvolvimento / Ihara Ltda.



Botucatu, 29 de julho de 2024.

*Àos meus amados pais,
Mirles e Antônio Carlos
dedico*

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por mais esta realização e por ter me sustentado até aqui, sem o Seu cuidado nada disso seria possível.

Ao meu marido Rodrigo que me apoiou e incentivou, pelo carinho, paciência e compreensão durante esse período. Te amo.

À minha querida mãe Mirtes que empenhou sua vida e seus esforços para que eu pudesse ter a oportunidade de estudar. Dedico essa conquista a ela.

À minha amável avó Eva, ao meu pai Antônio Carlos, tia Jô, tio Reginaldo e tia Rose que me apoiaram durante esses anos.

À minha irmã Bruna (*in memoriam*), por seu amor incondicional que tanto me incentivou a estudar.

À toda minha família que sempre me incentivou, sendo minha fortaleza e celebrando cada conquista, agradeço a Deus por ter vocês comigo.

Ao meu orientador Dr. Wagner Bettiol, pela confiança no meu trabalho e contribuição na minha formação acadêmica. Me sinto honrada. Muito obrigada.

Ao meu co-orientador Dr. Gabriel Mascarin, pela oportunidade a mim dada, contribuição e pelos direcionamentos oferecidos.

Ao Dr. Fernando Silveira, exímio pesquisador e amigo, pelo grande apoio no desenvolvimento do trabalho. Sempre serei extremamente grata.

À Rizoma Agro e Mantiqueira Agricultura Regenerativa, que permitiram que eu conciliasse o trabalho com o estudo, tornando esta oportunidade exequível.

À Letícia e a todos meus companheiros de empresa, que contribuíram durante este período, e diretamente na pesquisa. Muito obrigada.

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum é um patógeno que exige adequado manejo para minimizar as perdas na produção. O alto custo dos fungicidas químicos e seus efeitos deletérios ao ambiente e ao homem exigem a busca por novas opções de manejo da doença. Uma alternativa é a redução do potencial de inóculo pela ação de antagonistas que parasitam escleródios e apotécios. Na presente pesquisa foi realizado o isolamento e a seleção de *Trichoderma* spp. que ocorrem naturalmente sobre as estruturas de *S. sclerotiorum*, como estratégia para o desenvolvimento de possíveis agentes de biocontrole. Considerando que a supressividade natural é quebrada pelo uso de agrotóxicos, áreas orgânicas, portanto livres destes produtos foram escolhidas, fator importante para a seleção dos antagonistas. Foram coletados mil escleródios de *S. sclerotiorum* no campo de produção de feijão e enterrados em áreas orgânicas de pivô de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), pomar de jabuticaba (*Plinia cauliflora*), mata e bambuzal. Após um mês foram recuperados e plaqueados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Quarenta isolados de *Trichoderma* foram obtidos a partir da colonização desses escleródios, em seguida purificados e preservados. Para quantificar a produção de esporos em meio de cultura, os isolados foram repicados em placa de Petri, e a suspensão obtida da lavagem foi avaliada pela contagem em câmara de Neubauer, o valor mínimo estipulado para a exclusão do isolado foi de 6×10^7 UFC/mL, em placa cheia. Para avaliar o potencial de parasitismo dos isolados, foi realizada a aplicação de uma suspensão de 1×10^7 esporos/mL sobre escleródios em solos contidos em caixa Gerbox, utilizando 36 isolados, previamente selecionados devido à produção de esporos/mL. Os escleródios foram plaqueados em meio seletivo Neon-S, sinalizando a sua viabilidade. Dezoito isolados inibiram em mais de 80% a germinação miceliogênica dos escleródios, sendo que 16 inibiram totalmente. O teste foi repetido com os 18 isolados, sendo selecionados sete que apresentaram controle superior a 80%, sendo os de números: 4, 9, 12, 13, 27, 36 e 44, os cinco primeiros foram obtidos da área de pivô de feijão, o isolado 36 da área de mata e o 44 da área do pomar de jabuticaba. Os isolados 4, 9 e 27 foram identificados como *Trichoderma yunnanense*, isolado 12 como *Trichoderma atrobrunneum*, isolado 13 como *Trichoderma pubescens*, isolado 44 como *Trichoderma hamatum* e o isolado 36 continua em análise. O teste de cultura pareada *in vitro* foi utilizado para a verificação de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum*, a taxa de inibição quantificada pelo software ImageJ e as médias submetidas ao teste de Tukey 5%. Neste teste os seis que inibiram mais de 70% foram: 1, 13, 27, 44, 20 e 7; e com mais de 80% de inibição, os isolados 4 e 46. O teste também foi utilizado para quantificação da formação de escleródios sob exposição dos antagonistas. Os isolados 4 e 13 foram os únicos que impediram a formação de escleródios em placa, já com os isolados 6, 7, 9 e 16 houve a formação de 1,5 escleródio/placa. O isolado 4 se destacou em todos os testes, seguido dos isolados 13, 27 e 44, mostrando potencial de parasitismo dos escleródios, inibição de crescimento do patógeno e formação de escleródios.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*; controle biológico; isolamento e seleção de antagonistas; micoparasitismo; *Trichoderma* spp.

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is a pathogen that requires thorough management to minimize reduction in the production. The high cost of chemical fungicides and their effects on the environment and humans demands investigations for purposing new disease management options. One alternative is the reduction of inoculum potential by the action of antagonists that parasitize sclerotia and apothecia. In this study, *Trichoderma* spp. that occur naturally on the structures of *S. sclerotiorum* were isolated and selected as a strategy for the development of possible biocontrol agents. Considering that natural suppressiveness is broken by the use of chemical pesticides we selected the organic areas, which are free from these products. One thousand sclerotia of *S. sclerotiorum* were collected at the bean crop field and buried in organic bean (*Phaseolus vulgaris*) pivot areas, forest, Brazilian berries (*Plinia cauliflora*) and bamboo groves. After one month, they were recovered and transferred on Potato Dextrose Agar (BDA) medium in the laboratory. Forty *Trichoderma* isolates were obtained from the colonization of these sclerotia, then purified and preserved. To quantify the spore production in culture medium, the isolates were multiplied on Petri dishes, and the suspension obtained from the washing was evaluated by counting in a Neubauer chamber. The minimum value stipulated for the exclusion of the isolate was 6×10^7 CFU/mL, in a full plate. Only 2 isolates had a lower concentration and were discarded from the study. To evaluate the potential of parasitism of the isolates, a suspension of 1×10^7 spores/mL was applied in sclerotia in soil contained in a Gerbox box, using 36 isolates, previously selected due to the production of spores/mL. The sclerotia were plated on Neon-S selective medium, signaling their viability. Eighteen isolates inhibited mycelial germination of sclerotia by more than 80%, and 16 showed complete inhibition. The test was repeated with the 18 isolates, and seven that showed control greater than 80% were selected, namely: 4, 9, 12, 13, 27, 36 and 44. The first five were obtained from the bean pivot area, isolate 36 from the forest area and isolate 44 from the Brazilian berries' orchard area. Isolates 4, 9 and 27 were identified as *Trichoderma yunnanense*, isolate 12 as *Trichoderma atrobrunneum*, isolate 13 as *Trichoderma pubescens*, isolate 44 as *Trichoderma hamatum* and isolate 36 remains under analysis. The in vitro paired culture test was used to evaluate the antagonism of *Trichoderma* spp. against *S. sclerotiorum*, the inhibition rate was quantified by ImageJ software, and the means subjected to the 5% Tukey test. In this test, the six isolates that inhibited more than 70% were: 1, 13, 27, 44, 20 and 7; and with more than 80% inhibition, isolates 4 and 46. The test was also used to quantify the formation of sclerotia under exposure to the antagonists. Isolates 4 and 13 were the only ones that prevented the formation of sclerotia in Petri dishes, while isolates 6, 7, 9 and 16 formed 1.5 sclerotia/dishes. Isolate 4 stood out in all tests, followed by isolates 13, 27 and 44, showing potential for parasitism of sclerotia, inhibition of pathogen growth and formation of sclerotia.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*; biological control; isolation and selection of antagonists; mycoparasitism; *Trichoderma* spp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A. Voiles contendo escleródios. B. Voile colocado no campo antes de ser enterrado.	48
Figura 2 - Escleródios plaqueados em meios Neon-S, após crescimento dos antagonistas.	49
Figura 3 – Crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> em lamínulas no meio BDA, após 24h de incubação.	51
Figura 4 - Lamínulas envoltas pela solução com hifas de <i>S. sclerotiorum</i>	51
Figura 5 – Crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> a 26°C, em meio BDA.	52
Figura 6 - Gerbox com solos colonizados pelos antagonistas após serem adicionadas por 14 dias.	54
Figura 7 - Placas com escleródios no meio Neon-S após serem incubadas por 8 dias.	54
Figura 8 - Placas com isolado de <i>Trichoderma</i> sp. após 7 dias de incubação em meio BDA.	55
Figura 9 - Cálculo da área de inibição do crescimento do fungo no ImageJ	56
Figura 10 - Porcentagem dos diferentes isolados na área de Jabuticaba.	60
Figura 11 - Porcentagem dos diferentes isolados na área da Mata.	61
Figura 12 – Porcentagem dos diferentes isolados na área de Bambuzal.	61
Figura 13 – Porcentagem dos diferentes isolados na área do Pivô de Feijão.	62
Figura 14 - Desenvolvimento dos diferentes isolados do pivô de feijão, após 7 dias de incubação em meio BDA.	65
Figura 15 - Desenvolvimento dos diferentes isolados da mata, após 7 dias de incubação em meio BDA.	66
Figura 16 - Desenvolvimento dos diferentes isolados da área de jabuticaba, após 7 dias de incubação em meio BDA.	67
Figura 17 - Desenvolvimento dos diferentes isolados do bambuzal, após 7 dias de incubação em meio BDA.	67
Figura 18 - Efeito dos diferentes isolados na inibição de germinação de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i>	70
Figura 19 - Efeito dos diferentes isolados na inibição do crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> , em placas de Petri.	71

Figura 20 - Culturas de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. mais agressivos ou eficazes contra <i>S. sclerotiorum</i> , após 7 dias em meio BDA.....	72
Figura 21 - Formação de escleródios após 20 dias de exposição aos antagonistas, em meio BDA.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas geográficas das áreas escolhidas.....	50
Tabela 2 - Análise de solo do pivô de feijão.....	50
Tabela 3 – Número de isolados obtidos em cada área.	60
Tabela 4 - Identificação de isolados fúngicos com base na análise da sequência genética ITS e suas espécies próximas no banco de dados GenBank.....	63
Tabela 5 - Concentração (UFC/mL) dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	69
Tabela 6 - Formação de escleródios em placa na presença dos antagonistas.	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	A cultura do feijão.....	22
2.2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no feijoeiro.....	23
2.2.1	Ciclo de vida.....	26
2.3	Manejo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....	28
2.3.1	Controle cultural	28
2.3.2	Controle genético	30
2.3.3	Controle químico	31
2.3.4	Controle biológico.....	32
2.4	<i>Trichoderma</i> como agente de controle biológico.....	36
2.4.1	Micoparasitismo	38
2.4.2	Antibiose e os metabólitos secundários	40
2.4.3	Competição	41
2.4.4	Interação de <i>Trichoderma</i> com as plantas	42
2.4.5	<i>Trichoderma</i> e a indução de defesas na planta.....	43
2.5	Isolamento e seleção de agentes de biocontrole.....	45
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1	Coleta dos escleródios.....	48
3.2	Caracterização da área de coleta e isolado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>...	49
3.3	Parasitismo de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por esporos de <i>Trichoderma</i> spp.....	53
3.4	Quantificação de esporos dos isolados em meio de cultura.....	55
3.5	Teste de cultura pareada.....	55
3.5.1	Taxa de inibição de <i>S. sclerotiorum</i>	56
3.6	Identificação taxonômica dos fungos antagonistas	57
3.6.1	Extração de DNA.....	57
3.6.2	Amplificação, sequenciamento e montagem do gene ITS (Internal Transcribed Spacer)	57
3.6.3	Anotação taxonômica.....	58
3.7	Análise estatística	58
4	RESULTADOS.....	59
4.1	Obtenção e identificação dos isolados.....	59
4.2	Quantificação de esporos dos isolados em meio de cultura.....	68
4.3	Parasitismo de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por esporos de <i>Trichoderma</i> spp.....	70

4.4	Antagonismo pelo método da cultura pareada.....	71
5	DISCUSSÃO.....	74
6	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), sendo que na safra 20/21 produziu 2893,8 mil toneladas, com produtividade média de 990 kg/ha (Faostat, 2023). Dentre as doenças responsáveis por redução na produtividade, o mofo-branco, causado pelo fungo ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum*, é o mais prejudicial. Em condições climáticas favoráveis ao patógeno, ou seja, alta umidade e temperaturas amenas, as perdas podem chegar a 100% da produção (Barbosa; Gonzaga, 2012).

Sclerotinia sclerotiorum atinge mais de 400 espécies de plantas, situadas em 278 gêneros e 75 famílias, além do feijoeiro também são hospedeiros o algodão, a soja e o girassol (Bolton *et al.*, 2006). Trata-se de uma doença monocíclica, e um patógeno necrotrófico, que degrada o tecido vegetal para se nutrir do mesmo, logo quando os sintomas e sinais surgem, os danos nas plantas já estão ocorrendo (Agrios, 2005). O ciclo se inicia na fase de sobrevivência do inóculo, que garante a viabilidade do agente patogênico diante a situações adversas, como ausência do hospedeiro e/ou condições climáticas desfavoráveis (Amorim, 1995). Os escleródios são as estruturas de resistência que garantem a sobrevivência e longevidade de *S. sclerotiorum*, proporcionando expressivo potencial de inóculo em áreas com a doença (Schwartz; Steadman, 1978).

O mofo-branco é uma doença considerada de difícil controle e quando está presente na área, é consideravelmente impossível erradicá-lo. Para manejá-lo, é necessário conhecimento e estudo de seu ciclo de vida e relações com o ambiente, além da rota metabólica da formação das estruturas de sobrevivência. Os fatores que a classificam como de difícil controle são: ausência de cultivares resistentes, formação de estruturas de resistência, sobrevivência no solo por vários anos, ampla gama de hospedeiros, expressivo número de ascósporos produzidos por apotécio, disseminação longa e rápida, sobrevivência em sementes, e desafio de atingir o local de infecção por meio de controle químico (Leite, 2005).

Com este cenário, o controle mais efetivo da doença baseia-se na adoção de um programa de manejo integrado, que inclui todas as técnicas disponíveis para manter a população do patógeno abaixo do nível de dano econômico, minimizando os efeitos

deletérios ao meio ambiente. Esse manejo engloba medidas culturais, genéticas, biológicas, físicas e químicas (Kreycki; Menten, 2013).

A medida de controle mais utilizada é a aplicação de fungicidas químicos, porém, em condições de alta infestação o controle fica abaixo do satisfatório (Vieira *et al.*, 2001). Ademais, o alto custo desses insumos e seus efeitos deletérios ao ambiente e ao homem exigem a busca por novas opções de manejo da doença (Bettiol *et al.*, 2022). A possibilidade do desenvolvimento de resistência de *S. sclerotiorum* aos fungicidas comumente utilizados, trouxe uma crescente preocupação sobre o tema, expandindo as pesquisas em métodos alternativos de controle, como o biológico (O'sullivan *et al.*, 2021).

Para o manejo da doença uma relevante prática é a redução do potencial de inóculo pela ação de antagonistas que parasitam escleródios e apotécios, estruturas de resistência do fungo que garantem a sua sobrevivência (Partridge *et al.*, 2006). Essa interação é mais evidente em solos supressivos onde um potencial antagônico foi construído na presença da população de patógenos (Bettiol *et al.*, 2022).

O estabelecimento e sucesso do controle biológico estão diretamente relacionados ao equilíbrio biológico do local de atuação. Com isso, o manejo realizado na área deve integrar o controle biológico com outras práticas culturais, que preservem a vida no solo, mantendo microrganismos benéficos e enriquecendo o ambiente com inimigos naturais. Além disso, é fundamental utilizar outras estratégias, como o melhoramento genético das plantas e a rotação de culturas, para criar um sistema agrícola mais resiliente e sustentável (Bettiol, 1991). Os produtos biológicos são capazes de parasitar os escleródios dormentes, comprometendo sua sobrevivência e reduzindo o inóculo inicial do patógeno. Essa ação diminui a severidade da doença e, conseqüentemente, aumenta o rendimento das culturas (De Faria *et al.*, 2022).

O mercado global de biopesticidas está em ascensão, com números crescentes e previsões animadoras indicando uma tendência de maior adoção do controle biológico pelos produtores. Esse crescimento tem atraído grandes indústrias para o setor (Markest&Markets, 2019). O grande crescimento previsto para esse mercado dependerá da disponibilidade de novos produtos bioprotetores. Conseqüentemente, é necessário isolar e selecionar novos microrganismos com potencial para controlar eficientemente doenças, pragas e nematoides de plantas (Köhl *et al.*, 2011).

Os biofungicidas incluem produtos à base de fungos, como o *Trichoderma*, e bactérias, como *Bacillus*. O gênero *Trichoderma* tem sido amplamente estudado por anos. O primeiro produto comercial à base desse fungo foi lançado em 1987, iniciando uma série de outros que viria em sequência, sendo utilizados em diversas culturas, desde grãos, hortaliças, frutas e até flores (Bettiol *et al.*, 2014).

A popularidade do biocontrole tem incentivado agências de pesquisa e desenvolvimento, bem como indústrias, a inovar e atender à crescente demanda dos agricultores por técnicas de produção mais sustentáveis. Para isso, é necessário superar os desafios existentes para a maior adoção da tecnologia. Esses desafios incluem a diversificação dos agentes e alvos biológicos registrados, a pesquisa sobre os bioagentes e os possíveis impactos ambientais, e o aprimoramento do processo produtivo, abrangendo formulações, controle de qualidade e produção em escala. Além disso, é fundamental garantir a compatibilidade dos agentes com produtos químicos, conduzindo a um manejo integrado, e oferecer treinamento técnico adequado aos agricultores (Bettiol *et al.*, 2019).

A diversificação dos agentes e alvos biológicos registrados demanda pesquisa e seleção de novos microrganismos. A fase de isolamento e seleção do antagonista é a base do sucesso de um programa de controle biológico. Para cada patossistema existe um local mais apropriado para isso, com maiores chances de sucesso quando realizada no mesmo local onde será aplicado (Köhl *et al.*, 2011).

O isolamento e a seleção de antagonistas que ocorrem naturalmente sobre as estruturas de fitopatógenos é uma estratégia para o desenvolvimento de agentes de biocontrole. Assim, considerando que a supressividade natural pode ser comprometida pelo uso de agrotóxicos, a escolha de áreas livres destes produtos é importante para a seleção dos antagonistas. Desta forma, a agricultura orgânica, definida como um sistema de manejo sustentável com foco na agrobiodiversidade, sustentabilidade e preservação ambiental, sem uso de fertilizantes de alta solubilidade, agrotóxicos, organismos transgênicos e outros, pode ser uma fonte natural e diversa de antagonistas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do feijão

A cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivada em diversos sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, tanto por pequenos como grandes produtores. O feijão apresentou um grande avanço em produtividade nos últimos 10 anos, resultado de cultivares mais produtivas, novos insumos e avanços no manejo da cultura. Essa intensificação do cultivo, foi acompanhada pelas dificuldades no manejo fitossanitário, já que está sujeito ao ataque de diversos patógenos importantes, com um agravante especial para áreas irrigadas por pivô central (Lobo Júnior *et al.*, 2019).

Segundo Filgueira (2008), as cultivares de feijão podem ser divididas em indeterminadas e determinadas, conforme o hábito de crescimento da planta. As cultivares indeterminadas ou volúveis possuem um meristema apical vegetativo que possibilita crescimento contínuo das plantas (Athánázio, 1993). A formação das inflorescências ocorre nas gemas axilares de folhas e ramos, essas cultivares têm a capacidade de se enrolarem em suportes ou tutores, e atingem mais de 2,0 m de altura. As de crescimento determinado, também chamadas de anãs ou rasteiras, têm seus ápices encerrados por inflorescências, originadas da haste principal e dos ramos laterais. O período de floração é curto, cerca de 14 dias, com ciclo entre 60 e 80 dias de duração e a altura das plantas dessas variedades é de até 60 cm (Athánázio, 1993).

As principais doenças que acometem o feijoeiro são o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), e as doenças radiculares causadas por espécies de *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia solani*, que podem ser manejadas com os agentes de biocontrole (Lobo Júnior *et al.*, 2019).

A emprego do controle químico para mofo-branco normalmente se inicia a partir do estágio de floração, com o objetivo de proteger as primeiras pétalas e penetrar ao máximo na copa da planta, atingindo os potenciais locais de infecção (Paulitz *et al.*, 2015). Já para os produtos biológicos os quais tem como alvo o controle dos escleródios e apotécios, as aplicações ocorrem, portanto, no estágio vegetativo, enquanto há possibilidade de atingirem o solo e na entressafra sob a palhada da cultura anterior (Mazaro *et al.*, 2022; Meyer *et al.*, 2019), além da aplicação no sulco de plantio e no tratamento de sementes.

Já o controle químico normalmente se inicia a partir do estágio de floração, com o objetivo de proteger as primeiras pétalas e penetrar ao máximo na copa da planta, atingindo os potenciais locais de infecção (Paulitz *et al.*, 2015).

2.2 *Sclerotinia sclerotiorum* no feijoeiro

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um fungo fitopatogênico necrotrófico, pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero *Sclerotinia*. É o causador da doença mofo-branco que atinge mais de 400 espécies de plantas, situadas em 278 gêneros e 75 famílias, dentre elas estão: o feijoeiro, a soja, algodão e girassol (Bolton *et al.*, 2006).

No Brasil, a doença teve seu primeiro relato no estado de São Paulo em 1921, em plantas da batata (*Solanum tuberosum* L.), e em 1923, foi diagnosticado *S. sclerotiorum* em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Saccá, 1922). Nas décadas de 1940 e 1950, o fungo havia se espalhado pelo Sul e Sudeste, como patógeno secundário na cultura do feijoeiro. A partir da safra de 1976, a importância da doença começou aumentar, atingindo também plantas de soja. O manejo baseado em monocultura, sucessão com plantas hospedeiras, sementes infectadas e condições ambientais favoráveis contribuiu para que a doença se tornasse um dos principais desafios no Paraná (Menten, 1995).

O filo Ascomycota constitui o maior grupo de fungos, caracterizado principalmente pela formação, após a meiose, de esporos sexuais dentro do asco, uma estrutura com formato de saco (Krugner, 1995). O micélio de *S. sclerotiorum* é septado, hialino, bastante ramificado e forma uma massa cotonosa nos tecidos atacados (Abawi; Grogan, 1979). Inicialmente as hifas vegetativas formam-se afastadas umas das outras, e à medida que os nutrientes disponíveis reduzem, ocorre a atração e fusão de hifas, dando início à formação de escleródios (Le Torneau, 1979). Esta formação pode se dar no interior dos tecidos afetados, ou no exterior, quando há alta umidade, podendo também se formar dentro ou sobre as flores e sementes (Bolton *et al.*, 2006).

Os escleródios são estruturas de formato irregular, coloração preta e textura dura, com tamanhos variando de 2 a 20mm de comprimento e de 2 a 10 mm de diâmetro. Suas formas e dimensões se diferenciam conforme o hospedeiro no qual são formados. Na cultura do feijão, os escleródios costumam ser globosos, variando

de 2 a 10mm de diâmetro (Bolton *et al.*, 2006). Essa estrutura é responsável pela sobrevivência a longo prazo do fungo, e é composta por três camadas distintas: uma parede grossa e rica em melanina, uma parede fina (córtex) e a medula branca (micélio dormente do fungo) (Le Torneau, 1979). Lehner *et al.* (2016) concluíram que cada aumento de 10% na incidência do fungo resulta na perda de 172kg por hectare na produção de soja, no aumento de um quilograma de escleródios por hectare.

Em condição de campo, os escleródios podem permanecer viáveis por até oito anos em clima temperado, e por cerca de um ano em condições tropicais e subtropicais (Adamns, 1979; Brustolin *et al.*, 2016). Alguns fatores afetam sua sobrevivência, como a profundidade que estão enterrados. Escleródios mais próximo à superfície estão mais sujeitos a intempéries, e altas temperaturas do solo e alta umidade reduzem significativamente esse período de sobrevivência. (Smolinska; Kowalska, 2018).

Os escleródios podem germinar de duas formas, tanto miceliogênica, ou seja, quando há a produção de micélio a partir do escleródio, ou ainda carpogênica, pela produção do apotécio, sendo que a germinação é um fator determinante para o sucesso da infecção inicial do fungo (Lobo Junior, 1999). O tipo de germinação é influenciado pelas condições ambientais e as concentrações de nutrientes disponíveis no escleródio. Segundo Venette (1998), restrições nutricionais podem desencadear a germinação carpogênica, e com nutrição adequada, a germinação miceliogênica. Para Abawai e Grogan (1979), os fatores que são mais relevantes para a germinação carpogênica são: a temperatura, a luz e o teor de água no solo. De forma geral, os escleródios demandam de um período de dormência no solo para germinar carpogenicamente, porém alguns isolados oriundos dos trópicos não requerem tal período.

Quando ocorre a germinação miceliogênica, as hifas infecciosas podem colonizar os tecidos tenros das culturas, e demandam de matéria orgânica como fonte de nutrição do fungo até efetivar a infecção. Não é a forma mais frequente de infecção primária (Bolton *et al.*, 2006). A germinação carpogênica inicia com a formação de ramificações em forma de tubo, chamadas de estipes, estrutura delicada com comprimento que varia de 4 a 8mm, sob boa iluminação, e até 20mm, em pouca luminosidade. A presença de luz, gera a expansão da ponta do estipe formando o apotécio, estrutura de coloração bege ou branca, com formato de taça. As extremidades do apotécio são chamadas de himênios, e é onde são formados os

esporos sexuais, os ascósporos, que são ejetados no ar e dispersados pela área produtiva (Bolton *et al.*, 2006).

Cada apotécio produz centenas de ascos em forma cilíndrica, onde ocorre a recombinação sexual, e cada asco produz oito ou múltiplos de oito, ascósporos alinhados. O apotécio pode produzir cerca de dois milhões de ascósporos, e quando as condições ambientais são favoráveis, são liberados cerca de 1.600 ascósporos por hora, sendo que o período de liberação pode variar entre 38 e 168 horas, declinando quando a umidade relativa do ar reduz para 65%. Para este tipo de germinação há a necessidade de água disponível no solo superior a 50% e temperaturas amenas de 15°C a 18°C, em um período de 10 a 14 dias (Steadman, 1983; Peltier *et al.*, 2012).

A maior parte dos ascósporos são depositados no solo, e os que atingem a parte aérea das plantas, podem infectar um raio de 50 a 100 metros de sua origem (Abawi; Grogan, 1979). Os ascósporos são envoltos por uma substância mucilagínosa, que agrega os esporos e auxilia na adesão dos tecidos do hospedeiro (Clarkson *et al.*, 2003). Segundo as condições ambientais, podem sobreviver de 12 a 14 dias na superfície das folhas (Venette, 1998), e retomam o desenvolvimento quando as condições ideais para germinação se estabelecerem: temperatura ambiente de 15°C a 25°C e período de molhamento foliar de duas a quatro horas. Neste momento é quando formam o micélio e penetram na cutícula, causando as lesões nas hastes e pecíolos da planta (Willbur *et al.*, 2019). Para infectarem as plantas, os ascósporos necessitam de uma fonte de nutriente exógena e um filme de água, apesar de germinarem em tecidos saudáveis, colonizam preferencialmente as flores senescentes (Saito, 1977).

Essa característica do patógeno traduz o momento mais vulnerável do feijoeiro ao patógeno: as fases de florescimento e formação das vagens, pois é quando os ascósporos dispõem de uma fonte exógena de energia para germinarem (Vieira, 1994). Nesse estágio o microclima é mais favorável, devido ao fechamento da cultura, o que também contribui para plantas doentes terem contato com plantas saudáveis, aumentando os índices da doença (Garcia, 2008).

2.2.1 Ciclo de vida

Para o manejo desse patógeno é crucial levar em consideração o ciclo na doença na cultura e as características biológicas do patógeno. Trata-se de uma doença monocíclica, e um patógeno necrotrófico, que degrada o tecido vegetal para se nutrir do mesmo, logo quando os sintomas e sinais surgem, os danos nas plantas já estão ocorrendo (Agrios, 2005). Uma série de eventos sucessivos e ordenados são responsáveis pelo desenvolvimento de doenças infecciosas, são eles: sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno (Amorim, 1995).

O ciclo se inicia na fase de sobrevivência do inóculo, que garante a viabilidade do agente patogênico diante a situações adversas, como ausência do hospedeiro e/ou condições climáticas desfavoráveis (Amorim, 1995). Os escleródios são as estruturas de resistência que caucionam a sobrevivência e longevidade de *S. sclerotiorum*, proporcionando expressivo potencial de inóculo em áreas com a doença (Schwartz; Steadman, 1978).

Um importante veículo de disseminação são as sementes contaminadas, pois podem carregar o patógeno em sua superfície ou interior, ou mesmo possuírem escleródios associados a elas. O fungo pode colonizar o tegumento e o cotilédone da semente, destruindo a maioria delas; contudo, algumas menos atingidas, permanecem com o embrião viável e passando pela classificação, são comercializadas (Boland; Hall, 1988). Os escleródios também podem ser disseminados pela água da irrigação e das chuvas, por meio de implementos ou máquinas agrícolas, e até por fezes de animais que ingeriram alimento contaminado com o escleródio, já que ele não é inativado pelo sistema digestivo (Kora *et al.*, 2003).

A infecção ocorre principalmente pelas pétalas que senescem presas à planta, comumente sobre axilas. No início do processo de infecção da planta, o primeiro desafio do patógeno é ultrapassar a barreira criada pela parede celular vegetal. E dois fatores são fundamentais para o sucesso da infecção, a secreção de ácido oxálico (AO) e enzimas hidrolíticas, que elicitam a morte celular programada da planta durante a infecção. A degradação da parede celular é favorecida pelo AO que é capaz de acidificar o pH apoplástico propiciando a ação das enzimas hidrolíticas, como celulasas, hemicelulasas, pectinases e proteases, que degradam a parede celular, e facilitam a penetração e colonização do patógeno (Bolton *et al.*, 2006).

O AO interfere na função das células-guarda, resultando numa abertura estomática anormal e inibindo o fechamento dos estômatos durante a infecção (Guimarães; Stotz, 2004); é capaz de suprimir a “explosão” oxidativa das plantas, que é uma das primeiras respostas de defesa da planta contra microrganismos invasores; também pode causar obstrução vascular graças aos seus cristais (Cessna *et al.*, 2000). A capacidade do AO em alterar a integridade da parede celular da planta por quelar íons de Ca^{2+} , permite que enzimas hidrolisem componentes da parede celular (Bateman; Beer, 1965). A importância do AO no sucesso patogênico é sublinhada pelo fato de que cepas de *S. sclerotiorum* mutantes deficientes na produção de AO não são patogênicos, mesmo o fungo possuindo seu arsenal de enzimas hidrolíticas (Godoy *et al.*, 1990).

Ao atuar como ativador na morte celular programada da planta, o AO beneficia o desenvolvimento do patógeno. Apesar de ser um dos aparatos mais importantes na proteção das plantas em impedir o desenvolvimento dos patógenos, a resposta hipersensitiva é eficaz contra os patógenos biotróficos, mas não protege a planta dos necrotróficos, já que estes se alimentam de células mortas. Neste caso, a morte celular beneficia a colonização e desenvolvimento do fungo no tecido vegetal hospedeiro (Van Kan, 2006). Após a parede celular da planta ser degradada, torna-se enfraquecida, e facilita a penetração e colonização do fungo. Este é um dos fatores que torna o patógeno pouco seletivo à diferentes hospedeiros (Almeida; Seixas, 2010).

Após a infecção, o fungo pode atingir diferentes partes da planta: pecíolos, folhas e internódios, além de infectar as plantas que tiverem contato com a planta doente. Os sintomas da doença se assemelham nas diferentes culturas e iniciam, normalmente, na inserção do pecíolo na haste da planta a 15 cm do solo (Tu, 1989).

Nas folhas, as primeiras lesões surgem com aspecto encharcado, e podem tomar todo o órgão, deixando-o progressivamente amarelado, marrom e finalmente, seco e quebradiço. Sob condições favoráveis, os sintomas nas vagens e haste principal, iniciam com manchas avermelhadas, e consistência mole, rapidamente progridem e são recobertos por uma massa de micélio com aspecto cotonoso, que em poucos dias, formam o escleródio, com coloração escura (Almeida *et al.*, 2005). Os frutos, tubérculos e raízes também podem ser atacados, apodrecendo e formando

micélios e escleródios. As plantas atacadas senescem, com aspecto de estarem se liquefazendo e transmitem a doença, para as plantas vizinhas (Bolton *et al.*, 2006).

As epidemias do mofo branco, geralmente são desencadeadas graças a condições meteorológicas favoráveis e pelo microclima condicionado ao dossel da planta, que torna o ambiente mais fresco e úmido (Harikrihsnan; Del Rio, 2006).

2.3 Manejo de *Sclerotinia sclerotiorum*

2.3.1 Controle cultural

O controle cultural atua principalmente na fase de sobrevivência do patógeno, abrangendo práticas que diminuam o potencial de inóculo e/ou a taxa de avanço da doença (Reis; Forcelini, 1995). Quando o patógeno ainda não está presente na área, deve-se adotar estratégias de exclusão, como: escolha rigorosa da qualidade sanitária da semente, controle e sanitização de máquinas e implementos agrícolas provenientes de outras áreas, controle de movimentação de pessoas, e inspeção na cultura (Menten, 1995).

O beneficiamento de sementes é muito importante, para evitar que se transporte para a área de plantio semente com escleródios ou contaminadas com o fungo. Como se trata se de uma doença monocíclica, onde o inóculo inicial é responsável pela quantidade de doença, é crucial o monitoramento das sementes para não contribuir com a instalação ou adição do patógeno na área. Somado ao comportamento atípico do patógeno, por também disseminar a doença a partir do contato planta a planta, o beneficiamento torna-se ainda mais relevante, podendo ser protagonista na redução do inóculo inicial (Napoleão, 2001).

No controle cultural, a rotação de culturas é um dos métodos mais empregados para manejo de várias doenças. Não devem ser realizados plantio sucessivos de soja e feijão, já que ambas as culturas são susceptíveis a *S. sclerotiorum*. É recomendado se fazer rotação com gramíneas, uma vez que não são hospedeiras do fungo. Para o mofo branco, devido a sua versatilidade ecológica e sobrevivência no solo por vários anos, a rotação de culturas envolve outros fatores para ser eficiente, como a ação no incremento tanto qualitativo como quantitativo na microflora do solo, favorecendo os microrganismos antagônicos ao patógeno (Costa; Rava, 2003).

Estudos revelam que as plantas recrutam os microrganismos do solo para sua proteção após o ataque de patógenos e exsudam compostos para alimentar essa comunidade na rizosfera. A supressividade de um solo pode ser favorecida, contribuindo assim para o controle de doenças (Mendes *et al.*, 2011). Solos supressivos são capazes de impedir o desenvolvimento de patógenos, ao contrário dos solos conducentes, que favorecem a propagação dos patógenos (Raaijmakers; Mazzola, 2016).

As práticas agrícolas precisam sustentar e incrementar a diversidade no solo, promovendo o crescimento e multiplicação de microrganismos antagonistas. As propriedades físicas e químicas do solo podem interferir na supressividade, seja prejudicando diretamente o patógeno ou favorecendo a atividade microbiana endógena. Algumas das atividades podem ser implantadas para a indução da supressividade no solo, incluindo: rotação de culturas, incorporação de matéria orgânica, adoção de métodos de cultivo que melhorem a estrutura do solo, correção do pH do solo para um nível que estimule os antagonistas e desfavoreça os patógenos e o plantio das culturas nas épocas adequadas para favorecer tanto os antagonistas quanto o hospedeiro. É importante associar essas práticas ao uso racional dos produtos químicos, pois os fungicidas podem causar diversas alterações na comunidade de organismos do solo (Bettiol *et al.*, 2009).

A matéria orgânica do solo também é muito importante por suportar maior atividade microbiana, melhorar sua estrutura, propiciar maior aeração e retenção de umidade, além de ser fonte de micronutrientes e hormônios para as plantas. A alta diversidade biológica no solo aumenta a capacidade de suprimir os patógenos, com diversos organismos envolvidos na supressividade, como os fungos, micorrizas, bactérias, collembolas e minhocas. A relevância está no complexo formado por eles, e não na ocorrência isolada, pois dessa forma, vários mecanismos de ação funcionam concomitantemente (Bettiol; Ghini, 2005).

Duas escolhas relevantes para o manejo da doença são: o hábito de crescimento das plantas e o espaçamento entre as fileiras de plantio. A arquitetura de plantas com crescimento determinado e dossel mais arejado desfavorece a produção de apotécios quando comparado às plantas de hábito indeterminado, que são mais enfolhadas e prostadas (Steadman, 1979). Sendo assim, as cultivares mais indicadas

são aquelas com porte ereto, feijão tipo I e tipo II, com hábito de crescimento determinado, por permitem maior entrada de luz e circulação de ar.

O espaçamento entre plantas também é crucial; maior abertura no dossel cria melhor circulação de ar e penetração da luz, que reduz os períodos de orvalhos, e, assim, as chances de infecção (Park, 1993). É importante seguir a recomendação ideal de população de plantas, para também evitar a criação de um microclima favorável ao patógeno.

Outro aspecto importante do manejo é a época de plantio. Nos estádios mais críticos da cultura e favoráveis a doença, com florescimento e formação de vagens, deve-se evitar períodos chuvosos. Outra opção é programar o plantio para que o florescimento ocorra em um período de temperaturas crescentes. Em áreas irrigadas, o manejo deve ser assertivo, evitando excessos que favoreçam o patógeno (Esker *et al.*, 2011).

A palhada formada no plantio direto impede o contato da planta com o solo contaminado, e se torna um obstáculo para que a estipe alcance a superfície e forme os apotécios. Também é responsável pelo maior acúmulo de matéria orgânica, que propicia o desenvolvimento da vida no solo e, conseqüentemente, de potenciais antagonistas ao patógeno. Com isso, a intensidade da doença em áreas com plantio direto é menor do que em áreas com solo descoberto (Paula Júnior *et al.*, 2010).

2.3.2 Controle genético

A utilização de plantas geneticamente resistentes é o método de controle de doenças mais desejável, pois não aumenta o custo de produção e reduz os efeitos deletérios ao meio ambiente, pauta cada vez mais relevante para os consumidores. A seleção de variedades de feijão comum resistentes ao mofo branco tem sido amplamente estudada, por ser considerada a medida de controle mais efetiva (Silva, 2021).

Os dois mecanismos envolvidos na resistência do mofo branco são: a resistência fisiológica e os mecanismos de “escape” da planta. Na literatura, são mencionadas cultivares comerciais com resistência fisiológica, que se trata da capacidade de inibir a infecção e colonização do patógeno na planta hospedeira, graças a resistência genética (Soule *et al.*, 2011; Vasconcellos *et al.*, 2017). Por outro

lado, a resistência por “escape” refere-se a características morfológicas da planta, como a estrutura ereta, dossel aberto e maturidade precoce (Schwartz *et al.*, 1987).

Um dos grandes desafios para o melhoramento genético no controle deste patógeno é que a característica que condiciona a resistência é poligênica, ou seja, são diversos genes de pequeno efeito que interagem entre si, com o genoma e com o ambiente, para impedir o desenvolvimento da doença (Lima, 2014; Vasconsellos *et al.*, 2017).

Outras dificuldades estão atreladas aos métodos de avaliações utilizados, interação ambiental, diferença de agressividade dos isolados de *S. sclerotiorum*, necessidade de irrigação e inoculação artificial para a avaliação e identificação de genótipos a campo, parte da planta inoculada, idade da planta durante a avaliação, tipo de inóculo e tempo entre a inoculação e a avaliação. Esses fatores geram controvérsias sobre o nível de resistência de algumas linhagens (Gonçalves; Santos, 2010).

É de suma importância a caracterização dos isolados de *S. sclerotiorum* no melhoramento genético do feijão comum para investigar a interação entre os genótipos de feijão e o patógeno, bem como a necessidade de considerar a influência de fatores ambientais e metodológicos na expressão de resistência das plantas. As cultivares devem ser produtivas, resistente a doenças e apresentar grãos de alta qualidade, além de se adaptar a diferentes condições ambientais (Zocal *et al.*, 2023). Zocal *et al.* (2023) estudaram 109 genótipos de feijão comum coletados em diferentes regiões do Brasil, e 3 deles se destacaram por possuírem resistência fisiológica ao fungo *S. sclerotiorum*, sendo indicados para programas de melhoramento genético como fontes de resistência ao mofo branco.

2.3.3 Controle químico

Uma das medidas mais utilizadas para o manejo de *S. sclerotiorum* é o controle químico. Quando empregado no momento e na maneira correta, e associado a outras técnicas como a rotação de culturas não suscetíveis à doença, pode trazer resultados positivos, prevenindo que a doença se instale e cause grandes perdas na produção (O’sulluvan *et al.*, 2021).

O momento da aplicação é crucial para um bom resultado no controle de *S. sclerotiorum*. A decisão deve ser tomada precocemente, pois, após os sintomas se tornarem visíveis, a eficácia dos fungicidas diminuem. Eles devem ser utilizados de maneira preventiva e não como curativos, principalmente em regiões com histórico da doença (Peltier *et al.*, 2012).

Apesar de ser o método mais eficaz, os fungicidas não protegem completamente as plantas de feijão contra o mofo-branco, além de apresentarem outras problemáticas relacionadas ao seu uso constante. O principal entrave é a chance do desenvolvimento de resistência do patógeno e de organismos não-alvos aos fungicidas utilizados, considerando que a maioria deles dependem de um único modo de ação. Além disso, existe riscos de contaminação ambiental e à saúde humana (Derbyshire; Denton-giles, 2016). Algumas das estratégias para prevenir a resistência são: utilizar a dose recomendada pelo fabricante, rotacionar produtos com diferentes mecanismos de ação, evitar o uso contínuo do mesmo fungicida e limitar o número de aplicações (Kreyci; Menten, 2013).

Além da aplicação foliar, também é recomendado o tratamento de sementes com fungicidas. Trata-se de uma tecnologia de baixo investimento e fácil execução, com efeitos notáveis na proteção contra doenças nas fases pré e pró-emergência. Este método possibilita economia no estabelecimento da lavoura e apresenta baixo risco ambiental (Carvalho *et al.*, 2011).

2.3.4 Controle biológico

Os conceitos de controle biológico de doenças de plantas possuem diferentes abordagens, algumas complementares, e outras mais específicas. Cook e Baker (1983) definem o controle biológico como a ação de um ou mais organismos, exceto o homem, que naturalmente ou através da manipulação do ambiente, reduz o potencial de inóculo do patógeno ou suas atividades, sejam elas crescimento, infecção ou reprodução no ambiente ou no hospedeiro.

O estabelecimento e sucesso do controle biológico estão diretamente relacionados ao equilíbrio biológico do local de atuação. Com isso, o manejo realizado na área deve associar o controle biológico com outras práticas culturais que contribuam para o equilíbrio e manutenção da vida no solo, mantendo os

microrganismos benéficos e enriquecendo o ambiente com inimigos naturais. Além disso, ferramentas como o melhoramento genético das plantas e a rotação de culturas são fundamentais. Criar um ambiente favorável ao desenvolvimento e permanência dos microrganismos antagonista aos patógenos garante às plantas maiores chances de sucesso no seu desenvolvimento (Bettiol, 1991).

Os agentes de controle biológico também são conhecidos pela capacidade de potencializar o desenvolvimento e a produtividade das plantas hospedeiras, graças a síntese de fito-hormônios e melhoria na absorção de nutrientes, atuando, por exemplo, na solubilização do fosfato e na fixação o nitrogênio (Souza *et al.*, 2015).

O micoparasitismo é amplamente explorado por reduzir a viabilidade das estruturas dos patógenos, como os escleródios de *S. sclerotiorum*. Fungos micoparasitas como *Trichoderma* spp. e *Coniothyrium minitans* são frequentemente estudados para o controle de *S. sclerotiorum* (Smolinska; Kowalska, 2018; Tsapikounis *et al.*, 2019). McQuilken e Chalton (2009) demonstraram que *C. minitans*, aplicados no campo, solo e folhas, diminuiu a sobrevivência e a germinação carpogênica dos escleródios em canola. Jones *et al.* (2014) observaram efeito similar com aplicação no solo. A mesma ação é observada para os isolados de *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride* e *T. virens* (Geraldine *et al.*, 2013). Tsapikounis *et al.* (2019) observaram alterações morfológicas em escleródios parasitados por *C. minitans*, *Trichoderma* sp., e *Gliocladium* sp., que apresentaram textura mole e deteriorados, além de conterem estruturas dos agentes de controle, como picnídios e clamidósporos.

A produção de metabólitos secundários antifúngicos constitui outro importante modo de ação de fungos e bactérias, podendo ser difusíveis e/ou voláteis. Embora os agentes bacterianos não sejam parasitas como os fungos, atingem *S. sclerotiorum* por meio dos metabólitos (Savchuk; Fernando, 2004). Algumas das espécies bacterianas mais estudadas pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*. Espécies de *Bacillus* podem produzir compostos difusíveis como fenóis, lipopeptídeos e ácidos graxos, além de compostos orgânicos voláteis, capazes de inibir o crescimento fúngico e a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* (Alvarez *et al.*, 2012).

Streptomyces spp. também impedem o crescimento de *S. sclerotiorum*, bem como sua produção de escleródios, graças à secreção de diversos compostos antifúngicos difusíveis, enzimas hidrolíticas e compostos orgânicos voláteis (Liu *et al.*,

2019; Gebily *et al.*, 2021). Outras bactérias, como *Pseudomonas brassicacearum* e *Pseudomonas putida*, também são relatadas liberando compostos antifúngicos que reduzem o crescimento micelial, formação de escleródios e germinação de ascósporos de *S. sclerotiorum* (Giorgio *et al.*, 2015).

Os fungos também produzem metabólitos secundários. Estudos mostraram que o fungo *C. minitans* libera um composto antifúngico difusível, a macroesfélide A, que inibe o crescimento de *S. sclerotiorum* (Mcquilken *et al.*, 2003). Giczey *et al.* (2001) mostraram que *C. minitans* produziu enzimas hidrolíticas que degradaram a parede celular do patógeno, inibindo seu crescimento micelial. Outros fungos estudados incluem *Clonostachys rósea*, que produz um metabólito peptabiótico antifúngico, e *Fusarium oxysporum* (cepas não patogênicas), que secretam ciclosporina A e compostos orgânicos voláteis que inibem o crescimento micelial e a formação de escleródios (Rodriguez *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2006).

Sun *et al.* (2017) verificaram que *C. rosea* também produz endoquitinases com ação de biocontrole de *S. sclerotiorum*. Da Silva *et al.* (2022) mostraram que *Trichoderma azevedoi* produziu compostos orgânicos voláteis que inibiram a germinação carpogênica e miceliogênica de *S. sclerotiorum*.

Os agentes de controle biológico, além de inibirem o crescimento micelial, germinação e formação de escleródios, apresentam outro importante mecanismo: desarmar a rota virulenta e a síntese de ácido oxálico, importante fator de virulência de *S. sclerotiorum*. A estratégia de intervir degradando o ácido oxálico ou evitando sua formação foi estudada em alguns microrganismos, como o *C. minitans*, que degrada o ácido oxálico (Zhang *et al.*, 2014). Além disso, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *T. harzianum*, de forma isolada ou combinada, impedem a formação do composto, reduzindo a virulência do patógeno e a severidade da doença nas plantas (JAIN *et al.*, 2014).

Além da ação direta sobre os patógenos, os agentes de controle biológico podem também induzir resistência nas plantas, permitindo que estas combatam de forma mais eficiente o ataque de patógenos. O tipo de mecanismo de defesa desencadeado depende do microrganismo e da espécie vegetal. Yang *et al.* (2023) sugeriram que o metabólito secundário wuyiencina, produzido por *Streptomyces albulus*, induziu a resistência de plantas de soja ao ataque de *S. sclerotiorum*, diminuindo em 60% as lesões nas plantas tratadas. Alkooranee *et al.* (2017) e Zhang *et al.* (2016) mostraram que *T. harzianum* induziu a resistência sistêmica em plantas

de canola e soja, por meio de vias de sinalização dependente de ácido salicílico e jasmonato/etileno, respectivamente, reduzindo as lesões causadas por *S. sclerotiorum*.

A colonização do tecido vegetal tem um papel fundamental no desempenho dos agentes de controle biológico, pois estabelece relações de longo prazo, prolongando a proteção das plantas contra o ataque de patógenos. Para o sucesso dessa associação é necessário que o agente de biocontrole seja capaz de competir com a microbiota natural residente na rizosfera e suprimir os patogênicos já estabelecidos (Chen *et al.*, 2016). Para alcançar esse objetivo, algumas cepas bacterianas podem secretar metabólitos secundários que as ajudam a competir por espaço e nutrientes. A competição por carbono e micronutrientes, especialmente ferro, são importantes modos de ação de fungos e bactérias, interferindo no desenvolvimento dos patógenos (Raaijmakers *et al.*, 2009).

Sabaté *et al.* (2018) relataram que a mobilização e eliminação de ferro no solo foi realizada por cepas de *Bacillus* que produzem sideróforos. Desta forma, tornaram o nutriente disponível para si e para as plantas, possivelmente indisponibilizando-o para os patógenos. Essas cepas foram capazes de prevenir a infecção por *S. sclerotiorum* em feijoeiro e aumentar o crescimento das plantas.

Conhecer esses modos de ação permite agir sobre eles e potencializá-los, seja suprimindo nutrientes ou adequando as condições ambientais. Estudos mostram a importância da quantidade e qualidade dos nutrientes disponíveis no filopiano para o desenvolvimento da microbiota foliar, e como o enriquecimento pode influenciar positivamente os antagonistas em detrimento dos patógenos. Isso não só fornece uma fonte de alimento, mas também atrai os antagonistas pelas substâncias produzidas. Além disso, o efeito benéfico no próprio hospedeiro pode, em conjunto, resultar em uma redução na ocorrência de doenças (Bettiol, 1991).

Faria *et al.* (2022) realizaram uma meta-análise estatística combinando resultados de vários estudos independentes realizados ao longo de sete safras de soja (2012 a 2020), como parte de uma rede de ensaios para controle biológico de mofo-branco. Dos 74 ensaios de campo selecionados, 59 atendiam aos requisitos e seguiram na pesquisa, estando distribuídos em sete estados brasileiros. Para a avaliação de controle de *S. sclerotiorum*, foram testados produtos comerciais à base de *Trichoderma*, *Bacillus* e um misto de ambos, aplicados duas vezes no campo, nos

estágios fenológicos V2 e V4. Em cada tratamento havia 4 envelopes de náilon telado com escleródios distribuídos no campo e cobertos com restos culturais. Após as aplicações, foi quantificado o número de escleródios germinados e colonizados pelos agentes de biocontrole.

Faria *et al.* (2022) concluíram que a germinação carpogênica foi significativamente menor nos escleródios tratados com os agentes de biocontrole comparado aos não tratados, sendo que 70% dos produtos testados apresentaram essa redução na viabilidade do inóculo. Também concluíram que alguns resultados foram afetados pelas altas temperaturas (acima de 27°C) e alta precipitação (250 mm), podendo ter lavado os bioprodutos antes de se estabelecerem.

A eficácia dos agentes de biocontrole em suprimir *S. sclerotiorum* em ambiente controlado muitas vezes não é atingida, quando aplicados em campo. O fato pode ocorrer pela incapacidade de o microrganismo ser mantido com alta concentração e atividade biológica no campo (Jones *et al.*, 2014). Um dos fatores mais importantes que afeta diretamente a atividade dos agentes de controle biológico é a diversidade da comunidade microbiana. O microbioma que melhor contribui para a eficácia dos agentes de biocontrole é encontrado em solos supressivos.

2.4 *Trichoderma* como agente de controle biológico

Os bioprodutos à base de *Trichoderma* spp. são ferramentas importantíssimas, pois além de atuarem como agentes de biocontrole, promovem o crescimento das plantas, ampliam a eficiência no uso de nitrogênio e amenizam os efeitos dos estresses bióticos e abióticos. Dessa forma, continuam sendo produtos chave para uma agricultura mais sustentável. Os patógenos mais habitualmente controlados por *Trichoderma* são os fungos filamentosos, oomicetos e bactérias (Shoresh *et al.*, 2010).

O gênero *Trichoderma* pertence ao filo Ascomycota e a classe Sordariomycete. Na fase sexual, é caracterizado pela formação de corpos de frutificação do tipo peritécio, desenvolvidos em estromas com tonalidades verde, amarelo ou marrom, que são formados sobre o substrato colonizado. Nos peritécios se formam os ascos cilíndricos que contêm 8 ascósporos bicelulares, que se dividem em 16 esporos, com coloração esverdeada ou hialina (Jaklitsch, 2009).

Na fase assexuada, a partir do micélio vegetativo são formados os conidióforos com um eixo centro e ramificações laterais, geralmente agregados em pústulas e

espalhados pela colônia. As ramificações laterais findam em espirais divergentes de células conidiogênicas do tipo fiálide, de forma alongada ou de garrafa. As fiáides produzem em suas pontas os conídios esféricos, unicelulares, alongados ou ovais, e na maioria das espécies de cor verde (Abreu; Pfenning, *et al.*, 2019).

O gênero *Trichoderma* foi descrito há mais de 225 anos, inicialmente classificados como um fungo decompositor de madeira. Em 2014, com os avanços dos dados moleculares, o número de espécies passou de 200 (Atanasova, 2014), e em 2023 o número ultrapassou 400 espécies (Woo *et al.*, 2023). A maioria dessas espécies possuem uma restrita distribuição geográfica e não habitam o solo, sendo parasitas de fungos macroscópicos. Com a diversificação fisiológica, também se tornaram decompositores de madeiras em florestas temperadas e tropicais (Kubicek *et al.*, 2011; Chaverri; Samuels, 2013).

Apenas algumas dezenas de espécies se adaptaram à vida e competição na rizosfera e no solo, distribuindo-se por todo o planeta (Druzhinina *et al.*, 2011). Estas espécies possuem algumas características fenotípicas em comum, como a alta taxa de crescimento e agressiva colonização do solo e da rizosfera, vasta distribuição geográfica, ampla capacidade de parasitar ou preda outros fungos, além da capacidade de várias espécies de suscitar interações benéficas com as plantas, promovendo o crescimento e indução de resistência a estresses abióticos e bióticos (Harman *et al.*, 2004). Como consequência, a maior parte das espécies de *Trichoderma* que são isoladas e utilizadas para o controle biológico de doenças e promoção de crescimento pertencem a um reduzido número de espécies em todo o mundo (Woo *et al.*, 2014), sendo o Brasil destaque na pesquisa e uso comercial do *Trichoderma* aplicado a essas finalidades (Carvalho *et al.*, 2014).

A alimentação dos fungos ocorre por meio da absorção de nutrientes pelas hifas. Para superar a barreira criada pela parede celular e acessar os componentes como nutrientes, precisam hidrolisar as moléculas de alto peso molecular em moléculas menores. Para tal propósito, enzimas extracelulares são liberadas pelos fungos, e quanto mais diversificadas e abundantes maior a destreza de se estabelecerem em ambientes distintos. O sequenciamento do genoma de diferentes espécies de *Trichoderma* demonstra um vasto arsenal de genes que codificam chaperonas, proteínas que reparam os danos celulares gerados pelo crescimento em condições inóspitas, e transportadores ABC, proteínas da membrana celular que

contribuem para a entrada de nutrientes e eliminação de substância tóxicas absorvidas pela célula (Kubicek *et al.*, 2011).

Trichoderma é um agente de biocontrole eficaz devido às suas ações diretas no organismo alvo, e indireta através da planta hospedeira, estimulando uma resposta de defesa associada a uma infinidade de fatores de estresse bióticos. A validação detalhada de cada espécie de *Trichoderma* é crucial, visto que nem todas têm a mesma eficácia no controle dos diferentes organismos patogênicos, não se comportam igualmente nas diversas culturas ou cultivares, respondem de maneira distinta às diferentes localizações geográficas, e não mantêm um nível consistente de proteção em todas as condições de campo (Woo *et al.*, 2023).

A eficácia de *Trichoderma* como agente de biocontrole está atrelada a certas características técnicas da cepa, incluindo crescimento rápido, colonização oportunista do ambiente, esporulação abundante, arsenal bioquímico de enzima degradadoras da parede celular, bem como a produção de metabólitos secundários e a liberação dos compostos orgânicos voláteis (Guo *et al.*, 2019; Martínez-medina *et al.*, 2017).

A singularidade de *Trichoderma* advém do seu alto grau de oportunismo, e a capacidade de colonizar a rizosfera das plantas e outros substratos extremos. Uma combinação de características para competir por espaço e recursos nutricionais, reparar danos celulares, e a habilidade de produzirem estruturas de resistência, como clamidósporos e microescleródios, que asseguram sua sobrevivência em ambientes diversos, desde climas temperado e desertos até solos ácidos (Monte *et al.*, 2019).

2.4.1 Micoparasitismo

O potencial de parasitismo de *Trichoderma* é um atributo característico do fungo. O micoparasitismo denota a capacidade de atacar ou oprimir outro fungo, iniciando o processo por meio da secreção de diferentes metabólitos, pode ser dividido em três etapas distintas. A primeira se refere ao reconhecimento do hospedeiro ou fungo fitopatogênico, antes do contato ocorre a expressão de vários genes que codificam as enzimas que serão utilizadas; uma vez que ocorre o contato com o fungo fitopatogênico, há a formação de papilas ou estruturas semelhantes a apressórios; e por fim, *Trichoderma* enrola-se em torno das hifas do patógeno e começa a degradá-lo através da produção das enzimas degradadoras da parede celular, como celulasas

e hemicelulases, quitinases, proteases e glucanases, entre outros metabólitos secundários essenciais ao micoparasitismo (Viterbo; Horwitz, 2010).

Durante o ataque, o hospedeiro que está sendo parasitado se defende produzindo metabólitos e espécies reativas de oxigênio, e *Trichoderma*, por sua vez, reage ativando os genes envolvidos na desintoxicação e resposta ao estresse (Fang *et al.*, 2021).

Trichoderma também é favorecido pelo vasto arsenal de genes que codificam as enzimas hidrolíticas, que associadas a uma grande quantidade de metabólitos produzidos pelo fungo conferem a capacidade de parasitar outros fungos (Kubicek *et al.*, 2011). Estudos confirmaram que essas enzimas são responsáveis principalmente pela ruptura da parede celular do fitopatógeno (Naher *et al.*, 2014).

A relação direta entre a atividade micoparasítica e as proteases foi demonstrada pela melhor habilidade de biocontrole de cepas de *Trichoderma atroviride* que expressavam a subtilisina Prb1, uma das enzimas proteases (Flores *et al.*, 1997).

A diversidade, estrutura e propriedade cinética tão distintas das enzimas que degradam a parede celular, impactam os patógenos alvos bloqueando o sistema de defesa desses microrganismos, inibindo a germinação os esporos, o alongamento de hifas e o desenvolvimento de estruturas de resistência como clamidósporos e escleródios. Essas estratégias de controle já foram observadas em números patógenos, como: *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Ustilago*, e finalmente a *Sclerotinia* (Monte, 2001).

Um micoparasita pode sobreviver como biotrófico, obtendo nutrientes de um hospedeiro vivo, ou um necrotrófico, que mata as células do hospedeiro e obtém nutrientes da biomassa morta. A estratégia de nutrição biotrófica, foi identificada por estudos ecofisiológicos em todas as espécies do *Trichoderma*, variando entre elas o grau de parasitismo (Druzhinina *et al.*, 2018). Somado a este fato, as espécies também podem ser necrotróficas, ao se nutrirem de biomassa morta, de fungos e oomicetos (Kubicek *et al.*, 2011).

2.4.2 Antibiose e os metabólitos secundários

Com o avanço das pesquisas, o entendimento dos componentes químicos produzidos pelo *Trichoderma* nas interações com as plantas e fitopatógenos, trouxe novas perspectivas da sua aplicabilidade na agricultura. Os chamados “metabólitos secundários” produzidos pelo *Trichoderma* podem apresentar uma infinidade de funções biológicas, e estão envolvidos na sinalização, desenvolvimento e interação com outros organismos, são valiosos na colonização do habitat, e relacionados com a diversidade de organismos que as espécies desse gênero conseguem parasitar, além de contribuírem com as enzimas degradadoras da parede celular na atividade antifúngica (Ramada *et al.*, 2019).

Alguns dos fartos metabólitos produzidos, se ressaltam por seu potencial na indústria e na atividade antibiótica, ou por sua relevância na promoção de benefícios às plantas. Com relação ao controle de fitopatógenos, é fundamental a secreção dos metabólitos secundários voláteis pelo *Trichoderma* para iniciar o processo de micoparasitismo, alguns são vastamente estudados e outros desconhecidos. Outra vantagem é a contribuição dos metabólitos de *Trichoderma* para as enzimas degradadoras da parede celular, potencializando o controle pois promovem uma ruptura celular (Tijerino *et al.*, 2011).

Existem vários metabólitos, com diferentes funções, que além do biocontrole induzem efeitos desejáveis nas plantas, como o aumento na eficiência da absorção de água e nutrientes, crescimento e indução de resistência a estresses bióticos e abióticos (Harman, 2006).

A promoção de crescimento é pontuada como uma das grandes vantagens causadas pelos compostos produzidos pelo *Trichoderma*, podendo atuar como similares às auxinas, e sendo capazes de aumentar a biomassa das plantas e o crescimento de raízes. (Vinale *et al.*, 2012). Outro grande benefício, é a possibilidade de atuarem como elicitores de resistência durante a interação do *Trichoderma* com a planta, graças a diferentes classes de moléculas sinalizadoras, que são produzidas e liberadas durante o contato (Woo; Lorito, 2007).

2.4.3 Competição

A competição onde dois ou mais microrganismos requerem o mesmo espaço, nutrientes, luz ou oxigênio é executada de maneira ímpar pelo *Trichoderma*. A versatilidade desse agente de biocontrole o permite crescer em quase todos os solos, e nos ricos em matéria orgânica, favorecem a decomposição de material vegetal e fúngico. Graças também ao seu arsenal metabólico, é capaz de se nutrir de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, além de tolerar as espécies reativas de oxigênio e colonizar a rizosfera das plantas, características que o tornam um agente de controle biológico único (Monte *et al.*, 2019).

As espécies de *Trichoderma*, são capazes de produzir diversos compostos antagônicos, que em conjunto com outras estratégias como a de crescimento e colonização acelerados, os permitem mobilizarem e absorverem prontamente nutrientes do ambiente circundante e colonizarem rapidamente a rizosfera (Harman *et al.*, 2004).

Para sobreviver na rizosfera mesmo sob condições climáticas e edáficas muito adversas, o *Trichoderma* possui um tipo de chaperonas, conhecidas como proteínas heat Shock (HSP), que permitem a tolerância a estresses térmicos por frio e calor, osmóticos, salino e oxidativos (Montero-barrientos *et al.*, 2008).

A produção de sideróforos também colaboram para a sobrevivência do fungo mesmo em baixas concentrações de ferro na rizosfera (Mukherjee *et al.*, 2012). Outra capacidade é a de solubilizar fósforo mediante processos de acidificação, quelação, redox e hidrólises (Li *et al.*, 2015).

Um dos modos de defesa da planta contra o ataque de patógenos, é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que dificultam o acesso dos fitopatógenos aos tecidos celulares graças ao estresse oxidativo. Seja por espaço ou pelos nutrientes, a capacidade de competir na rizosfera, é devido a elevada tolerância do *Trichoderma* ao estresse oxidativo, sendo que algumas cepas suportam níveis de ROS que outros fungos não toleram (Morán-diez *et al.*, 2010).

O *Trichoderma* é capaz de induzir na parte aérea e nas raízes das plantas uma diminuição dos níveis de ROS quando são prejudiciais para ela, por meio da implantação de mecanismos antioxidantes, assim contribui para um aumento na tolerância a estresses abióticos, como déficit hídrico (Mastouri *et al.*, 2012).

2.4.4 Interação de *Trichoderma* com as plantas

Trichoderma possui uma relação simbiótica com as plantas, promovendo o crescimento, tanto da parte aérea como das raízes, produzindo auxinas e metabólitos que favorecem o desenvolvimento das raízes, que ficam mais profundas, vigorosas e tolerantes a seca; potencializa a absorção de água e nutrientes, além de aumentar a solubilização, resultando em um incremento na massa seca (Vinale *et al.*, 2008; Harman *et al.*, 2000; Yedidia *et al.*, 2001).

O *Trichoderma* aumenta o conteúdo de amido e açúcares solúveis das plantas e a eficácia fotossintética, diretamente relacionada com a assimilação de nitrogênio (Vargas *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2016).

Os solos rizosféricos são preferidos por *Trichoderma* devido à sua preferência nutricional, e foram demonstrados efeitos positivos para as plantas com a associação de micorrizas (Buysens *et al.*, 2016). As micorrizas podem servir de via de entrada nas raízes para *Trichoderma*, apesar de a maioria das espécies ser endofítica facultativa (Bae *et al.*, 2009).

O processo de colonização envolve o reconhecimento e aderência às raízes, penetração na planta, e a resistência aos estresses nitrosativo e oxidativo e aos metabólitos e enzimas que as plantas produzem em resposta à invasão, incluindo a degradação ativa de compostos fenólicos dos exsudatos radiculares ou supressão da biossíntese de fitoalexinas (Chen *et al.*, 2011; Masunaka *et al.*, 2011).

Segundo Mendoza-Mendoza *et al.* (2018), pode o processo de aderência à superfície da raiz, em *Trichoderma*, estar relacionado com as hidrofobinas, que são proteínas hidrofóbicas da parede celular localizadas na superfície externa, e com proteínas do tipo expansina que reconhecem a celulose e modificam a arquitetura da planta.

A interação de *Trichoderma* com as plantas desencadeia processos de sinalização mediados por fito-hormônios. No processo de colonização da raiz, *Trichoderma* se restringe ao apoplasto da planta, espaços entre as células onde circulam a água e os solutos, evitando que ele chegue até o sistema vascular causando um colapso total. Isso ocorre graças ao reforço nas paredes celulares da planta gerado por um fito-hormônio chave, o ácido salicílico (AS) que acumula uma calose impedindo a disseminação vascular do fungo (Alonso-ramírez *et al.*, 2014).

2.4.5 *Trichoderma* e a indução de defesas na planta

Além de promover crescimento, *Trichoderma* é capaz de atuar como elicitor ou indutor de resistência sistêmica nas plantas, assim as defesas das plantas são estimuladas e não precisam de um contato prévio com o patógeno ou com as condições adversas, para estarem sistematicamente preparadas. A resposta dessa indução imune em plantas é desencadeada por diversas classes de moléculas sinalizadoras, como proteínas, enzimas, peptídeos e metabólitos secundários (Nunes, 2018).

Para *Trichoderma* ser visto como um amigo pelas plantas, ele precisou desenvolver suas capacidades oportunistas, utilizar os exsudatos da raiz e superar as respostas de defesa iniciais das plantas, para assim conseguir colonizar a epiderme e o córtex, e crescer dentro e fora das raízes (Morán-diez *et al.*, 2012).

A planta é capaz de recordar estímulos prévios e apresentar respostas imunológicas quando expostas aos estresses bióticos e abióticos, acumulando compostos que ativam mecanismos de defesa altamente específicos para proteger tecidos saudáveis. A primeira linha de defesa ativa é conhecida como resposta imune inata, ela é ativada quando as moléculas dos patógenos, denominadas como padrões moleculares associados a microrganismos (microbe associated molecular patterns - MAMP), são detectadas por receptores localizados na membrana celular, conhecidos como receptor de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptors - PRR) (Monte *et al.*, 2019).

Quando o PRR é estimulado são acionados diversos sinais de transdução que se transformam em uma resposta imune denominada como imunidade disparada por MAMPs (MAMP-triggered immunity - MTI). Como resposta a essa ativação ocorre na planta a fortificação de suas paredes celulares com a deposição de calose e lignina; a acumulação de proteínas de defesa, como as quitinases e glucanases; a produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana, como as fitoalexinas; produção das espécies reativas de oxigênio; e a acumulação de fito-hormônios como ácido salicílico, ácido jasmônico (JA) e etileno, apontadas como principais responsáveis pela resposta imune (Pieterse *et al.*, 2009).

A resposta imune gerada, depende da cepa de *Trichoderma*, de sua concentração, da duração do contato e do estado de desenvolvimento da planta (Segarra *et al.*, 2007).

No caso de *Trichoderma*, a planta reage a sua chegada com um aumento nos níveis de ácido salicílico para limitar o fungo ao espaço apoplástico da epiderme e do córtex. Em seguida, *Trichoderma* aumenta nível da imunidade vegetal por meio de uma série de proteínas efetoras apoplásticas e metabólitos, como xilanase, terpenos e peptaibol. Como um colonizador do apoplasto, e por ser induzida por efetores, uma defesa mais forte e intensa é acionada, a do tipo ETI; além do tipo MTI, graças ao efetores serem reconhecidos pelos receptores PRR da superfície foliar. Devido a algumas cepas de *Trichoderma* tolerarem o estresse oxidativo de forma mais habilidosa do que outros fungos, isso lhes gera uma vantagem na rizosfera das plantas, local onde há a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como resposta da ETI (Alonso-Ramírez *et al.*, 2014).

Os efetores secretados juntamente com a tolerância as ROS podem permitir a colonização endofítica e que o *Trichoderma* estabeleça uma relação avirulenta com a planta, e um *priming* duradouro (Woo *et al.*, 2023).

As plantas acumulam compostos que ativam a indução de resistência, essa resposta de defesa sistêmica de amplo espectro e longa duração pode ocorrer de duas formas conhecidas como: resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance* - SAR) e a resistência sistêmica induzida (*induced systemic resistance* - ISR). Estes fenômenos são distinguidos pela natureza do eliciador, ou pelas vias de sinalização hormonal envolvidas, que sucede na modulação da expressão de enzimas e metabólitos que tipificam cada via (Alonso-Ramírez *et al.*, 2014).

O ácido salicílico que media a SAR, e em grande parte dos casos, a ocorrência de hipersensibilidade ativa essa rota de defesa. Comumente está associada a exposição à patógenos biotróficos avirulentos, virulentos ou à microrganismos não patogênicos. No caso do *Trichoderma*, o ácido salicílico é necessário para limitar a presença do fungo no apoplasto da planta, refugando sua chegada aos vasos vasculares (Alonso-Ramírez *et al.*, 2014).

Já a ISR é regulada pelos fito-hormônios ácido jasmônico e etileno, sendo relacionada com a defesa que as plantas apresentam frente aos patógenos necrotróficos, insetos herbívoros e microrganismos benéficos (Pieterse *et al.*, 2014). Há estudos que apresentam o ácido salicílico como regulador da defesa ISR ativada

por *Trichoderma*, e que o fungo é capaz de regular os níveis de etileno endógeno na planta (Martínez-Medina *et al.*, 2013; Viterbo *et al.*, 2010).

A interação do *Trichoderma* com as plantas é contínua, gerando respostas sistêmicas do tipo SAR ou ISR, determinadas pela expressão ondulatória de diferentes genes, fato que corrobora com a capacidade do fungo colonizar dentro e fora das raízes das plantas, acarretando uma resposta sistêmica que a planta é capaz de recordar no momento do estresse abiótico ou biótico (Rubio *et al.*, 2014).

2.5 Isolamento e seleção de agentes de biocontrole

Um dos pontos de partida das pesquisas sobre controle biológico foi a identificação do papel dos microrganismos antagonistas responsáveis por prevenir ou limitar o desenvolvimento de doenças. A triagem desses antagonistas que serão utilizados no desenvolvimento de um novo bioproduto, começa com muitos candidatos, e demanda de um programa sistemático, com critérios para atender a diversos requisitos, onde além da eficácia patogênica, precisam ser seguros ao ambiente ao homem, economicamente viáveis na produção em massa e no mercado que será empregado (Köhl *et al.* 2011).

Köhl *et al.* (2011) sumarizaram o desenvolvimento de um agente de biocontrole em nove passos: avaliação da cultura alvo, e da relevância da doença; isolamento dos antagonistas candidatos, priorizando o estudo do local onde será realizado; seleção dos isolados com atributos vantajosos, como tolerância a baixa temperatura e disponibilidade de água; análise de DNA e comparação com banco, para identificar possíveis patogênicos já conhecido aos homens ou animais; testes de eficácia com bioensaios para controle de diferentes doenças; avaliação preliminar da produção em larga escala, considerando custos e concentração mínima; custos de formulação, que garantam longa validade e boa aplicabilidade no campo; produção em massa e testes de campo completos; e, integração do bioproduto com os sistemas de cultivo, testando em diferentes regiões, pressões de doenças e momentos de aplicações, além da compatibilidade com agroquímicos.

A fase de isolamento e seleção do antagonista é a base do sucesso de um programa de controle biológico, e para cada patossistema existe um local mais apropriado para isso, sendo que são maiores as chances quando realizada no mesmo local onde será utilizado. Algumas recomendações de locais são: onde o patógeno

não consegue se estabelecer; o patógeno está presente, mas não causa doença; o potencial do inóculo diminui apesar da monocultura sucessiva; o hospedeiro e o patógeno são nativos da área; e há a suspeita de antagonista presente (Baker; Cook, 1974)

Existem diferentes métodos de isolamento como: diretamente das estruturas dos patógenos, como escleródios e lesões de ferrugem; ou de partes das plantas, como folhas, frutos, hastes, raízes ou flores; meios de cultura específicos; e, iscas com as próprias estruturas do hospedeiro, como as sementes ou escleródios, além de outras técnicas. A posterior identificação do antagonista revela características importantes do isolado, e deve ser feita por especialistas.

A interferência causada no patógeno pelo potencial antagonista pode ser avaliada *in vitro* e *in vivo* (Andrews, 1985). *In vitro* são utilizados métodos de plaqueamento em placas de Petri para onde se avalia as zonas de inibição no patógeno; e lâminas com ágar ou com gotas de diferentes suspensões, para avaliar a inibição na germinação do patógeno. *In vivo*, podem ser utilizadas folhas ou discos de folhas das plantas crescendo em condições controladas, onde o antagonista é pulverizado, o patógeno inoculado e é realizado a avaliação da doença.

Há a necessidade de que os métodos de seleção simulem as condições em que os antagonistas serão utilizados, e a fase de teste a campo também é imprescindível, visto que os antagonistas precisam se adaptar à comunidade microbiana natural, vencer as intempéries ambientais, sobrevivendo, crescendo e reproduzindo. Se o antagonista não se sair bem nesta última fase, pode ser utilizado para outros fins, como suprimento de genes (Andrews, 1985)

Algumas características dos antagonistas são importantes e devem ser avaliadas no momento da seleção: não serem fitopatogênicos; possuírem propriedades que facilitem a aplicação na superfície das plantas ou solos; capacidade de rápido estabelecimento no local; bom crescimento, estabilidade e esporulação em meio de cultura facilmente preparados e de baixo custo; presença no local onde será aplicado; e características que permitam o reconhecimento e a sobrevivência no ambiente em diferentes condições (Wood; Tveit, 1955). Outras características desejáveis são que o antagonista atue por diferentes mecanismos de ação, e seja compatível com produtos químicos, pensando em um manejo integrado.

O conhecimento da interação entre patógeno-hospedeiro-antagonista-ambiente é crucial para o correto estabelecimento do programa de controle biológico,

facilitando decisões dos métodos de isolamento e seleção dos antagonistas, e das características desejadas. O uso de diferentes antagonistas, com diferentes mecanismos de ação, traz a maior chance de sinergismo e ressalta o controle da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos escleródios

Mil escleródios de *S. sclerotiorum* foram coletados em área de produção de feijão orgânico (*Phaseolus vulgaris*), separados em grupos de 100 e transferidos para sacolas de tecido voiles. A coleta foi realizada direto do solo, peneirando o mesmo e retirando as estruturas, e, diretamente das hastes das plantas. Cinco áreas da fazenda foram escolhidas, sendo um pivô com a cultura do milho, um pivô com a cultura do feijão, uma área de bambuzal, uma área de mata fechada, e um pomar de frutíferas. Em cada local, foram enterrados a 5 cm de profundidade dois voiles, totalizando 200 escleródios por área. Os pontos escolhidos foram acompanhados e umedecidos semanalmente.

Figura 1 - A. Voiles contendo escleródios. B. Voile colocado no campo antes de ser enterrado.

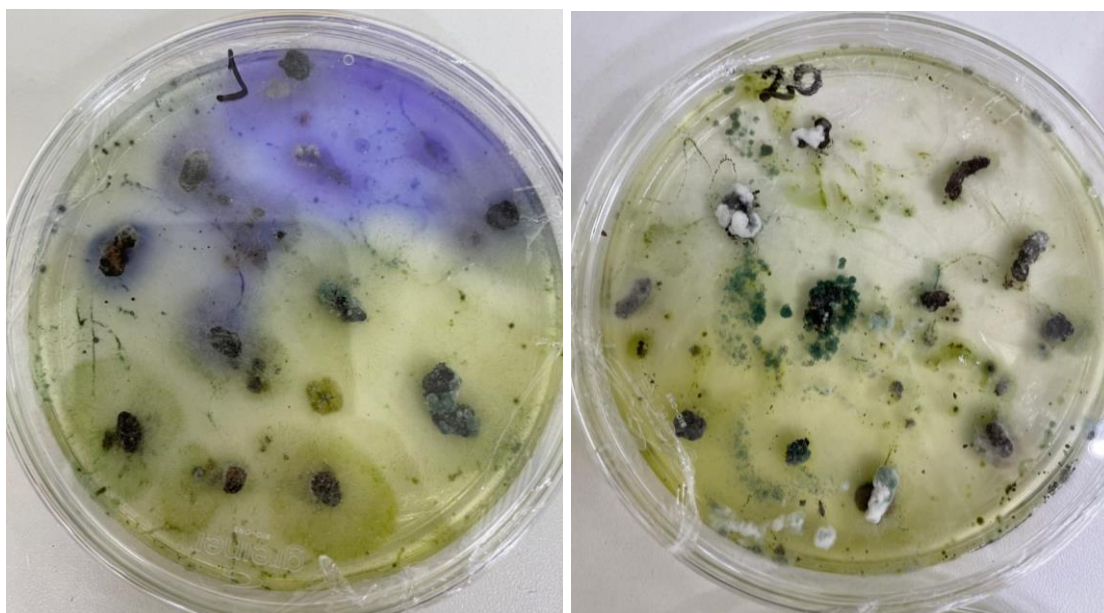


Após um mês no campo, os voiles foram desenterrados e os escleródios plaqueados em meio Neon-S, descrito por Napoleão *et al.* (2006), previamente preparado em placas de Petri 90x15mm, com 10 a 15 escleródios por placa, incubados a $19\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ no escuro e leitura feita de 7 a 12 dias. Os escleródios viáveis e não

viáveis foram quantificados. Não foi possível recuperar os voiles enterrados no pivô de milho.

Os fungos e bactérias que cresceram sobre os escleródios foram isolados para meio Batata Dextrose Ágar (BDA), previamente preparado em tubos de ensaio de 20 mL, e incubados a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram feitos repiques até a completa purificação de cada isolado, e, após finalizado foram armazenados em frascos de penicilina de 8mL com BDA.

Figura 2 - Escleródios plaqueados em meios Neon-S, após crescimento dos antagonistas.



3.2 Caracterização da área de coleta e isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*

O experimento foi executado em uma área no município de Iaras no estado de São Paulo. Se trata de uma fazenda com 800 hectares (ha) sendo destes 520 irrigados em 9 pivôs, possuindo áreas de 8 a 15 anos de condução no sistema orgânico. Há 6 anos o foco é a produção de grãos orgânicos, mas anteriormente produzia frutas orgânicas.

As áreas selecionadas foram: um pivô com a cultura do milho (*Zea mays* L.) variedade P3898, um pivô com a cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) variedade Dama, uma área de bambuzal, uma área de mata fechada, e um pomar de Jabuticaba (*Plinia trunciflora*).

Os pivôs são rotacionados entre milho, feijão e soja (*Glycine max* L.). A cada safra são realizadas 2 aplicações de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum* na área de milho, e 4 aplicações nos cultivos de feijão e soja.

Tabela 1 – Coordenadas geográficas das áreas escolhidas

Áreas	Coordenadas GPS
Pivô feijão	S 22 54.200 W 49 05.782
Bambuzal	S 22 54.445 W 49 05.589
Mata	S 22 54.190 W 49 05.391
Pomar de Jabuticaba	S 22 53.845 W 49 05.034

Na Tabela 2, é possível observar a análise de solo realizada no pivô de feijão, no ano da instalação do experimento. A área apresenta na profundidade de 0-20 cm: 31,1% de argila, 60,1% de areia e 8,7% de silte, e é cultivada em sistema orgânico há 15 anos. A adubação é feita com composto de esterco de galinhas, e é aplicado por volta de 11 toneladas por ha, somando os dois cultivos anuais. Também são utilizadas fontes naturais de potássio e fósforo, e nenhum adubo solúvel ou herbicida químico.

Tem um histórico de alta incidência da doença mofo branco, especialmente no feijão, plantado a partir de abril. O controle é baseado na aplicação de *T. harzianum* e *T. asperellum*, no sulco de plantio e nos estágios vegetativos até o fechamento da cultura, visando os escleródios. Quando surgem os sinais ou sintomas da doença, é utilizado o Hidróxido de Cobre ou Oxicloreto de Cobre. Para controle de outras pragas e doenças são utilizados produtos biológicos.

Tabela 2 - Análise de solo do pivô de feijão

Prof. (cm)	pH	Al	P res	K	S	Ca	Mg
	-	mmolc/dm ³	mg/dm ³	mmolc/dm ³	mg/dm ³	mmolc/dm ³	mmolc/dm ³
0-20	6,1	0,0	60,4	2,5	4,8	39,4	8,9
20-40	6,0	0,0	46,7	2,3	3,6	37,4	8,0

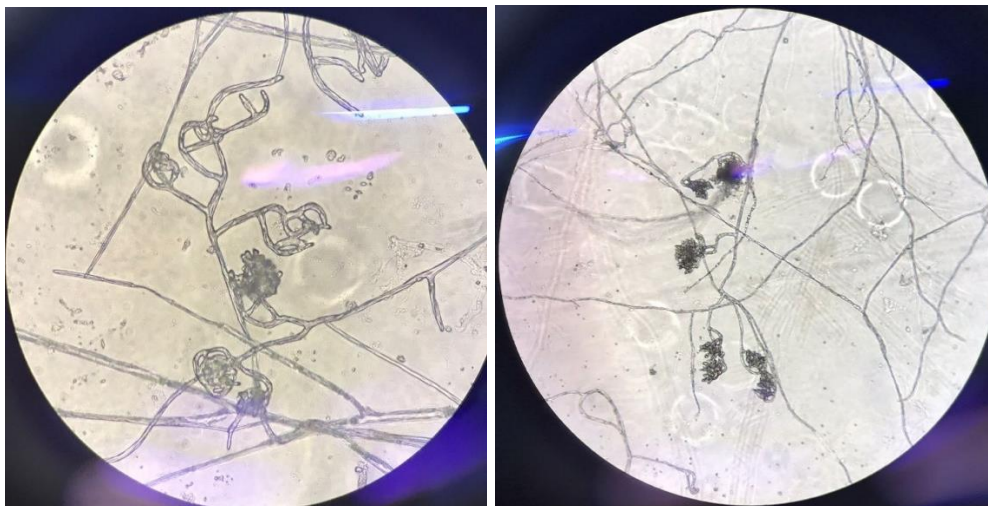
Prof. (cm)	B	Cu	Fe	Mn	Zn	SB	MOS
	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mmolc/dm ³	g/dm ³
0-20	0,5	0,9	15,7	2,3	1,8	50,8	17,5
20-40	-	-	-	-	-	47,8	17,7

Neste pivô de feijão também foram coletados os escleródios de *S. sclerotiorum* utilizados no trabalho. A coleta foi realizada no solo e diretamente de plantadas colonizadas pelo patógeno. Posteriormente o fungo foi identificado morfológicamente em laboratório. Foi preparada uma solução de hifas do fungo após crescimento em BDA, e a solução foi passada ao redor de lamínulas estéreis colocadas em meio BDA, e incubadas a 26°C, por 24h (Figura 3). Após esse período as lamínulas foram retiradas do meio BDA e analisadas em microscópio, para a verificação da formação do aglomerado de hifas, que são os primórdios da formação dos escleródios (Figura 4). A viabilidade dos escleródios foi confirmada pelo crescimento em placa de BDA e com meio Neon-S.

Figura 3 – Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em lamínulas no meio BDA, após 24 h de incubação.



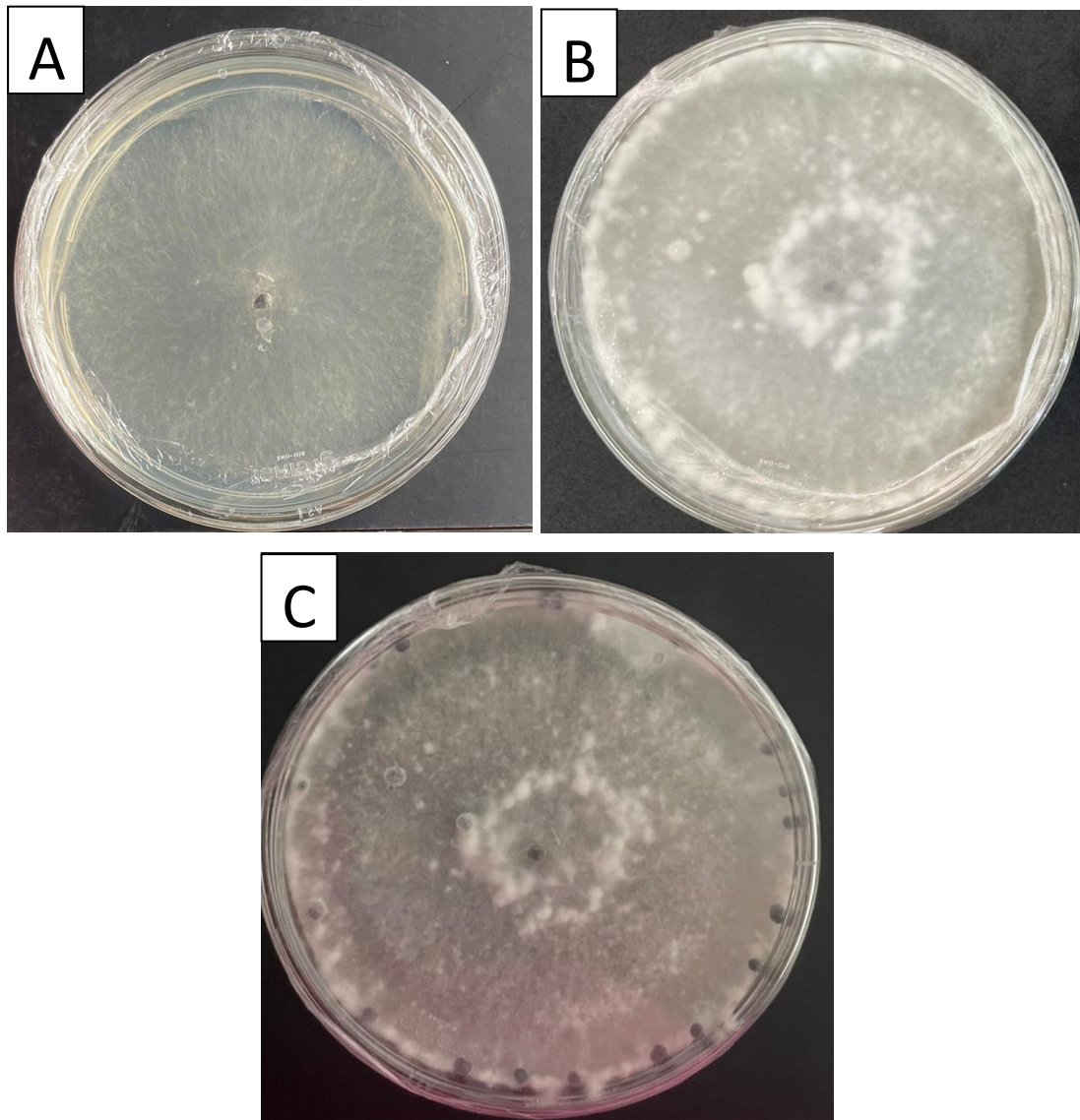
Figura 4 - Lamínulas envoltas pela solução com hifas de *Sclerotinia sclerotiorum*.



O isolado de *S. sclerotiorum* também foi crescido em BDA para identificação do padrão de crescimento e formação de escleródios (Figura 5).

Figura 5 – Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* a 26 °C, em meio BDA.

A. três dias. B. sete dias. C. 10 dias.



A área de mata selecionada pertence ao Bioma Cerrado, e corresponde a área de proteção permanente da fazenda, não sofrendo nenhum tipo de manejo. A área de bambuzal foi implantada há 60 anos, e é conservada sem nenhuma interferência.

3.3 Parasitismo de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* por esporos de *Trichoderma* spp.

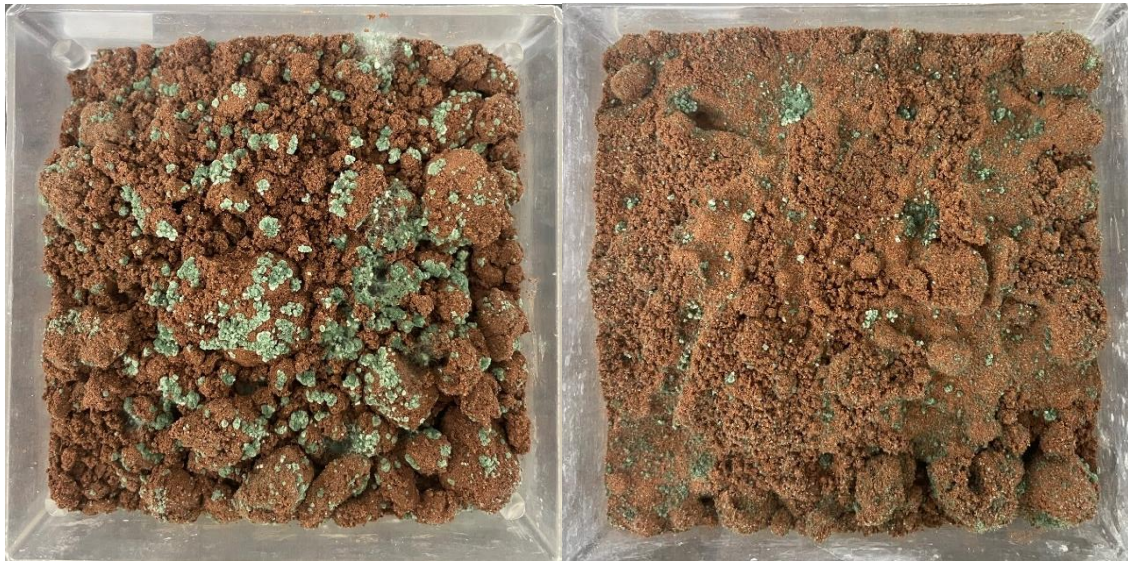
Os escleródios de *S. sclerotiorum* utilizados para o ensaio foram produzidos em placas de Petri com meio BDA. Para avaliar o parasitismo de escleródios, um solo argiloso seco foi peneirado, separado em sacos plásticos com 250 g cada e autoclavado por 1 hora, em três dias consecutivos.

Caixas de polipropileno (11 × 11 × 3,5 cm) (Gerbox®) foram lavadas com detergente neutro e colocadas em uma solução de hipoclorito de sódio 2% por 24 horas, em seguida, foram repassadas e desinfestadas com álcool 70% e colocados sob luz ultravioleta em uma cabine de fluxo laminar por aproximadamente 7 horas. Após esse período foram embaladas em sacos plásticos estéreis e armazenadas até o dia seguinte, para a montagem do ensaio. Os isolados foram repicados colocando um disco de 4 mm do fungo no centro da placa de Petri com BDA, e foram incubados por 7 dias, a 25 °C.

No dia da montagem do experimento foi realizada a lavagem das placas, com 10 mL de água destilada estéril e Tween 80°. A concentração de cada suspensão foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, e todas foram ajustadas para o volume final de 50 mL de 1×10^7 esporos/mL. Dois isolados que não atingiram esse valor mínimo foram descartados.

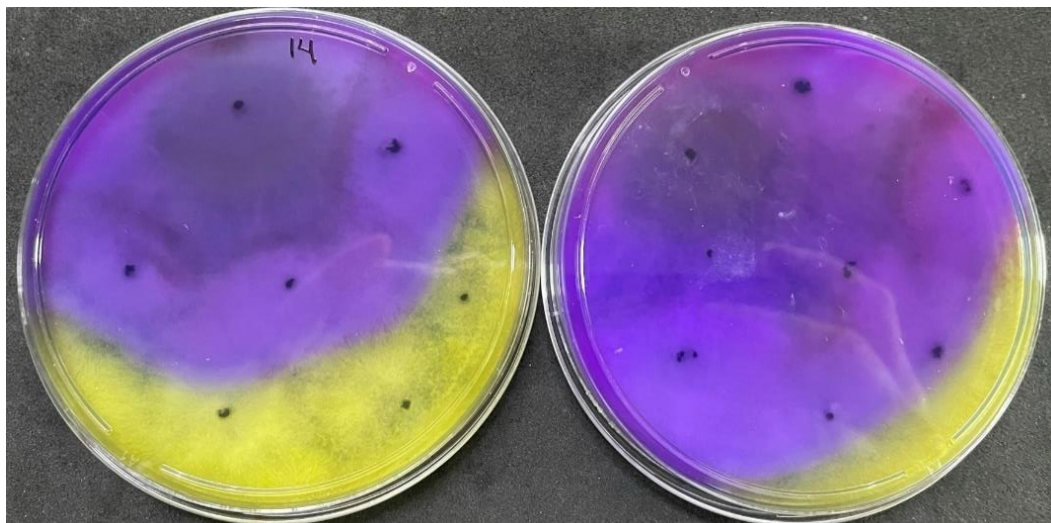
A suspensão de cada isolado (30 mL a 1×10^7 conídios/mL) foi misturada em um saco plástico com o solo autoclavado (250 g), e distribuídos na caixa de polipropileno (Gerbox®). Para cada isolado, 18 escleródios foram colocados a 0,5 cm de profundidade. As caixas foram fechadas e incubadas por 14 dias em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, os escleródios foram recuperados do solo e desinfestados superficialmente com álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio 2% (1 min) e enxaguados três vezes em água destilada estéril para serem plaqueados em meio de cultura seletivo.

Figura 6 - Gerbox com solos colonizados pelos antagonistas após serem adicionadas por 14 dias.



O meio seletivo Neon-S foi preparado segundo a metodologia de Napoleão *et al.* (2016), e os escleródios já desinfestados foram distribuídos em placas de Petri com o meio, e incubados a 20 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após 8 dias foi realizada a contagem dos escleródios viáveis e não viáveis. Quando o escleródio está inviável, não há a mudança de pH do meio Neon-S que se mantém azul, já com a presença do fungo nos escleródios viáveis, torna-se amarelo (Figura 7).

Figura 7 - Placas com escleródios no meio Neon-S após serem incubadas por oito dias.

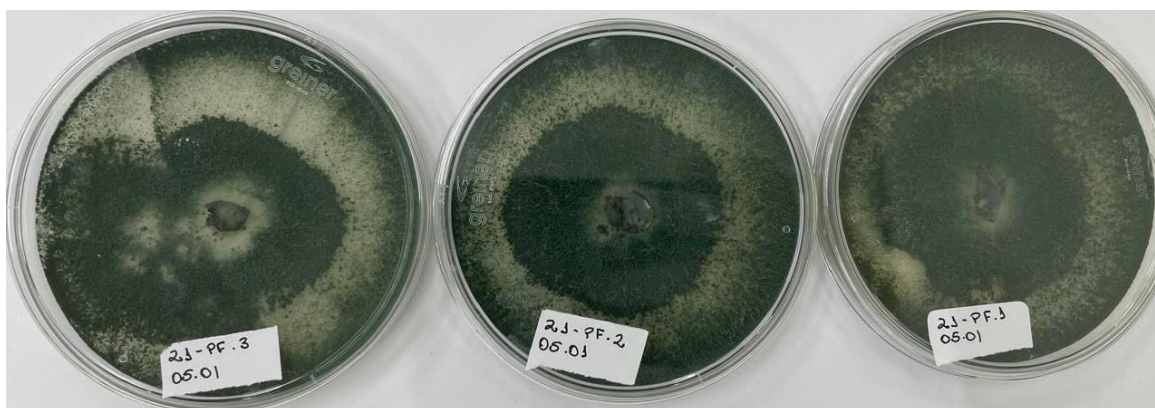


O primeiro ensaio foi realizado com os 36 isolados selecionados dos escleródios coletados no campo, utilizando 18 escleródios em uma gerbox. Os tratamentos que apresentaram acima de 80% de controle, que totalizaram 18 isolados, foram selecionados e submetidos novamente ao mesmo ensaio, utilizando 18 escleródios por gerbox, e 2 gerbox por isolado.

3.4 Quantificação de esporos dos isolados em meio de cultura

Cada isolado foi analisado quanto à capacidade de esporulação. Os isolados foram repicados com um disco de 4 mm para uma placa de Petri (90x15 mm) de BDA, e incubados por 7 dias, a 25°C. Após esse período, cada placa foi lavada com 10 mL de água destilada estéril com Tween 80. A concentração de cada suspensão foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer. Para cada isolado foi analisado três placas (Figura 8).

Figura 8 - Placas com isolado de *Trichoderma* sp. após 7 dias de incubação em meio BDA.



3.5 Teste de cultura pareada

Para a verificação do antagonismo de *Trichoderma* spp. contra o patógeno *S. sclerotiorum*, os isolados e o patógeno foram repicados em meio BDA e incubados por 7 dias, a 25 °C. Seguiu-se a metodologia de cultura pareada descrita por Ethur (2006), em que um disco de cultura BDA (10 mm de diâmetro) contendo micélio do patógeno foi colocado a uma distância de 0,5 cm da borda das placas de Petri, incubadas por 6 h a 20 ± 2 °C , com fotoperíodo de 12 h. Decorrido esse período, um

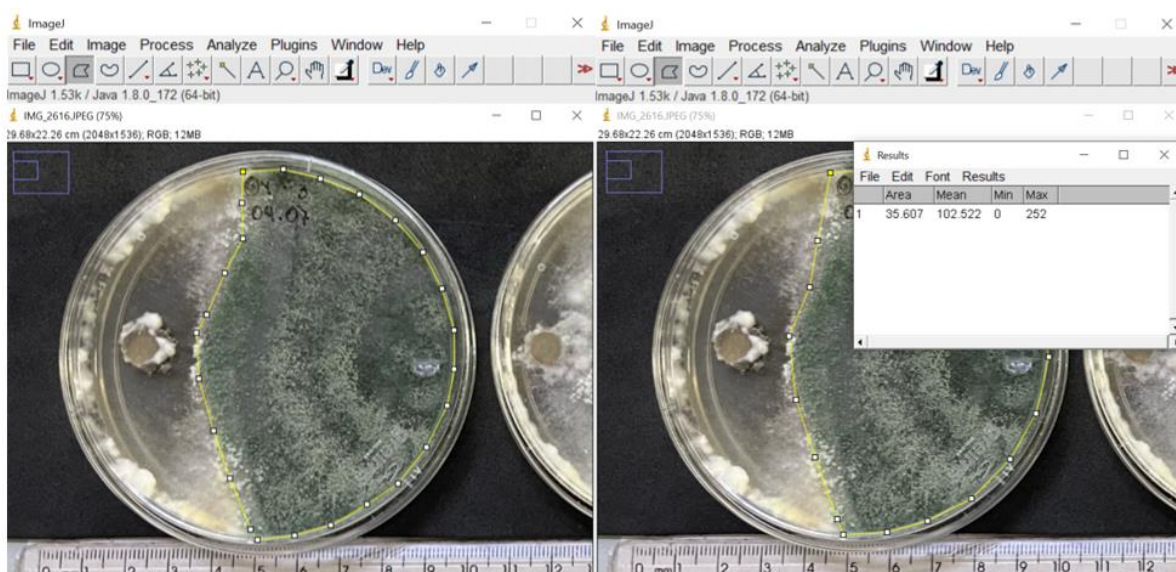
disco, com mesmo diâmetro, do antagonista, foi colocado na extremidade oposta da placa. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 20 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Foi utilizado três placas por tratamento. O experimento foi mantido até o vigésimo quarto dia para verificação do crescimento vegetativo, esporulação e formação de escleródios por *S. sclerotiorum*.

3.5.1 Taxa de inibição de *S. sclerotiorum*

Para quantificar a taxa de inibição do crescimento do patógeno frente aos antagonistas testados, foi utilizado o software ImageJ - *Image Processing*, versão 1.53k and *Analysis in Java*®. As triplicadas dos experimentos foram fotografadas e feito o upload de cada imagem no programa para análise, bem como de placas com o patógeno crescido isoladamente para se ter o comparativo.

Para iniciar a leitura, foi inserida uma escala em cada imagem, graças ao conhecimento prévio do valor do diâmetro da placa de Petri, igual a 9 cm. Seguiu-se utilizando a ferramenta de seleção a mão livre para demarcar a área de crescimento do antagonista na placa, por fim, na aba Análise, foi selecionado o item Medidas, para quantificar a área que foi circulada. Sabendo a área de crescimento do antagonista e área de crescimento do patógeno em placa isolada, pôde-se calcular a taxa de inibição do crescimento.

Figura 9 - Cálculo da área de inibição do crescimento do fungo no ImageJ



3.6 Identificação taxonômica dos fungos antagonistas

3.6.1 Extração de DNA

A biomassa fúngica micelial foi recuperada a partir de cultivos prévios em placas de Petri. Posteriormente, foi realizado a centrifugação a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células lavado com solução salina estéril, repetindo a etapa de centrifugação. A biomassa celular de *Trichoderma* foi incubada em estufa com temperatura de aproximadamente 50 °C por cerca de 30 min, ou até que a biomassa estivesse completamente seca. Cerca de 500 mg da biomassa seca foi transferida para almofariz previamente resfriado com nitrogênio líquido e macerada com pistilo até obtenção de um pó fino.

O material macerado foi utilizado para a extração de DNA utilizando o kit *QIAamp DNA Microbiome* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O isolamento e integridade do DNA foram checados por eletroforese em gel de agarose a 1% (tampão TAE, Tris-Acetato-EDTA, pH 8,0).

3.6.2 Amplificação, sequenciamento e montagem do gene ITS (Internal Transcribed Spacer)

Os fragmentos foram amplificados utilizando os primers que flanqueiam região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA ribossomal, de forma completa: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Posteriormente, os produtos amplificados foram purificados e o sequenciamento foi realizado no analisador genético *Applied Biosystems 3500* usando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. As condições para amplificação e os parâmetros de ciclagem serão seguidos conforme o manual do fabricante. A avaliação de qualidade e a montagem dos "contigs" foram realizadas nos programas *Phred* e *Phrap* (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), utilizando os parâmetros abaixo (Q>20, *Phred quality score*).

3.6.3 Anotação taxonômica

A afiliação taxonômica foi realizada utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), comparando as sequências de ITS obtidas após controle de qualidade (CQ) com as sequências de referência disponíveis no banco de dados GenBank do NCBI, incluindo o filtro com linhagens de referência. A anotação taxonômica foi atribuída com base em parâmetros, como similaridade das sequências de ITS com as sequências de referência, identidade e a cobertura para garantir resultados confiáveis.

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes de inibição de crescimento na cultura pareada e de parasitismo dos escleródios por esporos de *Trichoderma* spp., foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando como verdadeira todas as pressuposições de independência, homoscedasticidade e normalidade dos erros experimentais, e as comparações múltiplas das médias foram realizadas a partir do teste de Tukey, utilizando nível de significância 5%. Todas as análises estatísticas foram obtidas utilizando o software R versão 3.2.2 (www.r-project.org/) como plataforma de análise.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção e identificação dos isolados

Foram isolados 40 fungos dos escleródios de *S. sclerotiorum*, sendo que 25 foram obtidos dos escleródios enterrados no solo sob pivô com cultivo de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), 5 de solo da mata, 6 de solo sob área de cultivo de jabuticaba (*Plinia cauliflora*) e 4 de solo da área de bambuzal. A ideia da diversidade de microrganismos é potencializada graças a ampla variação com relação à forma, cor e elevação das colônias, apresentada pelos isolados.

Do total de isolados obtidos, vinte e seis já foram identificadas em nível molecular após caracterização morfológica utilizando os primers ITS 1 e ITS 4, sequências amplificadas de aproximadamente 550 pares de bases, observadas no gel de agarose.

Foram obtidos 9 espécies diferentes: sendo um *Trichoderma afroharzianum*, isolado da mata; um *Trichoderma peberdyi*, isolado no pivô de feijão; um *Trichoderma pubescens*, isolado do pivô de feijão; dois *Trichoderma hamatum*, isolado da mata e outro da área de jabuticaba; dois isolados de *Trichoderma rifaii*, sendo um da mata e um da área de jabuticaba; três *Trichoderma caribbaeum*, sendo um do pivô de feijão e dois da área de jabuticaba; seis *Trichoderma atrobrunneum*, todos isolados do pivô de feijão; sete isolados de *Trichoderma dorotheae*, sendo um do pivô de feijão, um da mata, dois da área de jabuticaba e três do bambuzal; e, doze isolados de *Trichoderma yunnanense*, todos retirados do pivô de feijão (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de isolados obtidos em cada área.

	Bambuzal	Jabuticaba	Mata	Pivô Feijão
<i>Fusarium foetens</i>	0	0	0	1
<i>Talaromyces purpureogenus</i>	0	0	0	1
<i>Trichoderma afroharzianum</i>	0	0	1	0
<i>Trichoderma atrobrunneum</i>	0	0	0	6
<i>Trichoderma caribbaeum</i>	0	2	0	1
<i>Trichoderma dorotheae</i>	3	2	1	1
<i>Trichoderma hamatum</i>	0	1	1	0
<i>Trichoderma peberdyi</i>	0	0	0	1
<i>Trichoderma pubescens</i>	0	0	0	1
<i>Trichoderma rifaii</i>	0	1	1	0
<i>Trichoderma sp.</i>	1	0	1	2
<i>Trichoderma yunnanense</i>	0	0	0	11

Nas figuras 10, 11, 12 e 13, é possível observar a representação em porcentagem da quantidade dos diferentes isolados em cada uma das áreas amostradas.

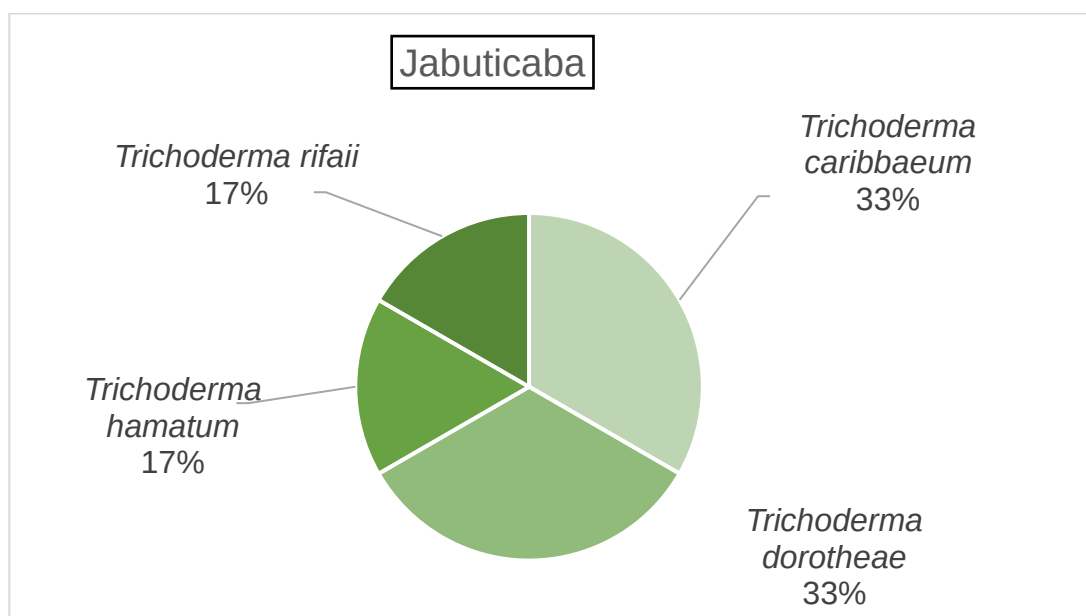
Figura 10 - Porcentagem dos diferentes isolados na área de Jabuticaba.

Figura 11 - Porcentagem dos diferentes isolados na área da Mata.

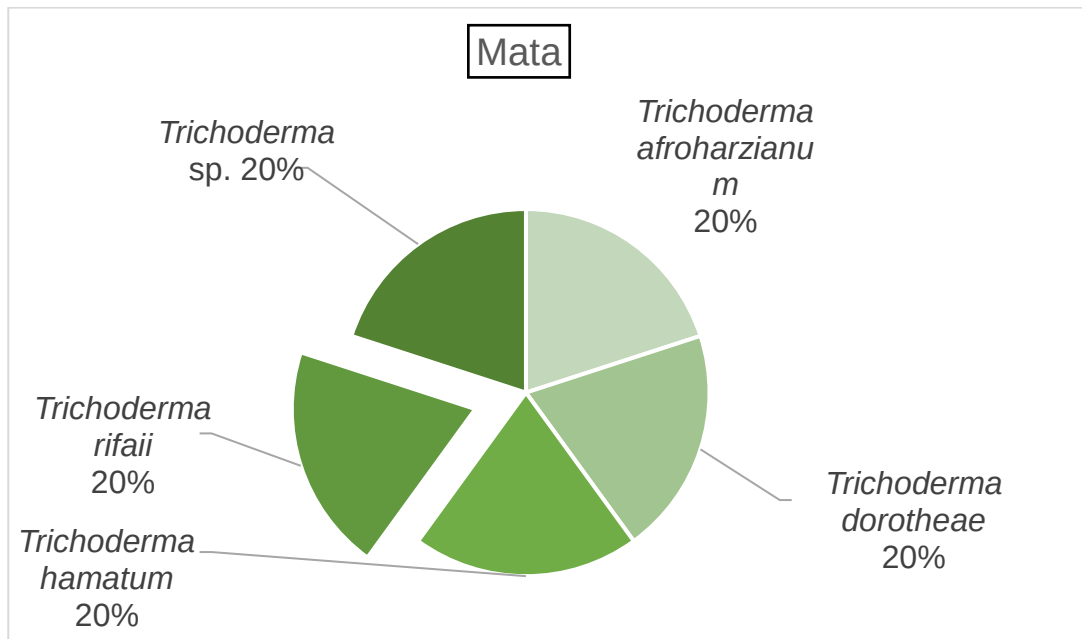


Figura 12 – Porcentagem dos diferentes isolados na área de Bambuzal.

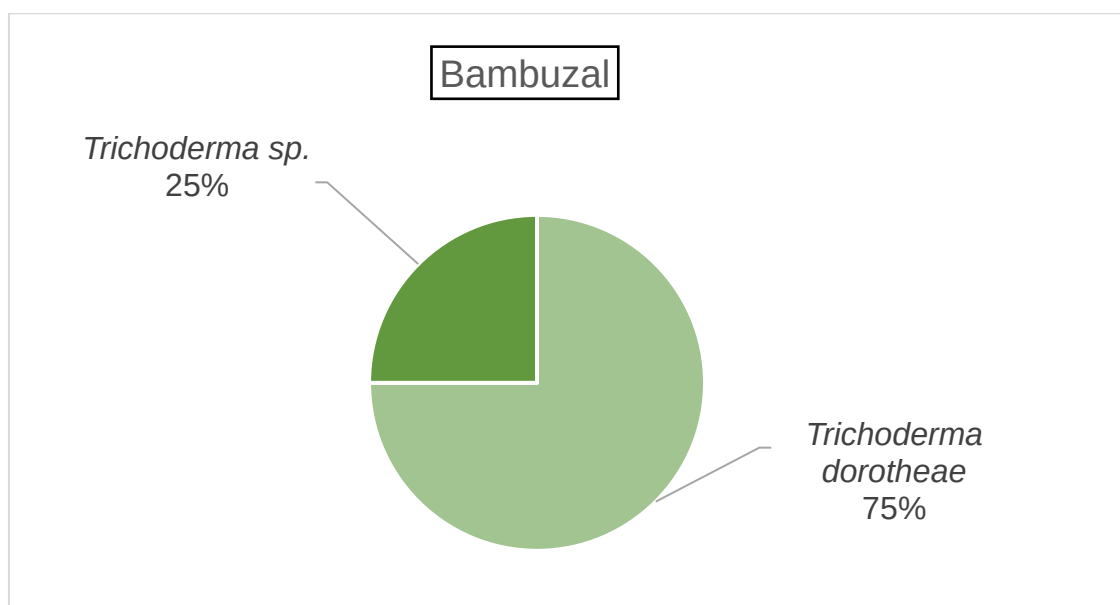
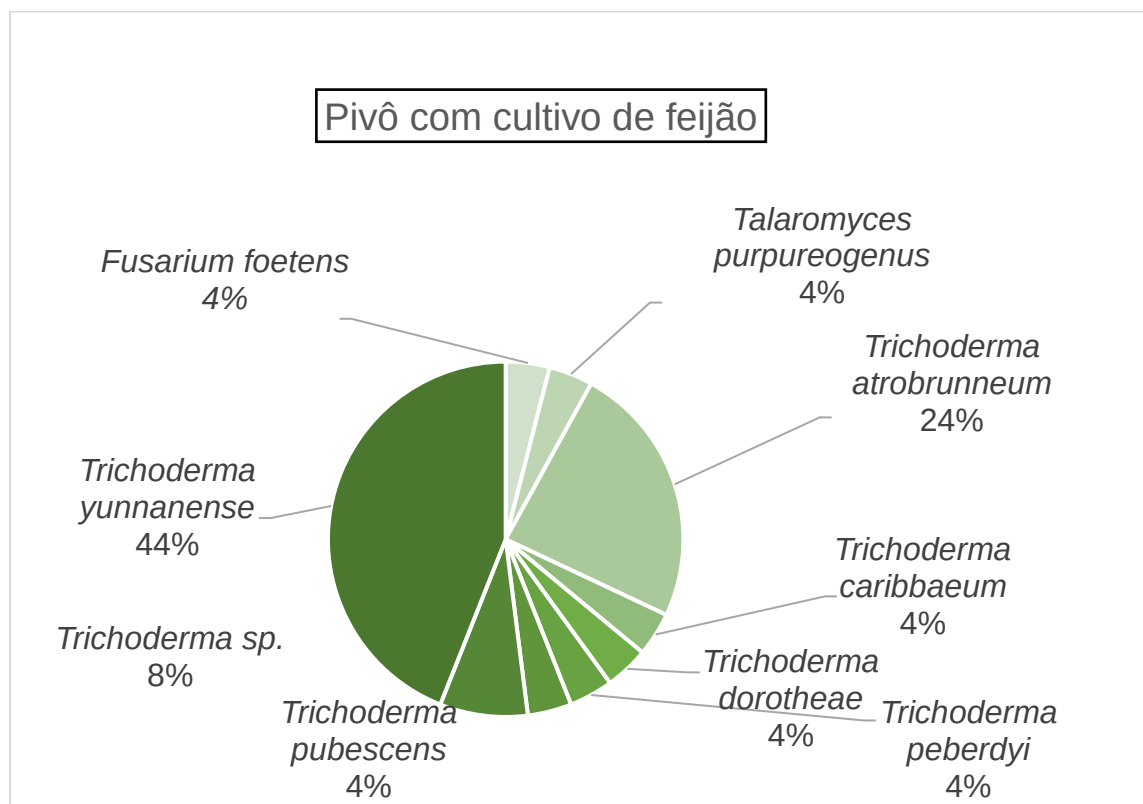


Figura 13 – Porcentagem dos diferentes isolados na área do pivô com cultivo de feijão.



As sequências, obtidas a partir do sequenciamento, foram montadas utilizando o CodonCode Aligner versão 11.0.2. Para espécies próximas, as sequências foram comparadas com as demais disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST disponível no NCBI (Tabela 4).

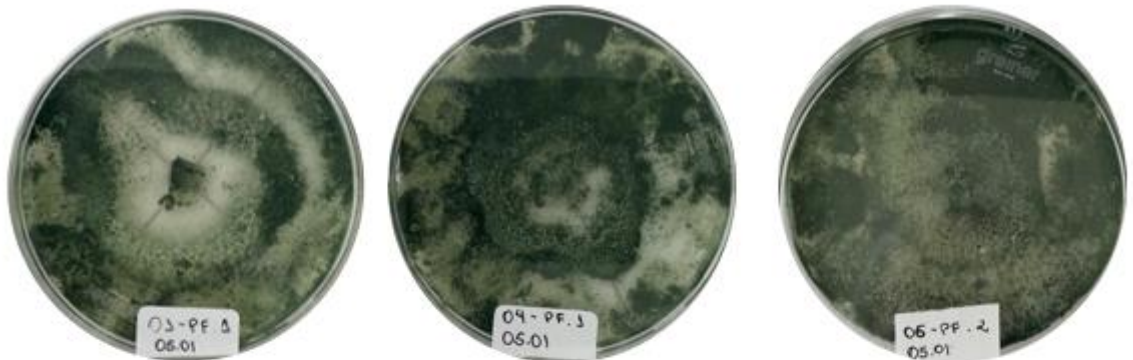
Tabela 4 - Identificação de isolados fúngicos com base na análise da sequência genética ITS e suas espécies próximas no banco de dados GenBank.

Isolados	Área de origem	Nome científico	Cobertura	Similaridade	Comprimento (bp)	GenBank do NCBI*
1	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	95%	99,82%	599	NR_134419.1
2	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	97%	99,66%	599	NR_134419.1
3	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	100%	100,00%	599	NR_134419.1
4	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	100%	100,00%	599	NR_134419.1
5	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	98%	100,00%	599	NR_134419.1
6	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	100%	100,00%	599	NR_134419.1
7	Pivô Feijão	<i>Trichoderma sp.</i>	-	-	-	-
8	Pivô Feijão	<i>Trichoderma sp.</i>	-	-	-	-
9	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	98%	100,00%	599	NR_134419.1
10	Pivô Feijão	<i>Trichoderma atrobrunneum</i>	100%	99,83%	618	NR_137298.1
11	Pivô Feijão	<i>Trichoderma atrobrunneum</i>	100%	100,00%	618	NR_137298.1
12	Pivô Feijão	<i>Trichoderma atrobrunneum</i>	98%	99,84%	618	NR_137298.1
13	Pivô Feijão	<i>Trichoderma pubescens</i>	100%	98,74%	627	NR_077179.1
14	Pivô Feijão	<i>Trichoderma peberdyi</i>	100%	100,00%	604	NR_173288.1
15	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	96%	99,82%	599	NR_134419.1
16	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	100%	100,00%	599	NR_134419.1
17	Pivô Feijão	<i>Trichoderma atrobrunneum</i>	100%	100,00%	618	NR_137298.1
18	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	95%	100,00%	599	NR_134419.1
19	Pivô Feijão	<i>Fusarium foetens</i>	99%	100,00%	511	NR_159865.1
20	Pivô Feijão	<i>Trichoderma atrobrunneum</i>	100%	100,00%	618	NR_137298.1
21	Pivô Feijão	<i>Trichoderma dorotheae</i>	100%	99,13%	606	NR_166014.1
22	Pivô Feijão	<i>Trichoderma caribbaeum</i>	100%	99,31%	658	NR_166015.1
24	Pivô Feijão	<i>Trichoderma atrobrunneum</i>	99%	100,00%	618	NR_137298.1
27	Pivô Feijão	<i>Trichoderma yunnanense</i>	100%	100,00%	599	NR_134419.1
28	Pivô Feijão	<i>Talaromyces purpleogenus</i>	98%	98,84%	615	NR_121529.1
30	Mata	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	100%	100,00%	589	NR_137304.1
33	Mata	<i>Trichoderma dorotheae</i>	100%	100,00%	606	NR_166014.1

35	Mata	<i>Trichoderma hamatum</i>	100%	99,82%	625	NR_134371.1
36	Mata	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	-
38	Mata	<i>Trichoderma rifaii</i>	99%	99,82%	602	NR_137305.1
40	Jabuticaba	<i>Trichoderma rifaii</i>	100%	100,00%	606	NR_166014.1
41	Jabuticaba	<i>Trichoderma dorotheae</i>	100%	100,00%	606	NR_166014.1
43	Jabuticaba	<i>Trichoderma caribbaeum</i>	100%	99,65%	658	NR_166015.1
44	Jabuticaba	<i>Trichoderma hamatum</i>	98%	99,83%	625	NR_134371.1
45	Jabuticaba	<i>Trichoderma caribbaeum</i>	99%	99,66%	658	NR_166015.1
46	Jabuticaba	<i>Trichoderma dorotheae</i>	100%	100,00%	606	NR_166014.1
47	Bambuzal	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	-
49	Bambuzal	<i>Trichoderma dorotheae</i>	100%	100,00%	606	NR_166014.1
53	Bambuzal	<i>Trichoderma dorotheae</i>	99%	100,00%	606	NR_166014.1
56	Bambuzal	<i>Trichoderma dorotheae</i>	100%	100,00%	606	NR_166014.1

*Banco de dados NCBI: região do Espaador Transcrito Interno (ITS).

Figura 14 - Desenvolvimento dos diferentes isolados do pivô de feijão, após sete dias de incubação em meio BDA.



01. *Trichoderma yunnanense* 04. *Trichoderma yunnanense* 06. *Trichoderma yunnanense*



07. *Trichoderma* sp. 09. *Trichoderma yunnanense* 10. *Trichoderma atrobronneum*



12. *Trichoderma atrobronneum* 13. *Trichoderma pubescens* 14. *Trichoderma peberdyi*



15. *Trichoderma yunnanense* 17. *Trichoderma atrobrunneum* 20. *Trichoderma atrobrunneum*



21. *Trichoderma dorotheae* 22. *Trichoderma caribbaeum* 27. *Trichoderma yunnanense*

Figura 15 - Desenvolvimento dos diferentes isolados da mata, após sete dias de incubação em meio BDA



33. *Trichoderma dorotheae*

35. *Trichoderma hamatum*

36. *Trichoderma* sp.

Figura 16 - Desenvolvimento dos diferentes isolados da área de jabuticaba, após sete dias de incubação em meio BDA.

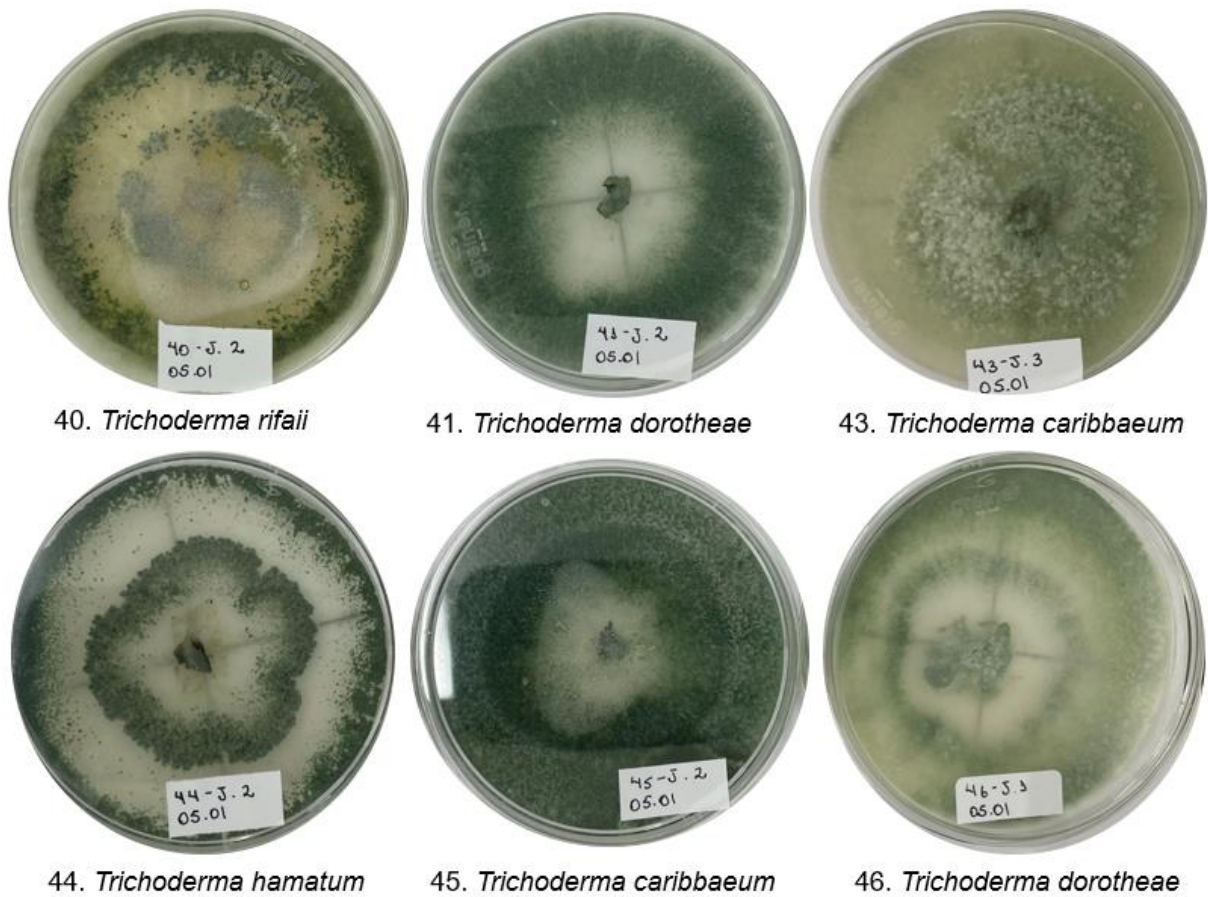
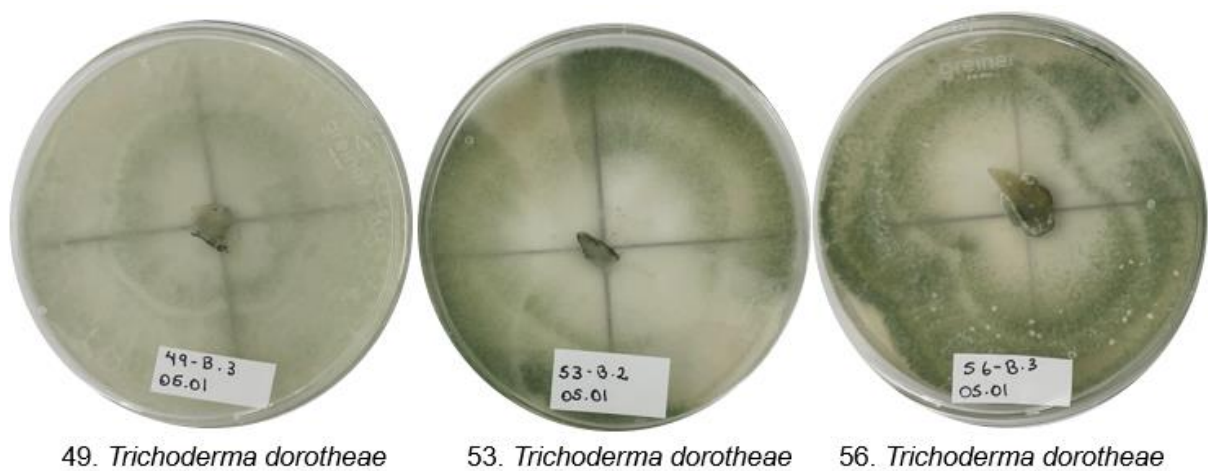


Figura 17 - Desenvolvimento dos diferentes isolados do bambuzal, após sete dias de incubação em meio BDA.



4.2 Quantificação de esporos dos isolados em meio de cultura

A produção de esporos fúngicos foi quantificada em meio de cultura BDA, após a lavagem de uma placa de Petri com 10mL de água com Tween. Dos 40 isolados, 35 resultaram em um valor maior que 1×10^8 UFC/mL. Os isolados 24 e 30 não foram quantificados, pois apresentaram apenas crescimento micelial. Os isolados 19 e 49 produziram menos que 6×10^7 UFC/mL e foram descartados. Já os isolados 28, 7 e 2, apresentaram as maiores concentrações, $9,7 \times 10^8$, $8,2 \times 10^8$ e $7,9 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente.

Foi observado que a média da esporulação dos isolados da área de bambuzal foi a menor com $9,35 \times 10^7$ UFC/mL, seguido pela média da área de jabuticaba de $2,9 \times 10^8$ UFC/mL, em terceiro lugar a média dos isolados da mata foi de $3,74 \times 10^8$ UFC/mL, e os isolados do pivô de feijão apresentaram a maior média com $4,43 \times 10^8$ UFC/mL.

A média das três leituras realizadas por isolado, é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração (UFC/mL) dos isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Nome científico	Área	UFC/mL	UFC/cm ²
			Média	Média
1	<i>T. yunnanense</i>	PF	3,90E+08	1,53E+06
2	<i>T. yunnanense</i>	PF	7,89E+08	3,10E+06
3	<i>T. yunnanense</i>	PF	2,31E+08	9,08E+05
4	<i>T. yunnanense</i>	PF	4,44E+08	1,74E+06
5	<i>T. yunnanense</i>	PF	2,84E+08	1,11E+06
6	<i>T. yunnanense</i>	PF	5,13E+08	2,02E+06
7	<i>Trichoderma</i> sp.	PF	8,22E+08	3,23E+06
8	<i>Trichoderma</i> sp.	PF	6,65E+08	2,61E+06
9	<i>T. yunnanense</i>	PF	4,31E+08	1,69E+06
10	<i>T. atrobrunneum</i>	PF	2,43E+08	9,56E+05
11	<i>T. atrobrunneum</i>	PF	3,41E+08	1,34E+06
12	<i>T. atrobrunneum</i>	PF	3,77E+08	1,48E+06
13	<i>T. pubescens</i>	PF	3,31E+08	1,30E+06
14	<i>T. peberdyi</i>	PF	3,53E+08	1,39E+06
15	<i>T. yunnanense</i>	PF	5,24E+08	2,06E+06
16	<i>T. yunnanense</i>	PF	4,07E+08	1,60E+06
17	<i>T. atrobrunneum</i>	PF	5,69E+08	2,23E+06
18	<i>T. yunnanense</i>	PF	4,24E+08	1,66E+06
19	<i>F. foetes</i>	PF	2,00E+07	7,86E+04
20	<i>T. atrobrunneum</i>	PF	1,37E+08	5,37E+05
21	<i>T. dorotheae</i>	PF	4,94E+08	1,94E+06
22	<i>T. caribbaeum</i>	PF	2,79E+08	1,10E+06
27	<i>T. yunnanense</i>	PF	5,82E+08	2,29E+06
28	<i>T. purpureogenus</i>	PF	9,75E+08	3,83E+06
33	<i>T. dorotheae</i>	M	2,41E+08	9,47E+05
35	<i>T. hamatum</i>	M	2,32E+08	9,13E+05
36	<i>Trichoderma</i> sp.	M	4,64E+08	1,82E+06
38	<i>T. rifaii</i>	M	5,60E+08	2,20E+06
40	<i>T. rifaii</i>	J	5,53E+08	2,17E+06
41	<i>T. dorotheae</i>	J	2,41E+08	9,47E+05
43	<i>T. caribbaeum</i>	J	1,63E+08	6,39E+05
44	<i>T. hamatum</i>	J	1,77E+08	6,94E+05
45	<i>T. caribbaeum</i>	J	3,24E+08	1,27E+06
46	<i>T. dorotheae</i>	J	2,87E+08	1,13E+06
47	<i>Trichoderma</i> sp.	B	1,49E+08	5,84E+05
49	<i>T. dorotheae</i>	B	1,47E+07	5,78E+04
53	<i>T. dorotheae</i>	B	6,20E+07	2,44E+05
56	<i>T. dorotheae</i>	B	1,49E+08	5,85E+05

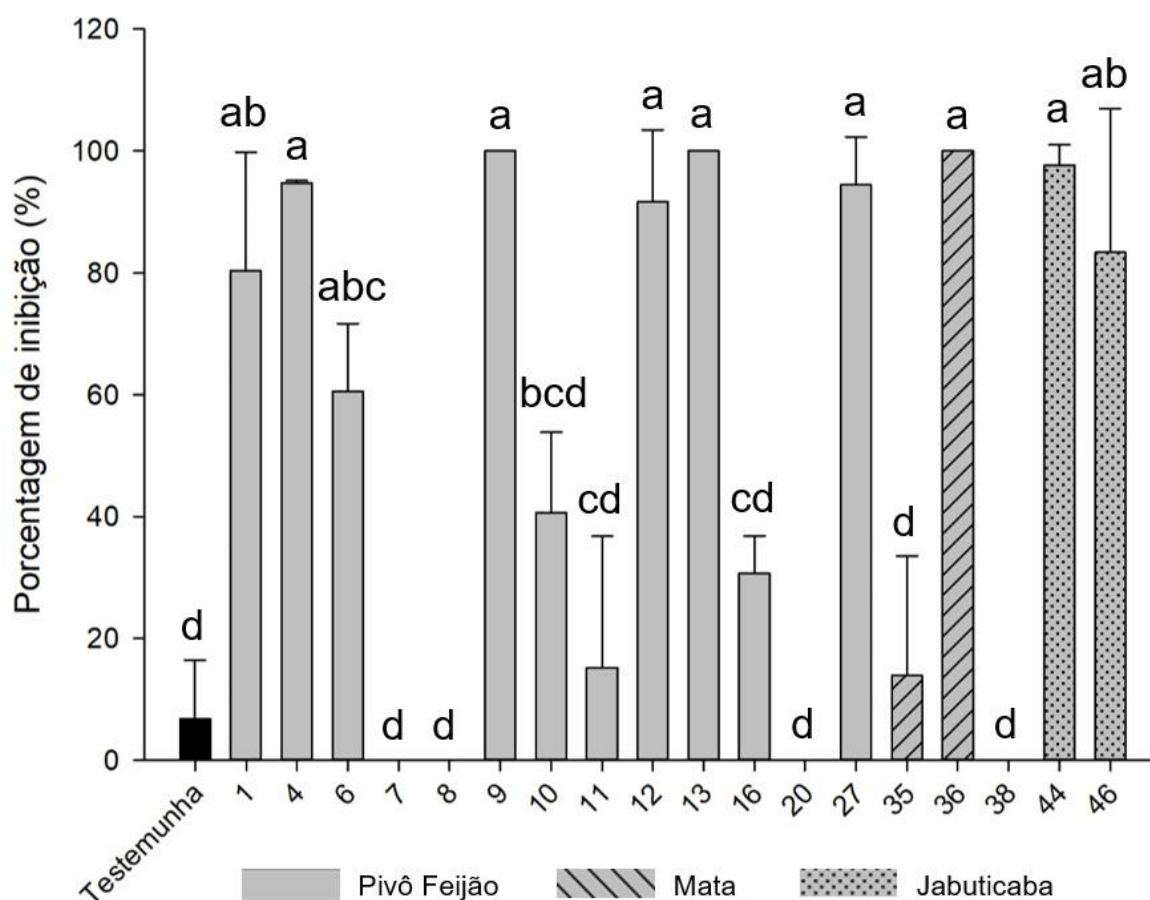
* PF = pivô feijão; M = mata; J = jabuticaba; e, B = bambuzal

4.3 Parasitismo de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* por esporos de *Trichoderma* spp.

Na primeira avaliação do potencial de parasitismo de escleródios pelos isolados de *Trichoderma*, foram utilizados os 36 isolados com maior produção de esporos/mL. As médias dos resultados dos escleródios inviáveis foram submetidas ao teste de Tukey ($p < 0,05$) e selecionados os 18 isolados com mais de 80% de controle dos escleródios, sendo que 16 deles inativaram em 100% os escleródios.

O teste foi repetido com os 18 isolados pré-selecionados e 7 deles apresentaram controle superior a 90%. Esses isolados foram os de números 4, 9, 12, 13, 27, 36 e 44, os cinco primeiros foram obtidos da área de cultivo de feijão sob pivô, o isolado 36 da área de mata nativa e o 44 da área do pomar de jabuticaba. Os isolados 4, 9 e 27 foram identificados como *T. yunnanense* e o isolado 12 como *T. atrobrunneum*, os demais isolados estão sendo identificados.

Figura 18 - Efeito dos diferentes isolados na inibição de germinação de escleródios de *Sclerotium sclerotiorum*.

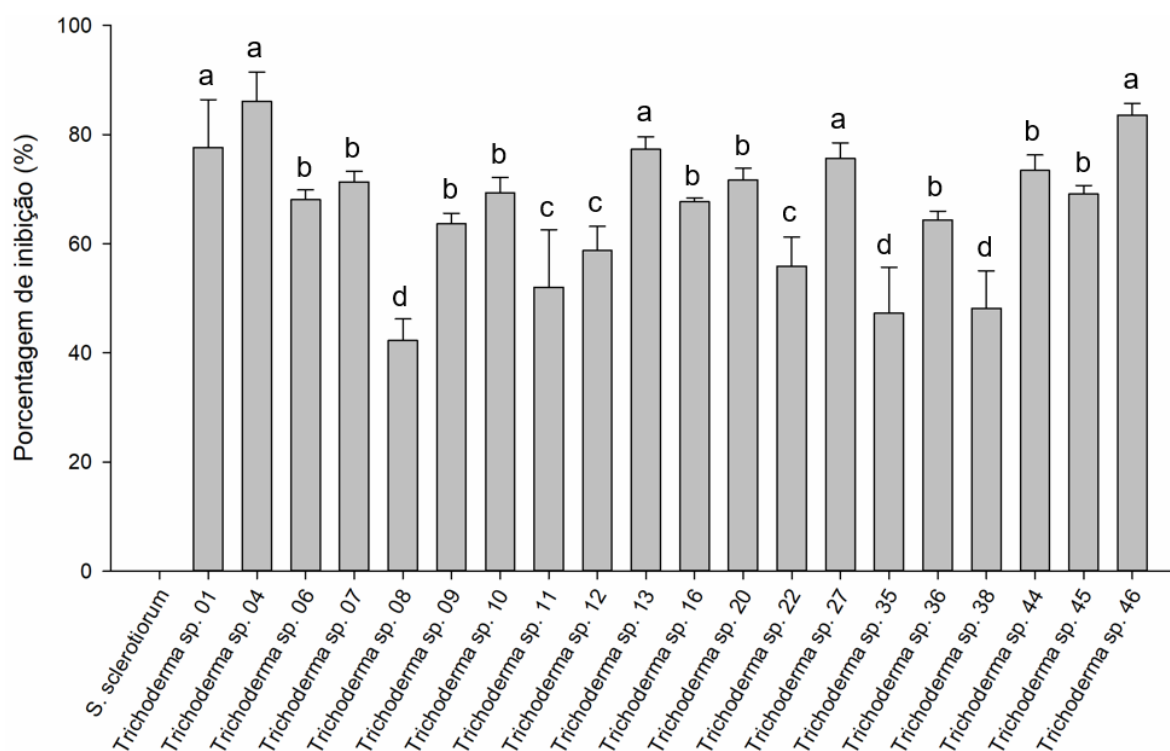


* Letras iguais não diferem entre si significativamente, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

4.4 Antagonismo pelo método da cultura pareada

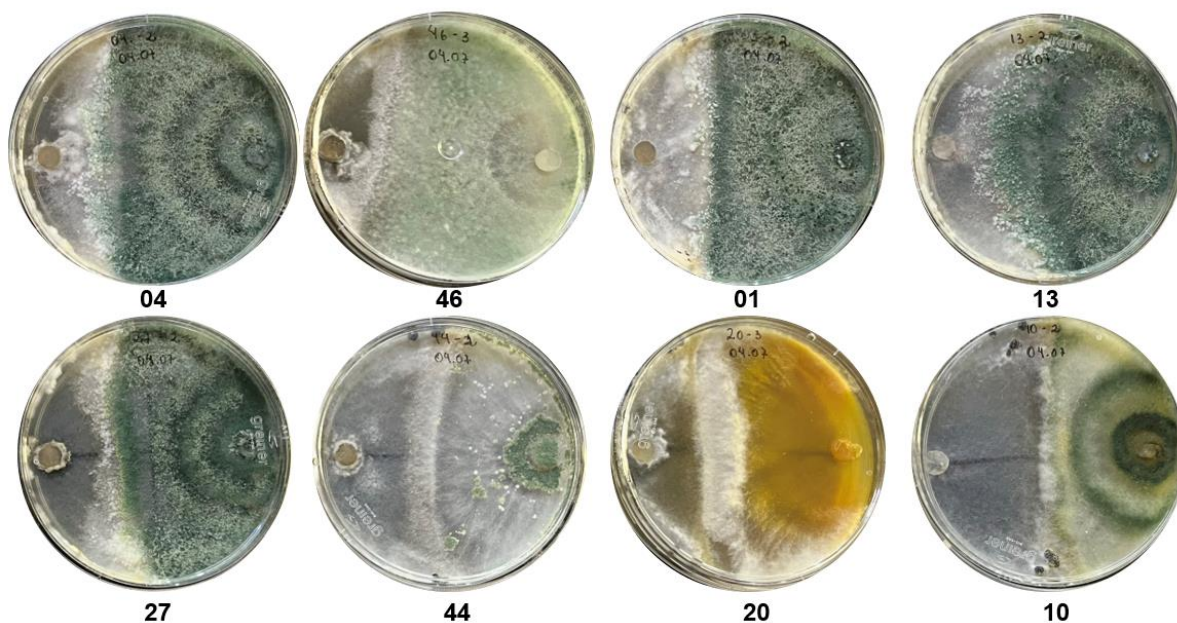
Posteriormente, foi realizado o teste de cultura pareada para a verificação de antagonismo de *Trichoderma* sp. sobre *S. sclerotiorum*. O programa *ImageJ* foi utilizado para a quantificação da área das colônias. Cinco antagonistas diferiram estatisticamente dos demais, segundo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$), apresentando maior eficiência na inibição de 75,7 a 86,1%, são os isolados 4, 46, 1, 13 e 27.

Figura 19 - Efeito dos diferentes isolados na inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*, em placas de Petri.



* Letras iguais não diferem entre si significativamente, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$)

Figura 20 - Culturas de isolados de *Trichoderma* spp. mais agressivos ou eficazes contra *Sclerotium sclerotiorum*, após sete dias em meio BDA



Também foi quantificada a formação de escleródios após 20 dias de exposição aos antagonistas, sendo que os isolados 4 e 13 foram os únicos que impediram a formação de escleródios em placa, enquanto na testemunha formou-se uma média de 28,8 escleródios por placa. O isolado 4 se destacou em todos os testes, seguido dos isolados 13, 27 e 44, mostrando potencial de parasitismo dos escleródios, inibição de crescimento do patógeno, bem como inibição da formação de escleródios (Tabela 6).

Figura 21 - Formação de escleródios após 20 dias de exposição aos antagonistas, em meio BDA.



Tabela 6 - Formação de escleródios em placa na presença dos antagonistas.

Tratamentos	Nome científico	Média escleródios formados	Grupo (p<0.05)*
4	<i>T. yunnanense</i>	0,0	a
13	<i>T. pubescens</i>	0,0	a
9	<i>T. yunnanense</i>	2,0	ab
1	<i>T. yunnanense</i>	2,5	ab
6	<i>T. yunnanense</i>	3,0	ab
16	<i>T. yunnanense</i>	3,0	ab
7	<i>Trichoderma sp.</i>	3,5	ab
12	<i>T. atrobrunneum</i>	4,0	abc
8	<i>Trichoderma sp.</i>	4,5	abcd
20	<i>T. atrobrunneum</i>	4,5	abcd
46	<i>T. dorotheae</i>	5,0	abcd
44	<i>T. hamatum</i>	5,0	abcd
22	<i>T. caribbaeum</i>	5,5	abcde
10	<i>T. atrobrunneum</i>	6,0	abcde
27	<i>T. yunnanense</i>	6,5	bcde
45	<i>T. caribbaeum</i>	10,0	cde
38	<i>T. rifaii</i>	10,0	cde
36	<i>Trichoderma sp.</i>	10,0	cde
35	<i>T. hamatum</i>	10,5	de
11	<i>T. atrobrunneum</i>	11,5	e
Testemunha	-	28,8	f

* Letras iguais não diferem entre si significativamente, pelo teste de Tukey (p<0.05)

5 DISCUSSÃO

Um dos primeiros passos na identificação a nível de espécie de *Trichoderma* é por meio da análise da sequência do DNA. As características da morfologia da colônia de *Trichoderma* que são utilizadas para identificar os fungos deste gênero, são insuficientes para distinguir as espécies, portanto se faz necessário confirmá-las através de métodos moleculares (Plessis *et al.*, 2018). Os autores enfatizam que a diferenciação intraespecífica é mais complexa devido à sobreposição de vários caracteres distintivos, resultando em uma chave muito artificial e subjetiva.

Alexopoulos *et al.* (1996) afirmam que essa complexidade observada advém do conceito morfológico de espécie, que se baseia unicamente nas semelhanças e na descontinuidade dos caracteres. O conceito filogenético de espécie considera as relações genealógicas e evolutivas entre os organismos do grupo.

A identificação dos isolados de *Trichoderma* spp. ocorreu com base na região gênica ITS, e os isolados foram identificados com elevada precisão, assumindo identidades acima de 98,8% de similaridade com as sequências comparadas. Segundo Cai e Druzhinina (2021), uma espécie de *Trichoderma* pode ser identificada se sua sequência ITS atingir pelo menos um valor de similaridade $\geq 76\%$ com as sequências no conjunto de dados comparados. No protocolo desenvolvido pelos autores, após a identificação pelo ITS, as próximas etapas seriam outros dois marcadores de DNA, *tef1* e *rpb2*, que deveriam corresponder a uma semelhança maior ou igual a 97 e 99%, respectivamente, na comparação entre os pares da cepa de consulta e as sequências de cepas de referência. Os isolados do presente trabalho estão sob análise no gene *tef1*.

Os avanços no campo da biologia molecular, principalmente na análise de DNA, aprimoraram a forma como a taxonomia tem sido feita, justificando a realização de aproximações polifásicas em estudos dos diferentes grupos de fungos. Utilizando técnicas de identificação molecular, Hermosa *et al.* (2013) obtiveram bandas entre 560 e 600 pb quando amplificaram regiões ITS para identificar 17 isolados de *Trichoderma* spp., entre os quais estão *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, usado como biocontrole.

Da mesma forma, Filizola *et al.* (2019) identificaram 13 cepas de *Trichoderma* spp., isoladas de sedimentos de manguezal e testadas para o biocontrole de *Fusarium*. Os resultados descritos por esses autores são semelhantes aos

encontrados neste trabalho, onde os primers ITS 1 e ITS 4 amplificaram sequências de aproximadamente 589 e 658 pares de bases para as cepas estudadas do gênero *Trichoderma*.

Mesmo com a amplitude do gênero *Trichoderma* spp., os estudos sobre micoparasitismo foram majoritariamente realizados com apenas algumas espécies, destacando-se *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens* e *T. viride*, (Meyer; Mazaro; Silva, 2019). Neste estudo, diferentes espécies também foram avaliadas quanto ao potencial de antagonismo a *S. sclerotiorum*, como *T. afroharzianum*, *T. hamatum*, *T. peberdyi*, *T. rifaii*, *T. atrobrunneum*, *T. dorotheae* e *T. yunnanense*, *T. pubescens* e *T. caribbaeum*.

A área com maior diversidade de espécies de *Trichoderma* foi a única cultivada, o pivô de feijão, comparado com as outras três que não são cultivadas. Nenhuma das espécies encontradas no pivô de feijão são as que se utilizam para controle de doenças, com cerca de 6 pulverizações por ano, *T. harzianum* e *T. asperellum*. Resultado semelhante foi encontrado por Al-Sadi *et al.* (2015) que obtiveram uma frequência de isolamento de *Trichoderma* de solo cultivado (33%) maior do que de solo não cultivado (20%).

Al-Sadi *et al.* (2015) atribuem a maior diversidade de *Trichoderma* no solo cultivado ao fato de serem adicionados diferentes fontes orgânicas e inorgânicas incluindo turfa, casca de árvore e serragem. Também explicam que as áreas cultivadas não utilizam produtos à base de *Trichoderma*, e que o antagonista pode ter sido introduzido pela compostagem ou ocorrerem de forma natural no solo. Este fato corrobora ao que se é praticado no pivô de feijão deste trabalho, visto que duas a três vezes por ano são adicionados adubos orgânicos, a base de compostagem, pós de rocha e outras fontes naturais, somado a importante questão de ser manejado de forma orgânica sem intervenções químicas que possam agredir os microrganismos benéficos do solo.

O nível alto de diversidade em espécies e isolados de *Trichoderma* podem dar uma indicação sobre a saúde do solo e sua capacidade de contribuir na supressão de doenças transmitidas pelo solo que afetam diferentes culturas. Além disso, a alta diversidade pode tornar possível encontrar e selecionar *Trichoderma* isolados com altas propriedades antagônicas (Al-sadi *et al.*, 2015). O nível de diversidade encontrado no pivô de feijão, resultou nos três isolados que mais se destacaram no

controle de *S. sclerotiorum*, 4 (*T. yunnanense*), seguido dos isolados 13 (*T. pubescens*), 27 (*T. yunnanense*).

Para *T. afroharzianum*, existem trabalhos relatando seu potencial antagônico, como o de Montalvão *et al.* (2023), que isolaram essas espécies de solos cultivados com algodão, apresentando boa capacidade antagonística ao fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* e *Sclerotinia rolfsii*. Os autores concluíram que dois dos isolados, ambos pertencentes à espécie *T. afroharzianum*, apresentaram antagonismo ao patógeno. Em cultura dupla observaram interações antagônicas, tipicamente por competição e hiperparasitismo, e em análises de microscopia verificaram a deformação e penetração nas hifas dos patógenos.

Também há relatos de *T. hamatum*, como no trabalho de Fagundes (2015), no qual a autora isolou nas culturas do feijão e da soja em Minas Gerais cepas de *Trichoderma*, e obteve 48 isolados de 7 espécies diferentes. Entre eles, 31 isolados avaliados inibiram a germinação miceliogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum* de 78 a 100%, sendo 27 de *T. harzianum*, três de *T. hamatum* e um de *T. longibrachiatum*.

A capacidade antagônica varia entre os isolados da mesma espécie, como demonstrado no presente trabalho, onde essa capacidade não foi característica da espécie, e sim de cada isolado. No teste de inibição de escleródios em Gerbox, o isolado 9 causou 100% de inibição e o isolado 6 apenas 60% de inibição dos escleródios, sendo que ambos foram identificados como *T. yunnanense*, originados do pivô de feijão. Isso também foi observado para o isolado 12 com 92% de inibição, o 10 com 41% e o 20 com 0% de inibição, todos pertencentes a *T. atrobrunneum*, e originados do pivô de feijão. O isolado de *Trichoderma* e o patógeno que se deseja controlar, são importante fatores para o resultado do controle exercido por este agente (Benítez *et al.*, 2004). Portanto, isolados diferentes da mesma espécie, podem diferir em eficiência.

Os autores Gajera e Vakharia (2010), avaliaram isolados de *Trichoderma* sp. para controle de *Aspergillus niger*, também observaram diferença do potencial controle dentro da mesma espécie. Dois isolados de *Trichoderma harzianum*, T8 e T9, apresentaram grande diferença no antagonismo *in vitro* a *A. niger*, de 81,6% e 32,1%, respectivamente. Na quantificação da produção de enzimas degradadoras da parede celular, quitinase, β -1,3 glucanase e protease, o isolado T8 apresentou teores significativamente maiores do que o isolado T9. Contudo, esses teores produzidos pelo T8 se assemelharam aos produzidos pelo T6, identificado como *Trichoderma viride*,

único que apresentou maior taxa de antagonismo que o isolado T8, sendo de 86,3%. Concluindo que o potencial de antagonismo pode estar ligado a características específicas de cada isolado e não intrínseco a espécie, como exemplo pode ter relação com a produção de enzimas degradadoras da parede celular.

Os antagonistas para uso comercial devem atender a muitos requisitos diferentes. Critérios importantes além da eficácia patogênica são o tamanho do mercado-alvo, características ecológicas, produção em massa, custos de produção, riscos ambientais e estabilidade em condições de campo. Alguns podem ser definidos como impeditivos, por exemplo, um candidato a antagonista de fungo que produza baixa quantidade de esporos numa placa de ágar será descartado, uma vez que se espera que a produção em massa seja muito dispendiosa ou mesmo impossível (Köhl *et al.*, 2011).

Segundo Guo *et al.* (2019), para *Trichoderma* spp., algumas das características que são atribuídas ao seu sucesso como agente de biocontrole se deve à sua capacidade de multiplicação, vide sua esporulação abundante e crescimento rápido. Nessa perspectiva, os isolados foram submetidos à quantificação da esporulação em placa de Petri, e 4 foram descartados dos testes seguintes por não atingirem o mínimo parametrizado. Os cinco isolados que foram os mais eficientes na esporulação foram, 28 (*Talaromyces purpureogenus*), 7 (*Trichoderma* sp.), 2 (*Trichoderma yunnanense*), 8 (*Trichoderma* sp.) e 27 (*Trichoderma yunnanense*), de forma decrescente, apresentando entre $5,8 \times 10^8$ a $9,7 \times 10^8$ UFC/mL.

Em estudos sobre os fatores envolvidos na esporulação dos fungos, como nutricionais, físicos, biológicos e químicos, não qualificou nenhum padrão geral que atenda aos requerimentos específicos de todos os indivíduos de espécie, podendo ser particular de cada isolado dentro da espécie em questão (Steyart *et al.*, 2010). Os isolados das diferentes áreas do presente estudo, apresentaram padrões diversos na esporulação.

A área de bambuzal foi a que os isolados apresentaram menor esporulação e menor variedade de espécies. Trata-se de uma área com mais de 60 anos sem intervenções, e com uma alta camada de serrapilheira, o que também pode explicar a razão da baixa esporulação, devido à baixa luminosidade. Steyaert *et al.* (2013) explicam que para a esporulação do *Trichoderma* a luz é muito importante e necessária para o início da conidiogênese da maioria das espécies

Na presença dos raios UV ocorre a produção de antroquinonas, responsáveis pela pigmentação esverdeada no gênero *Trichoderma* (Ghisalberti, 2002). Os isolados da área de bambu apresentaram coloração esbranquiçada, e não obtiveram bom desempenho nos testes para controle de *S. sclerotiorum*. Segundo Fernandes *et al.* (2015), microrganismos mais pigmentados podem ser mais competitivos.

Um fator crítico nas epidemias de mofo-branco é a quantidade de escleródios germinados, visto que um único escleródio pode produzir vários apotécios (Bolton *et al.*, 2006), e ao longo de 20 dias cada apotécio libera até $7,6 \times 10^5$ ascósporos (Clarkson *et al.*, 2006). Portanto, uma importante estratégia no manejo da doença, é a destruição dos escleródios no solo, que pode ser realizada pelo emprego dos antagonistas, prevenindo os sintomas em tecidos de plantas (Abdullah *et al.*, 2008).

O teste realizado em Gerbox com os antagonistas isolados, para avaliar o parasitismo dos escleródios, mostrou o potencial que alguns deles apresentam ao inviabilizarem essas estruturas, sendo que 7 isolados apresentaram mais de 91% de escleródios parasitados, e os isolados 13, 36 e 9 resultaram em 100% de parasitismo.

Os dados obtidos nesse trabalho, corroboram com o estudo feito por Silva *et al.* (2022), que trataram escleródios com suspensões de conídios de *T. lentiforme* e *T. asperelloides*, e observaram uma forte inibição da germinação miceliogênica, como resultado da acentuada atividade de micoparasitismo exercida sobre os escleródios, sendo que *T. asperelloides* CMAA 1584 colonizou 100% dos escleródios. O parasitismo sobre *S. sclerotiorum* foi mais eficaz com *T. asperelloides* CMAA 1584, enquanto os efeitos bioestimulantes no crescimento do algodoeiro foram mais pronunciados com *T. lentiforme* CMAA 1585.

As avaliações de parasitismo de escleródios *in vitro*, realizadas neste trabalho, retratam um resultado parecido ao encontrado por Faria *et al.* (2022) ao avaliarem a campo a capacidade de parasitismo de diferentes produtos à base de *Trichoderma*, *Bacillus* e uma mistura de ambos. Esses autores concluíram que a germinação carpogênica foi significativamente menor nos escleródios tratados com os agentes de biocontrole comparados aos não tratados.

No teste de cultura pareada, observou-se uma diferença estatística entre os isolados 4, 46, 1, 13 e 27 e os demais, com maior eficiência na inibição entre 75,7 e 86,1%. Outros autores também avaliaram o controle de *S. sclerotiorum* com diferentes isolados de *Trichoderma* em teste de pareamento. Kumar *et al.* (2021) apresentaram que ao competir por espaço e nutrientes nestes ensaios, *Trichoderma viride* mostrou

atividade antagônica contra o patógeno, apresentando clara zona de inibição nas placas de cultura no quarto dia de interação, indicando mecanismos de antibiose exercidos por *T. viride* sobre o patógeno e uma inibição de crescimento de 67,3% no sexto dia de confronto.

No presente trabalho, observou-se que a eficiência de inibição da germinação miceliogênica teve uma correlação com a eficiência de micoparasitismo: quanto maior a eficiência em micoparasitar, maior a inibição da germinação miceliogênica dos escleródios. O isolado 4 apresentou 97,5% de inibição da germinação dos escleródios, também foi o que apresentou maior controle no teste de pareamento, com 86,1%, e identificado como *T. yunnanense*, com 100% de similaridade com as sequências comparadas no GenBank.

O gênero *Trichoderma* spp. possui alta versatilidade nos modos de ação exercidos: antibiose, hiperparasitismo e competição (Vos *et al.*, 2015). Nas placas de teste de cultura pareada foi observado a inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* bem como a redução na formação dos escleródios. Segundo Oliveira *et al.* (2008), pode-se atribuir a redução de crescimento do patógeno à competição por espaço e por nutrientes no meio de cultura, além da liberação de substâncias tóxicas que causam, pela antibiose, a inibição do crescimento. No hiperparasitismo, o *Trichoderma* consegue detectar e localizar as hifas do fungo hospedeiro, enrola-se a ela para penetrar e digeri-la, na placa de meio de cultura pode-se observar o *Trichoderma* crescendo sobre *S. sclerotiorum*.

Castilho *et al.* (2011) relatam o potencial de um isolado mexicano de *T. yunnanense*, que inibiu em 69,4% o desenvolvimento de *Sclerotinia cepivorum* em testes de cultura pareada. Jiménez *et al.* (2018) observaram que metabólitos secundários obtido de *T. yunnanense* e *T. harzianum* nas concentrações de 50 e 25% mostraram efeito inibidor de 100% do crescimento micelial de *Venturia inaequalis*. Na China, Zhu *et al.* (2024) avaliaram o uso combinado de *T. yunnanense* e *Paenibacillus peoriae*, que culminou no aumento da resistência da planta medicinal Açafrão (*Crocus sativus*) ao ataque de doenças, como *Fusarium oxysporum*. Também foi constatado o efeito como promotor de crescimento em plantas, Karmakar *et al.* (2021) concluíram que o comprimento e o peso da raiz e parte aérea foram maiores em plantas de grão de bico tratadas com *T. yunnanense*, além do potencial antagonista a patógenos como: *Alternaria brassicicola* e *Alternaria solani*.

Os isolados 13 e 36 apresentaram 100% de inibição dos escleródios, ao mesmo tempo que apresentaram 77,3 e 64,4% de controle no teste de pareamento, respectivamente, o isolado 13 foi identificado como *Trichoderma pubescens* e o 36 continua sob análise. Outro isolado que se destacou foi o 46, que apresentou 83,3% de controle dos escleródios, e 83,6% de controle no teste de pareamento, foi identificado como *T. dorotheae*.

O potencial antagônico de *T. dorotheae* foi descrito por Lee *et al.* (2012) revelando fortes efeitos antagônicos contra vários fungos prejudiciais à madeira, os autores ainda descrevem que se tratava de uma espécie de *Trichoderma* recentemente relatada na época. Outra característica descrita é a atividade como agente entomopatogênico, na China, os autores Wu *et al.* (2022), isolaram 640 cepas de fungos, e *T. dorotheae* estava entre os três isolados com maior controle de uma praga-chave da área florestal, a broca da madeira (*Monochamus alternatus*).

Os resultados de Peng *et al.* (2023) mostraram que a fermentação de fungos endofíticos específicos, pode ser uma nova rota promissora para a produção de diacilglicerol (DAG), importante lipídio estrutural utilizado na indústria alimentícia por possuir menos calorias que o triacilglicerol. O *T. dorotheae* foi testado e apresentou grande potencial na capacidade produtiva de DAG.

Reforçando a importância da redução do potencial de inóculo primário dos escleródios, foi quantificado durante o teste de cultura pareada o potencial dos antagonistas inibirem a formação dessas estruturas. Os isolados 4 e 13 impediram 100% a formação, seguidos dos isolados 6, 7, 9 e 16 que apresentaram boa redução dos escleródios formados. Os autores Silva *et al.* (2022) concluíram que em cultura dupla, as cepas de *T. lentiforme* e *T. asperelloides* reduziram a taxa de crescimento e o número de escleródios formados por *S. sclerotiorum*, e que os compostos orgânicos voláteis liberados também reduziram o crescimento micelial do patógeno, em 55% e 53%, respectivamente.

Para aumentar a efetividade do biocontrole e ampliar a diversidade de alvos, há tendência de se aplicar mistura de microrganismos compatíveis (Jain *et al.*, 2012). Segundo Stockwell *et al.* (2011), as formulações compostas por mais organismos podem ser mais eficientes que aquelas com apenas um. Tal fato foi constatado por Kumar *et al.* (2021), onde a inoculação de *T. viride* sozinho ou em combinação com *Trichoderma erinaceum* suprimiu a doença causada por *S. sclerotiorum* em plantas de *Phaseolus vulgaris*. No entanto, a combinação dos dois teve melhores resultados.

Também descobriram que plantas pré-tratadas com *Trichoderma* isolados ou sua combinação reduziram o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas pelo patógeno, aumentando a atividade antioxidante nas plantas. Em vista disso, expõe-se a oportunidade de testar os isolados que sobressaíram no presente estudo, quanto ao potencial antagônico para uso em conjunto.

6 CONCLUSÃO

- É possível reduzir o potencial de inóculo de *S. sclerotiorum* pelo emprego de agentes de controle biológico.
- Mesmo diante do manejo utilizado na área do pivô de feijão foram isoladas diferentes espécies de *Trichoderma*.
- O potencial antagônico dos isolados variou dentro de mesma espécie identificada.
- No teste de pareamento os isolados que se destacaram foram: 4 (*T. yunnanense*), 27 (*T. yunnanense*), 9 (*T. yunnanense*), 44 (*T. hamatum*) e 13 (*T. pubescens*).
- No teste de cultura pareada os melhores isolados foram: 4 (*T. yunnanense*), 46 (*T. dorotheae*), 1 (*T. yunnanense*), 13 (*T. pubescens*) e 27 (*T. yunnanense*).
- Os isolados 4 (*T. yunnanense*) e 13 (*T. pubescens*) foram capazes de inibir 100% a formação de escleródios em teste de cultura pareada.
- O isolado 4 (*T. yunnanense*) se destacou em todos os testes, seguido dos isolados 13 (*T. pubescens*), 27 (*T. yunnanense*) e 44 (*T. hamatum*), mostrando potencial de parasitismo dos escleródios, inibição de crescimento do patógeno, bem como formação de escleródios.
- As espécies *Trichoderma yunnanense* e *Trichoderma dorotheae* foram as mais encontradas em diferentes áreas, apresentando diferentes potenciais de controle.

REFERÊNCIAS

- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, n.8, p.899-903, 1979.
- ABDULLAH, M.T., ALI, N.Y., SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection** 27, p. 1354-1359, 2008.
- ABREU, L. M.; PFENNING, L.H. O gênero *Trichoderma*. In: M.C. MEYER, S.M. MAZARO and J.C. SILVA, eds. **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília: EMBRAPA, pp. 163-179, 2019.
- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p.896-899, 1979.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th Edition. Academic Press. 2005. 952p.
- AL-SADI, A. M.; AL-OWEISI, F. A.; EDWARDS, S. G.; AL-NADABI, H.; AL-FAHDI, A. M. Genetic analysis reveals diversity and genetic relationship among *Trichoderma* isolates from potting media, cultivated soil and uncultivated soil. **Bmc Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2015.
- ALEXOPOULOS C. J.; MIMS C. W.; BLACKWELL M. **Introductory mycology**. New York: Wiley; 1996.
- ALKOORANEE, J.T., ALEDAN, T.R., ALI, A.K., LU, G., ZHANG, X., WU, J., FU, C., LI, M. Detecting the hormonal pathways in oilseed rape behind induced systemic resistance by *Trichoderma harzianum* TH12 to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plos One**, v.12, n.1, p. 1-21, 2017.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. E. V.; HENNING, A. A. Doenças de Soja. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2. p.569-588.
- ALMEIDA, A.M.R.; SEIXAS, C.D.S.S. **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 339p.
- ALONSO-RAMÍREZ, A.; POVEDA, J.; MARTÍN, I.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; NICOLÁS, C. Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 8, p. 823-831, 2014.
- ALVAREZ; F.; CASTRO; M.; PRÍNCIPE; A.; BORIOLI; G.; FISCHER; S.; MORI; G.; JOFRÉ; E. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. **Microbiol**, v. 112, p. 159–174, 2012.

AMORIM, L. Sobrevivência do inóculo. *In*: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Ceres, v.1, p.246-267, 1995.

ANDREWS, J.H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. *In*: WINDELS, C.L.; LINDON, S.E. Biological control on the phylloplane. St. Paul: **The American Phytopathological Society**, 1985. p.31- 44.

ATHANÁZIO, J. C. Adubação de feijão-vagem. *In*: FERREIRA, M. E.; CASTELLANE, P. D.; CRUZ, M. C. P. da. (Ed). Nutrição e adubação de hortaliças. **Piracicaba: POTAFOS**. 487p. 1993.

ATANASOVA, L. Ecophysiology of *Trichoderma* and *Gliocladium* in genome perspective. *In*: GUPTA, V. S.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I., TUOHY, M. (Ed.). Biotechnology and biology of *Trichoderma*. Boston: **Elsevier**, 2014. p. 25-40.

BAE, H.; SICHER, R. C.; KIM, M. S.; KIM, S-H.; STREM, M. D.; MELNICK, R. L.; BAILEY, B. A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, p. 3279-3295, 2009.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.H. Freeman, 1974. 433p

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 110-114, 2012.

BATEMAN, D.F.; BEER, S. V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 55, p. 204-11, 1965.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. *In*: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente- Livro científico (ALICE)**, Brasília, p.1-5, 1991.

BETTIOL, W. Pesquisa, desenvolvimento e inovação com bioinsumos. *In*: MEYER, M. C.; BUENO, A. de F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (ed.). **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília, DF: Embrapa, 2022. p. 21-38.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. *In*: MICHEREFF, S. J., ANDRADE, D.E.G.T.; Menezes, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, p. 125-152, 2005.

BETTIOL, W.; MAFFIA, L. A.; CASTRO, M. L. M. P. Control biológico de enfermidades de plantas en Brasil. *In*: BETTIOL, W.; RIVERA, M. C.; MONDINO, P.;

MONTEALEGRE, J. R.; COLMENÁREZ, Y. C. **Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe**. Montevideu: Facultad de Agronomía, Universidad de la Republica, 2014., p. 91-137.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14

BETTIOL, W.; SILVA, J. C. da; CASTRO, M. L. M. P. de. Uso atual e perspectivas do *Trichoderma* no Brasil. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da. *Trichoderma* uso na agricultura. **Brasília: Embrapa Soja**, p. 21-44, 2019.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Epidemiology of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ontário. **Phytopathology**, v.78, p.1241-1245, 1988.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BUYSENS, C.; CÉSAR, V.; FERRAIS, F.; DE BOULOIS, H. D.; DECLERCK, S. Inoculation of Medicago sativa cover crop with Rhizophagus irregularis and *Trichoderma harzianum* increases the yield of subsequently-grown potato under low nutrient conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 105, p. 137-143, 2016.

CAI, F.; DRUZHININA, I. S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of trichoderma. **Fungal Diversity**, v. 107, n. 1, p. 1-69, 5 fev. 2021.

CARVALHO, D. D.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. Biological control of Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 384-391, 2014.

CARVALHO, M. L. M.; PINHO, E. V.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M. **Manual do amostrador de sementes**. Lavras -MG: Associação Brasileira de Tecnologia de Semente, Comitê de Vigor de Sementes. 2011. 91p.

CASTILLO, F. D. H.; PADILLA, A. M. B.; MORALES, G. G.; SILLER, M. C.; HERRERA, R. R.; GONZALES, C. N. A.; REYES, F. C. In Vitro Antagonist Action of *Trichoderma* Strains Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 410-417, 2011.

CESSNA S. G.; SEARS V. E.; DICKMAN M. B.; LOW P.S. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **Plant Cell**, v. 12, n. 11, p. 2191-200, 2000.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. **Evolution**, v. 67, n. 10, p. 2823-2837, 2013.

- CHEN, L.; YANG, X.; RAZA, W.; LI, J.; LIU, Y.; QIU, M.; ZHANG, F.; SHEN, Q. *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1653-1663, 2011.
- CHEN, X., PIZZATTI, C., BONALDI, M., SARACCHI, M., ERLACHER, A., KUNOVA, A., BERG, G., CORTESI, P. Biological control of lettuce drop and host plant colonization by rhizospheric and endophytic Streptomyces. *Front. Microbiol.* 7, 714, 2016.
- CLARKSON, J. P.; STRAVELEY, J.; PHELPS, K.; YOUNG, C. S.; WHIPPS, J. M. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, p. 213-222, 2003.
- CLARKSON, J.P.; PHELPS, K.; WHIPPS, J.M.; YOUNG, C.S.; SMITH, J.A.; WATLING, M. Forecasting sclerotinia disease on lettuce: Toward developing a prediction model for carpogenic germination of sclerotia. **Phytopathology**, v. 94, p. 268-279, 2004.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **The American Phytopathological Society**, p. 539, 1983.
- COSTA, J. L.; RAVA, C. A Influência da braquiária no manejo de doenças do feijoeiro com origem no solo. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F.; AIDAR, H. (Ed.). **Integração Lavoura-Pecuária**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. p.523-534.
- DA SILVA, L.R., DE MELLO, S.C.M., VALADARES-INGLIS, M.C., DO CARMO COSTA, M.M., DE PASSOS SARAIVA, M.A., REGO, E.C.S., ZACARONI, A.B., MUNIZ, P.H.P.C., PAPPAS, M.D.C.R. Transcriptional responses and reduction in carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* exposed to volatile organic compounds of *Trichoderma azevedoi*. **Biol. Control** 169, 104897, 2022.
- DE FARIA, A. F. *et al.* Seven years of white mold biocontrol product's performance efficacy on *Sclerotinia sclerotiorum* carpogenic germination in Brazil: a meta-analysis. *Biological Control*, p. 105080, 2022.
- DERBYSHIRE, M. C.; AND DENTON-GILES, M. The control of sclerotinia stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. **Plant Pathol.**, v. 65, p. 859–877, 2016.
- DOMÍNGUEZ, S.; RUBIO, M. R.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; NICOLÁS, C.; BETTIOL, W. Nitrogen metabolism and growth enhancement in tomato plants challenged with *Trichoderma harzianum* expressing the *Aspergillus nidulans* acetamidase amdS gene. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1182, 2016.
- DRUZHININA, I. S. *et al.* Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 4, 2018.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749, 2011.

DU PLESSIS I. L.; DRUZHININA I. S.; ATANASOVA L.; YARDEN O.; JACOBS K. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa with five new additions. **Mycologia**. v. 159, p. 1–25, 2018.

ESKER, P.; PELTIER, A.; BRADLEY, C.; CHILVERS, M.; MALVICK, D.; MUELLER, D.; WISE, K. **Management of White mold in soybean**. [S.l.]: North Central Soybean Research Program, 2011.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FAGUNDES, I. R. F. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum***. Dissertação (Mestre em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 35f, 2015.

FANG, H.; LI, C.; ZHAO, J.; ZHAO, C. Biotechnological Advances and Trends in Engineering *Trichoderma reesei* towards Cellulase Hyperproducer. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** v. 26, p. 517–528, 2021.

FAOSTAT. **Crops**. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 19 abr. 2024.

FERNANDES, É. K.; RANGEL, D. E.; BRAGA, G. U.; ROBERTS, D. W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 427-440, 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. **Viçosa: UFV**, 3 ed., p. 421, 2008.

FILIZOLA, P. R. B.; LUNA, M. A. C.; SOUZA, A. F. de; COELHO, I. L.; LARANJEIRA, D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2019.

FLORES, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene prb1. **Current Genetics**, v. 31, n. 1, p. 30-37, 1997.

GAJERA, H.P.; VAKHARIA, D.N. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 3-4, p. 274-282, 2010.

GARCIA, R.A. **Produção de inóculo, efeitos de extratos vegetais e de fungicidas e a reação de genótipos de soja a *Sclerotinia sclerotiorum***. 2008. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

GEBILY, D. A.; GHANEM, G. A.; RAGAB, M. M.; ALI, A. M.; SOLIMAN, N. E. D. K.; EL MOITY, A.; TAWFIK, H. Characterization and potential antifungal activities of three *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary infecting green bean. **Pest Control**, v. 31, p. 1–15, 2021.

GERALDINE, A. M.; LOPES, F. A. C.; CARVALHO, D. D. C.; BARBOSA, E. T.; RODRIGUES, A. R.; BRANDÃO, R. S.; ULHOA, C. J.; JUNIOR, M. L. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of White mold by *Trichoderma* spp. **Biol. Control**, v. 67, p.308–316, 2013.

GHISALBERTI, E. L. Anti-infective agents produced by the Hyphomycetes genera *Trichoderma* and *Gliocladium*. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents**, v. 1, n. 4, p. 343-374, 2002.

GICZEY, G.; KERÉNYI, Z.; FÜLOP, L.; HORNOK, L. Expression of cmg1, an exo- β -1, 3- glucanase gene from *Coniothyrium minitans*, increases during sclerotial parasitism. **Microbiol.** v. 67, p. 865–871, 2001.

GIORGIO, A., DE STRADIS, A., LO CANTORE, P., IACOBELLIS, N.S., 2015. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1056, p. 1-13, 2015.

GODOY, G.; STEADMAN, J. R.; DICKMAN, M. R.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.37, p.179-191,1990.

GONÇALVES, P.R.C.; SANTOS, J.B. dos. Physiological resistance of common bean cultivares and lines to White mold based on oxalic acid reaction. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v.53, p.236-237, 2010.

GORDON, D., ABAJIAN, C. AND GREEN, P. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. **Genome Research**, v. 8, p.195-202, 1998.

GUIMARÃES, R.L.; STOTZ, H.U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, v.136, p.3703-3711, 2004.

GUO, Y.; GHIRARDO, A.; WEBER, B.; SCHNITZLER, J.; BENZ, J. P.; ROSENKRANZ, M. *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza laccaria bicolor. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, p. 1-15, 2019.

HARIKRISHNAN, R.; DEL RIO, L.E. Influence of temperature relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers White mold development. **Plant Disease**, v.90, p.946-950, 2006.

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

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43, 2004.

HERMOSA M. R.; KECK E.; CHAMORRO I.; RUBIO B.; SANZ L.; VIZCAINO J. A.; et al. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. **Mycological Research**, v. 108, p. 897 – 906, 2004.

HERMOSA M. R.; KECK E.; CHAMORRO I.; RUBIO B.; SANZ L.; VIZCAINO J.A.; et al. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. **Mycological Research**, v. 108, p. 897–906, 2013.

JAIN, A.; SINGH, A.; SINGH, S.; SINGH, H.B. Biological management of *Sclerotinia sclerotiorum* in pea using plant growth promoting microbial consortium. **J. Basic Microbiol.** v. 55, p. 961–972, 2015.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. **Fungal Diversity**, v. 48, n. 1, p. 1-250, 2011.

JIMENEZ M. D. C. M.; HERNÁNDEZ F. D.; ALCALÁ E. I. L.; MORALES G. G.; VALDÉS R. A.; REYES F. C. Biological effectiveness of *Bacillus* spp. spp. and *Trichoderma* spp. on apple scab (*Venturia inaequalis*) in vitro and under field conditions. **European Journal of Physical and Agricultural Sciences**, v. 6, n. 2, p. 7-17, 2018.

JONES, E.E., RABEENDRAN, N., STEWART, A. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of cabbage by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* spp. **Biocontrol Sci.** v. 24, p. 1363–1382, 2014

KARMAKAR, P.; SENGUPTA, K.; DAS, P.; BHATTACHARYA, S. G.; SAHA, A. K. Biocontrol and plant growth promoting potential of *Trichoderma yunnanense*. **Vegetos**, v. 34, n. 4, p. 928-936, 2021.

KÖHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P.; RUOCCO, M.; BLUM, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, v. 57, n. 1, p. 1–12, 2011.

KORA, C.; McDONALD, M.R.; BOLAND, G.J. Sclerotinia rot of carrot: na example of phenological adaptation and bicyclic development by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.87, p.456-470, 2003.

KREYCI, P.K.; MENTEN, J.O. Limitadoras de produtividade. **Technical Report**, São Paulo, v.167, 2013.

KRUGNER, T.L.; BACHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, cap.19, p. 46-95, 1995.

KUBICEK, C.P. *et al.* Comparative Genome Sequence Analysis Underscores Mycoparasitism as the Ancestral Life Style of *Trichoderma*. **Genome Biol.** 2011, 12, R40.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, v. 69, p. 887-890, 1979.

LEE, J.; HUH, N.; HONG, J. H.; KIM, B. S.; KIM, G.; KIM, J. The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. **Holzforschung**, v. 66, n. 7, p. 883-887, 2012.

LEHNER, M.S.; PETHYBRIDGE, S.J.; MEYER, M.C.; DEL PONTE, E.M. Meta-analytic modelling of the incidence yield and incidence sclerotial production relationships in soybean white mould epidemics. **Plant Pathology**, Oxford, 2016.

LEITE, R.M.V.B.C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: Embrapa Soja, 3p, 2005.

LI, R. X.; CAI, F.; PANG, G.; SHEN, Q. R.; LI, R.; CHEN, W. Solubilization of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-16, 2015.

LIMA, I. A. **Mapeamento associativo para reação do feijoeiro ao mofo branco**. 2014.

LIU, D.; YAN, R.; FU, Y.; WANG, X.; ZHANG, J.; XIANG, W. Antifungal, plant growthpromoting, and genomic properties of an endophytic actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. **Front. Microbiol.** v. 10, 2019.

LOBO JÚNIOR, M. *et al.* Uso de *Trichoderma* na cultura do feijão-comum. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da. ***Trichoderma: uso na agricultura***. Brasília: Embrapa, p. 393-406, 2019.

MARKETS AND MARKETS. Biopesticides market by type, source, mode of application, formulation, crop application and region: global forecast to 2023. Charing: **REPORT BUYER**, 2019.

MARTÍNEZ-MEDINA, A., VAN WEES, S. C. M. & PIETERSE, C. M. J. Airborne signals from *Trichoderma harzianum* stimulate iron uptake responses in roots

resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. **Plant Cell Environ.**, v. 40, p. 2691–21705, 2017.

MARTÍNEZ-MEDINA, A.; FERNÁNDEZ, I.; SÁNCHEZ-GUZMÁN, M. J.; JUNG, S. C.; PASCUAL, J. A.; POZO, M. J. Deciphering the hormonal signaling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, article 206, 2013.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 9, p. 1264-1271, 2012.

MASUNAKA, A.; HYAKUMACHI, M.; TAKENAKA, S. Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningii* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicas*. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 2, p. 128-134, 2011.

MAZARO, S. M.; SILVA, J. C.; MEYER, M. C.; BUENO, A. F. Desafios na adoção de bioinsumos. In: MEYER, M. C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. Bioinsumos na cultura da soja. **Brasília: Embrapa Soja**, p. 75-84, 2022.

MCQUILKEN M. P.; CHALTON D. Potential for biocontrol of sclerotinia rot of carrot with foliar sprays of Contans WG (*Coniothyrium minitans*). **Biocontrol Sci. Technol.**, v. 19, p. 229–235, 2009.

MCQUILKEN, M.P., GEMMELL, J., HILL, R.A., WHIPPS, J.M. Production of macrophelide A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, p. 27–31, 2003.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; DE BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J. H. M.; PICENO, Y. M.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; BAKKER, P. A.; RAAIJMAKERS, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science** v.332, p.1097–1100, 2011.

MENDOZA-MENDOZA, A.; ZAID, R.; LAWRY, R.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; HORWITZ, B.; MUKHERJEE, P. K. Molecular dialogue between *Trichoderma* and roots. Role of the fungal secretome. **Fungal Biology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 62-85, 2018.

MENEZES J. P.; LUPATINI M.; ANTONIOLLI Z. I.; BLUME E.; JUNGES E.; MANZONI C. G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência Agrotecnologia**. v. 34, n. 1, p. 132–139, 2010.

MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, p. 321, 1995.

MENTEN, J. O. M.; MORAES, M. H. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV; p.333-374, 2005.

MENTEN, J. O. M.; PARADELA, A. L.; GALLI, M. A.; GONELLA, L. G. R. Eficiência *in vitro* de diversos fungicidas sobre *Sclerotinia sclerotiorum* do feijoeiro. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 28, 1995, Ilhéus. **Resumos**, Ilhéus: Sociedade Brasileira Fitopatologia, 1995, p.320.

MEYER, S. M.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura Brasília**: EMBRAPA, 2019.

MONTALVÃO, S. C. L.; MARQUES, E.; MARTINS, I.; DA SILVA, J. P.; DE MELLO, S. C. M. Suppression of the phytopathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. **Biologia**, v. 78, n. 10, p. 2941-2952, 2023.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2001.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R.; 2019. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: M.C. MEYER, S.M. MAZARO and J.C. SILVA, eds. **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília: EMBRAPA, pp. 163-179.

MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; NICOLÁS, C.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; MONTE, E. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 11, p. 1506-1513, 2008.

MORÁN-DIEZ, E.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; MONTE, E.; HERMOSA, R. TvDim1 of *Trichoderma virens* is involved in redox-processes and confers resistance to oxidative stresses. *Current Genetics*, v. 56, n. 1, p. 63-73, 2010.

MORÁN-DIEZ, E.; RUBIO, B.; DOMÍNGUEZ, S.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; NICOLÁS, C. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 6, p. 614-620, 2012.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 35-45, 2012.

NAHER, L.; YUSUF, U.K.; ISMAIL, A.; HOSSAIN, K. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agente for sustainable management of plant diseases. **Pak. J. Bot**, v. 46, p. 1489–1493, 2014.

NAPOLEÃO, R.; NASSER, L.; LOPES, C.; CAFÉ FILHO, A. Neon-S, a new medium for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in seeds = Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 180-182, 2006.

NAPOLEÃO, R.L. **Efeito do sistema de plantio, da irrigação e do espaçamento sobre o mofo-branco do feijoeiro, causado por *Sclerotinia sclerotiorum***. 2001. 70p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - UNB, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2001.

NUNES, J. F. **Estudo da interação entre *Trichoderma harzianum* e *Phaseolus vulgaris* utilizando a técnica de transformação aleatória por *Agrobacterium tumefaciens* (AMT)**. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

O'SULLIVAN, Cathryn A.; BELT, Katharina; THATCHER, Louise F. Tackling Control of a Cosmopolitan Phytopathogen: *Sclerotinia*. **Frontiers In Plant Science**, v. 12, p. 1-18, 2021.

OLIVEIRA, T. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. Avaliação da atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Comunicado Técnico**, Brasília, DF, n. 177, 2008.

PARK, S.J. Response of bush and upright plant type selections to white mold and seed yield of common beans grown in various row widths in Southern Ontario. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 73, n. 1, p. 265-272, 1993.

PARTRIDGE, D.E., SUTTON, T.B., JORDAN, D.L. Effect of Environmental Factors and Pesticides on Mycoparasitism of *Sclerotinia minor* by *Coniothyrium minitans*. **Plant Disease**, v. 90, p. 1407-1412, 2006.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; LOBO JÚNIOR, M.; MORANDI, M. A. B.; CARNEIRO, J. E. S. Mofo-Branco. In: PRIA, M.D.; SILVA, O.C. **Cultura do Feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: UEPG, 2010. p.101-299.

PAULITZ, T., SCHROEDER, K., AND BEARD, T. L. *Sclerotinia* stem rot or White mold of canola. **Washington State University Extension**, p. 1-6, 2015.

PELTIER, A.J.; BRADLEY, C.A.; CHILVERS, M.I.; MALVICK, D.K.; MUELLER, D. S.; WISE, K.A.; ESKER, P.D. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, Annapolis, v. 3, n. 2, p. B1-B7, 2012.

PIETERSE, C. M.; LEÓN-REYES, A.; ENT, S. V. D.; WEES, S. C. VAN. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 308-316, 2009.

PIETERSE, C. M.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R. L.; WELLER, D. M.; WEES, S. C. van; BAKKER, P. A. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 347-375, 2014.

RAAIJMAKERS, Jos M.; MAZZOLA, Mark. Soil immune responses. **Science**, v. 352, n. 6292, p. 1392-1393, 2016.

RAAIJMAKERS, J.M., PAULITZ, T.C., STEINBERG, C., ALABOUVETTE, C., MOËNNE LOCCOZ, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, p. 341–361, 2009.

RAMADA, M. H. S.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J. *Trichoderma*: metabólitos secundários. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA J.C. **Trichoderma**: uso na agricultura. Brasília: EMBRAPA, p. 163-179, 2019.

REIS, E.; FORCELINI, C.A. Controle cultural. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. p. 710-716.

RODRIGUEZ, M.A., CABRERA, G., GODEAS, A., 2006. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. **J. Appl. Microbiol.** v. 100, p. 575–586, 2006.

RODRIGUEZ, M.A., CABRERA, G., GOZZO, F., EBERLIN, M., GODEAS, A. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. **J. Appl. Microbiol.** v. 110, p.1177–1186, 2011.

RUBIO, M. B.; QUIJADA, N. M.; PÉREZ, E.; DOMÍNGUEZ, S.; MONTE, E.; HERMOSA, R. Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1864-1873, 2014.

SABATÉ, D.C.; BRANDAN, C.P.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M.C. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. **Microbiol. Res.** V. 211, p. 21–30, 2018.

SACCÁ, A. R. Algumas moléstias cryptogâmicas do tabaco. **Boletim Agrônômico**, São Paulo, v.23, p.201-268, 1922.

SAITO, I. Studies on the maturation and germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a causal fungus of bean stem rot. **Report of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Stations**, v.26, p.1-106, 1977.

SAVCHUK, S., FERNANDO, W.G.D. Effect of timing of application and population dynamics on the degree of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by bacterial antagonists. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 49, p. 379–388, 2004.

SCHWARTZ, H.F.; CASCIAO, D.H.; ASENDA, J.A.; WOOD, D.R. Measurement of white mold effects upon dry beans with genetic resistance or upright plant architecture. **Crop Science**, v. 27, p.699–702, 1987.

SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 68, p. 383-388, 1978.

SEGARRA, G.; CASANOVA, E.; BELLIDO, D.; ODENA, M. A.; OLIVEIRA, E.; TRILLAS, I. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants

inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. **Proteomics**, v. 7, n. 21, p. 3943-3952, 2007.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 21-43, 2010.

SILVA, G. R. **Seleção de genitores e mapeamento associativo da resistência fisiológica ao mofo branco e da tolerância ao estresse hídrico em feijão comum**. 2021. 134 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Agronomia, Unemat, Cáceres, 2021.

SMOLINSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 1–12, 2018.

SOULE M.; PORTER L.; MEDINA J.; SANTANA G.P.; BLAIR M.W.; MIKLAS P. N. Comparative QTL map for white mold resistance in common bean, and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and I9365-3. **Crop Science**, v. 51, p. 123–139, 2011.

SOUZA, R.D., AMBROSINI, A., PASSAGLIA, L.M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genet. Mol. Biol.**, v. 38, p. 401-419, 2015.

STEADMAN, J.R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, n.1, p. 904-907, 1979.

STEADMAN, J.R. White mold - a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, v. 67, p. 346-350, 1983.

STEYART, J. M.; WELS, R. J.; STEWART, A. Isolate-specific conidiation in *Trichoderma* in response to different nitrogen sources. **Fungal Biology**, n. 114, p. 179- 188, 2010.

STEYAERT, J. M.; WELD, R. J.; MENDOZA, A.; KRYŠTOFOVÁ, S.; ŠIMKOVIC, M.; VARECĀKA, L.; STEWART, A. Asexual development in *Trichoderma*: from conidia to chlamydospores. In: MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; SINGH, U. S.; MUKHERJEE, M.; SCHMOLL, M. (Eds.). **Trichoderma: biology and applications**. [S. l.]: CAB International, p. 87-109. 2013.

SUN, Z.B.; SUN, M.H.; ZHOU, M.; LI, S. D. Transformation of the endochitinase gene Chi67-1 in *Clonostachys rosea* 67–1 increases its biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **AMB Express**, v. 7, p. 1–9, 2017.

TIJERINO, A.; HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; MORAGA, J.; MALMIERCA, M. G.; ALEU, J.; COLLADO, I. G.; MONTE, E.; GUTIÉRREZ, S. Overexpression of the *Trichoderma brevicompactum* tri5 gene: effect on the expression of the trichodermin biosynthetic genes and on tomato seedlings. **Toxins**, v. 3, n. 9, p. 1220-1232, 2011.

TSAPIKOUNIS, F.A.; IPSILANDIS, C.G.; GREVENIOTIS, V. Studies on the infection and parasitism course of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by three different mycoparasites. **J. Plant Dis. Prot.**, v. 126, p. 225–235, 2019.

TU, J. C. Management of white mold of white beans in Ontario. **Plant Disease**, v.73, p.281-285, 1989.

VAN KAN J. A. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends Plant Sci**, v. 11, n. 5, p. 247-53, 2006.

VARGAS, W. A.; MANDAWA, J. C.; KENERLEY, C. M. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiology*, v. 151, n. 2, p. 792-808, 2009.

VASCONCELLOS, R. C.; ORAGUZIE, O. B.; SOLER, A.; ARKWAZEE, H.; MYERS, J. R.; FERREIRA, J. J.; SONG, Q.; MCCLEAN, P.; MIKLAS, P. N. Meta-QTL for resistance to white mold in common bean. *PLoS One*, 12: 2017.

VASCONCELLOS, R. C.; ORAGUZIE, O. B.; SOLER, A.; ARKWAZEE, H.; MYERS, J. R.; FERREIRA, J. J.; SONG, Q.; MCCLEAN, P.; MIKLAS, P. N. Meta-QTL for resistance to white mold in common bean. *PLoS One*, 12: 2017.

VENETTE, J. *Sclerotinia* spore formation, transport, and infection. In: *Sclerotinia* Workshop, 1998, Fargo North Dakota. **Proceedings**. Fargo North Dakota: North Dakota State University, 1998. p.4-7.

VIEIRA, R. F. Introdução à quimigação. In: COSTA, E.F.; VIEIRA, R.F.; VIANA, P.A. (Ed.). **Quimigação**: aplicação de produtos químicos e biológicos via irrigação. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. p.13-40.

VIEIRA, R. F.; JÚNIOR, T. J. P.; PERES, P. A.; MACHADO, J. C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 770-773, 2001.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K. Beneficial Effects of *Trichoderma* Secondary Metabolites on Crops. **Phytother. Res.**, v. 34, p. 2835–2842, 2020.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; BARBETTI, M. J.; LI, H.; WOO, S. L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 80-86, 2008.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; RUOCCO, M.; WOOD, S.; LORITO, M. *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 11, p. 1545-1550, 2012.

VITERBO, A.; HORWITZ, B.A. Mycoparasitism. In: BORKOVICH, K.A., EBBOLE, D.J. **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**. Washington: USA, 2010, p. 676–693.

VOS, C. M. F.; DE CREMER, K.; CAMMUE, B. P. A.; DE CONINCK, B. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 4, p. 400-412, 2015.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylo-genetics. *In*: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J.; **PCR Protocols: a guide to methods and applica-tions**. San Diego: Academic Press. p. 315-322, 1990.

WILLBUR, J.; MCCAGHEY, M.; KABBAGE, M.; SMITH, D. L. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 3–11, 2019.

WOO, S. L.; LORITO, M. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. *In*: VURRO, M.; GRESSEL, J. **Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management**. Amsterdam: IOS: Springer Press, 2007. p. 107-130.

WOO, S. L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; LORITO, M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014.

WOO, S. L.; HERMOSA, R.; LORITO, M.; MONTE, E. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco sustainable agriculture. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 312-326, 2023.

WOOD, R.K.S.; TVEIT, M. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. **The Botanical Review**, v. 21, p. 441-492, 1955.

XU, W.; BI, H.; PENG, H.; YANG, L.; HE, H.; FU, G.; LIU, Y.; WAN, Y. Fermentative Production of Diacylglycerol by Endophytic Fungi Screened from *Taxus chinensis* var. mairei. **Foods**, v. 12, n. 2, p. 399, 2023.

YANG, M.; ZHANG, W.; LV, Z.; SHI, L.; ZHANG, K.; GE, B. Induced defense response in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum* using wuyiencin from *Streptomyces albulus* CK-15. **Plant Dis.**, v. 107, p. 107–115, 2023.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v. 235, n. 2, p. 235-242, 2001.

ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X.; LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 100, p. 64–74, 2016.

Zhang, Q.; Zhang, J.; Yang, L.; Zhang, L.; Jiang, D.; Chen, W.; Li, G. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. **Biol. Control**, v. 72, p. 98–108, 2014.

ZHU, Y.; ZHANG, J.; GAO, X.; SHEN, Y.; QIN, L.; ZHU, B. Metabolites from a co-culture of *Trichoderma yunnanense* and *Paenibacillus peoriae* improve resistance to corn rot disease in *Crocus sativus*. **Industrial Crops and Products**, v. 213, p. 118-465, 2024.

ZOCAL, L. R. S. *et al.* Identificação de fontes de resistência do feijão comum ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. **Peer Review**, v. 5, n. 7, p. 101-120, 2023.