



Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação –
Instituto de Biociências - INBIO
Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul

**Controle Biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) De Bary e
Indução de Crescimento de Feijão por Cepas de *Trichoderma*
spp. Isoladas de Plantas e Ambiente do Cerrado e Pantanal**

Clarice Rossato Marchetti

Controle Biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) De Bary e Indução de Crescimento de Feijão por Cepas de *Trichoderma* spp. Isoladas de Plantas e Ambiente do Cerrado e Pantanal

Clarice Rossato Marchetti

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ecologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Dra. Maria Rita Marques
Co-orientador: Dr. José Cirano Ulhôa



Campo Grande
Agosto 2021

BANCA AVALIADORA

Prof. Dr^a. Denise Brentan da Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências.

Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências.

Prof. Dr. Fábio de Oliveira Roque
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências.

Prof. Dr. Itamar Soares Melo
Embrapa Meio Ambiente (CNPMA)

Prof. Dr. José Renato Stangarlin
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr^a. Maria Rita Marques
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências.

À Deus meu refúgio e minha fortaleza.
Vou escrevendo uma página da minha
vida por vez. Lutas, oportunidades,
esperança, sonhos, muitos sonhos ...

AGRADECIMENTOS

À prof. Dra. Maria Rita Marques, pelos ensinamentos, compreensão e amizade. Tive a oportunidade de tê-la como orientadora de Iniciação Científica, Trabalho de Conclusão de Curso, Mestrado e Doutorado. Obrigada!

Ao professor José Cirano Ulhoa por fornecer os substratos para os testes enzimáticos e pela disponibilidade durante a padronização dos testes iniciais no laboratório da UCDB.

A professora Bianca Obes Corrêa por ceder as sementes de feijão e três fitopatógenos.

Aos professores do setor de Bioquímica do INBIO pelo apoio no percurso do doutorado.

Ao professor visitante Jean Pierre Oses, pelo apoio nos preparativos para a qualificação.

Às professoras Giovana Cristina Giannesi, Fabiana Fonseca Zanoelo e Rosani Arruda pela contribuição ao meu trabalho, cujas publicações possibilitaram minha qualificação.

Aos professores do PPGEC, por seus ensinamentos durante o curso.

Aos professores membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para avaliação desta tese.

Ao colega de curso Carlos Eduardo Weirich pela sua amizade e contribuições ao longo desta trajetória.

Ao professor Dênis Pires de Lima por disponibilizar o equipamento CG/EM, para análises.

Ao Arthur Ladeira Macedo (pós Doc) por toda a acessoria na utilização do equipamento CG/EM e elucidação parcial dos metabólitos voláteis.

Aos professores do setor de Biologia Geral pelas conversas descontraídas. Em especial à professora Yvelise Maria Possiede.

Ao Rodenir Magalhães pelo companheirismo, durante a jornada de trabalho e a todos os colegas do INBIO.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos do INBIO, pelos empréstimos de equipamentos, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

À FUNDECT pelo apoio financeiro para pesquisa, para aquisição de equipamentos e material de consumo destinados a este projeto.

Ao inestimável apoio da minha família.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC – Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	15
Visão Ecológica – Holobioma.....	16
Interações Fungo-Planta	18
Parasitismo	20
Controle Biológico	22
<i>Trichoderma</i> spp.....	23
Plantas do Pantanal e Cerrado de Mato Grosso do Sul	26
JUSTIFICATIVA	27
OBJETIVOS	29
<i>Objetivo Geral</i>	29
<i>Objetivos Específicos</i>	29
MATERIAL E MÉTODOS	29
Material biológico	29
Fitopatógenos e sementes de feijão	31
Locais de coletas.....	32
Cultivo dos fungos.....	33
Teste de antagonismo em confrontação direta	33
Teste de antagonismo em confrontação indireta	34
Produção e determinação da atividade de hidrolases de parede celular de cepas de <i>Trichoderma</i> spp	35
a.Produção de parede celular de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> para ensaios de atividade de enzimas degradadoras de parede celular	35
b.Determinação do conteúdo de Proteína Total.....	36
c.Atividade de β -1,3-glucanase	36
d. N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase)	37
e. Atividade de protease.....	37
f. Atividade da fosfatase ácida.....	37

g. Atividade da quitinase	38
Testes para obtenção dos índices da severidade da doença causada por <i>S.sclerotiorum</i> em plantas de feijão cultivadas em solo contendo esporos de <i>Trichoderma</i> spp.	38
a. Cultivo das cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	38
b. Obtenção de solução de conídios de <i>Trichoderma</i> spp.	39
-Teste com aspersão de suspensão de micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> nas folhas de plantas de feijão crescidas em solo inoculado com cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	39
a. Preparo do solo e cultivo de feijão.....	39
b. Preparo e obtenção da suspensão de micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	40
c. Aspersão da suspensão de micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	40
d. Avaliação do índice de severidade da doença causada por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	40
-Teste com inoculação de micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no solo com plantas de feijão, crescidas em solo inoculado com cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	41
a. Preparo do solo	41
b. Preparo e obtenção de micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	41
c. Cultivo de feijão com o fitopatógeno nos vasos	41
d. Avaliação do índice de severidade da doença causada por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	42
Reisolamento de <i>Trichoderma</i> sp de plantas de feijão após o teste com inóculo de micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no solo	42
Teste de hiperparasitismo	43
Teste da viabilidade dos escleródios	44
Teste de promoção de crescimento de plantas de feijão	44
a. Preparo da solução de conídios.....	44
b. Preparo do solo	45
Análise de metabólitos voláteis de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)	45
RESULTADOS	46
Teste de antagonismo em confrontação direta das cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	46
Teste de antagonismo em confrontação indireta e avaliação do efeito de metabólitos voláteis das cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	54
Deteção e medida da atividade de enzimas degradadoras de parede celular produzidas por cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	57
Promoção do crescimento e severidade da doença mofo branco em plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) tratadas com esporos e micélios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>. ..	61

a. Plantas de feijão nebulizadas com solução de esporos de <i>S. sclerotiorum</i>	61
- Índice de severidade da doença em plantas de feijão nebulizadas com solução de micélio de <i>S. sclerotiorum</i>	66
b. Plantas de feijão cultivadas em solo contendo micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	69
- Índice da severidade da doença em plantas de feijão cultivadas em solo inoculado com micélio de <i>S. sclerotiorum</i>	73
Reisolamento das cepas de <i>Trichoderma</i> sp utilizadas nos tratamentos de plantas de feijão após o teste do inóculo de micélio de <i>S. sclerotiorum</i> no solo	77
Avaliação do hiperparasitismo e viabilidade dos escleródios	81
Promoção de crescimento em plantas de feijão utilizando cepas de <i>Trichoderma</i> spp. na ausência de fungos fitopatogênicos	84
Análise de metabólitos secundários de cepas de <i>Trichoderma</i> sp por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	93
DISCUSSÃO	95
Potencial das cepas de <i>Trichoderma</i> spp. na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos	95
Atividade de enzimas degradadoras de parede celular produzidas por cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	101
Promoção do crescimento e severidade da doença em plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) tratadas com micélios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....	1022
- Plantas de feijão nebulizadas com solução de micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1023
- Plantas de feijão cultivadas em solo contendo micélio de <i>S. sclerotiorum</i> e cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	1044
Reisolamento das cepas de <i>Trichoderma</i> sp utilizadas nos tratamentos de plantas de feijão após o teste do inóculo de micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no solo	1066
Teste de hiperparasitismo e viabilidade dos escleródios	1078
Promoção de crescimento em plantas de feijão utilizando cepas de <i>Trichoderma</i> sp na ausência de fungos fitopatogênicos	107
Análise de metabólitos secundários de cepas de <i>Trichoderma</i> sp por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)	1100
CONCLUSÕES.....	Erro! Indicador não definido.2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O mapa mostra a localização espacial dos pontos de coletas de material vegetal ou solo

Figura 2: Exemplo de um teste de antagonismo em confrontação direta. Em (a) placa o controle contendo somente o fungo fitopatogênico (*Sclerotinia sclerotiorum*) após 120 horas de cultivo. Em (b), o fungo fitopatogênico co-cultivado com *Trichoderma* sp, após 120 de incubação.

Figura 3: Produção de parede celular de *S. sclerotiorum*. Inóculo, filtragem do fungo e produto final após autoclavagem, liofilização e maceração

Figura 4: Cultivo das cepas de *Trichoderma* em frascos de vidro contendo arroz autoclavado após sete dias

Figura 5. Sequência da assepsia das plantas e abaixa pequenos fragmentos das plantas depositados sobre o meio de cultura BDA

Figura 6. Preparo da solução de esporos, caixas contendo escleródios de *S. sclerotiorum* e pulverização de *Trichoderma* sp e 15 dias após a incubação

Figura 7. Resultado do teste de antagonismo com 57 cepas de *Trichoderma* sp em confrontação direta com *S. sclerotiorum* após 120 horas de cultivo

Figura 8. Produção de escleródios (pontos escuros) do fitopatogênico (*S. sclerotiorum*) nas placas de pareamento de confrontação direta com as cepas de *Trichoderma* sp T₁, T₂₅ e T₅₅

Figura 9. (A) *Trichoderma* sp (T₅₇) parasitando hifas de *S. sclerotiorum* e (B) Hifas de *S. sclerotiorum*

Figura 10: Porcentagem de crescimento de *S. sclerotiorum* em relação ao controle, durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas, no teste de confrontação direta, com as 57 cepas de *Trichoderma* spp

Figura 11. Resultados do antagonismo em confrontação direta e das placas controle dos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* sp e *Rhizoctonia solani*, após 120 horas de cultivo.

Figura 12. (A) Placas do teste de antagonismo em confrontação direta de *Trichoderma* spp. e (B) placas controles dos fitopatógenos *M. phaseolina*, *Fusarium* sp e *R. solani*

Figura 13. (A) Placa do teste de confrontação direta (T_{51} x *R. solani*) e (B) seu reverso mostrando a produção de pigmento laranja, com uma zona de coloração mais intensa

Figura 14. Porcentagem de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* de 57 cepas de *Trichoderma* sp após 120 horas de cultivo, nos testes de produção de metabólitos voláteis, com placas pareadas.

Figura 15. Placas do teste de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* através da produção de metabólitos voláteis por cepas de *Trichoderma* spp.

Figura 16. Atividade específica (em $U.mg^{-1}$ de proteína) das enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs) das 57 cepas de *Trichoderma*

Figuras 17. Perfil da atividade específica (em $U.mg^{-1}$ de proteína) das enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs) das 57 cepas de *Trichoderma* spp.

Figura 18: Peso fresco e peso seco (média dos valores) das plantas de feijão tratadas com cepas de *Trichoderma* sp e aspersão de micélio de *S. sclerotiorum*.

Figura 19. Médias (cm) do comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total e área foliar (cm²) das plantas de feijão tratadas com cepas de *Trichoderma* sp e aspersão de micélio de *S. Sclerotiorum*.

Figura 20. Índice da severidade da doença após aspersão de *S. sclerotiorum* nas folhas.

Figura 21. Aspectos foliares dos tratamentos em plantas de feijão nebulizadas com solução de micélio de *S. sclerotiorum*. C: controle (ausência do fitopatógeno).

Figura 22. Média dos valores de peso fresco e peso seco das plantas de feijão cultivadas em solo inoculado com micélio de *S. sclerotiorum* e com cepas de *Trichoderma* spp.

Figura 23. Médias (cm) do comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total e área foliar (cm²) das plantas de feijão tratadas com cepas de *Trichoderma* sp e fragmentos de micélio de *S. Sclerotiorum* no solo.

Figura 24. Folhas ao final do experimento tratadas com cepas de *Trichoderma* e fragmentos de micélio de *S. sclerotiorum*.

Figura 25. Índice da severidade da doença após adição de micélio de *S. sclerotiorum* no solo.

Figura 26. Plantas de feijão do Controle - ausência de *Trichoderma* sp e fitopatógeno e plantas de feijão ao final do experimento tratadas com a cepa T₂₅ e fragmentos de micélio de *S. sclerotiorum* no solo

Figura 27. Tratamento com a cepa T₄₆/ Ss e escleródios geminando em diferentes partes das plantas e Tratamento com Ss.

Figura 28: (A) Placas contendo fragmentos de plantas de feijão tratadas com as cepas de *Trichoderma* sp selecionadas: T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇. (B)

Placas com fragmentos de plantas de feijão contendo as cepas re-isoladas de *Trichoderma* spp. T₂₅, T₂₇, T₅₁ e T₅₇.

Figura 29. Características culturais de T₂₅, T₂₇, T₅₁ e T₅₇ isoladas de *A. grazielae* e das cepas isoladas das plantas de feijão.

Figura 30. Características microscópicas das cepas T₂₅ e T₂₇ e dos re-isolados das plantas de feijão submetidas aos tratamentos.

Figura 31. Caixa com 10 escleródios de *S. Sclerotiorum* após 15 dias de incubação com cepas de *Trichoderma* spp.

Figura 32. Média dos valores de peso fresco e seco obtidos no teste de promoção de crescimento com as cepas de *Trichoderma* sp. Controle (ausência de *Trichoderma* sp).

Figura 33. Parâmetros analisados nos testes de promoção de crescimento de plantas de feijão tratadas com cepas de *Trichoderma* spp. Comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total da planta em cm e média da área foliar em cm². O controle compreende plantas não tratadas com *Trichoderma* sp.

Figura 34. Análise de componentes principais (PCA) para os parâmetros avaliados em plantas de feijão - peso fresco (g), peso seco (g), comprimento do caule (cm), comprimento da raiz (cm), comprimento total (cm) e área foliar (cm²) nos testes de promoção de crescimento com substrato inoculado com oito cepas de *Trichoderma* sp (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇), após 15 dias do plantio.

Figura 35a. Plantas de feijão no último dia do experimento, tratadas com as cepas T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇ e o controle (sem *Trichoderma* sp).

Figura 35b. Plantas de feijão no último dia do experimento, tratadas com as cepas T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇ e o controle (sem *Trichoderma* sp).

Figura 36: Detalhes das plantas de feijão e suas raízes dos tratamentos T₂₇ e T₅₇.

Figura 37: Análises de metabólitos voláteis das cepas de T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆ por CG/EM nos testes de inibição de crescimento de *S. sclerotiorum* pelo método de placas pareadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ano de coleta, número de identificação dos *Trichoderma* spp. isolados de folha, raiz, casca do caule e solo de diferentes regiões do estado de Mato Grosso do Sul

Tabela 2: Escala de notas segundo Bell et al. (1982) e as porcentagens de inibição correspondentes

Tabela 3: Notas atribuídas à severidade da doença em plantas tratadas com *S. sclerotiorum* segundo Napoleão et al (2005).

Tabela 4. Porcentagem de inibição de crescimento de *S. sclerotiorum* 120 horas após a inoculação em placas contendo meio de cultura BDA das 57 cepas do gênero *Trichoderma* spp. nos testes de confrontação direta.

Tabela 5. Média das porcentagens de inibição do crescimento de *S. Sclerotiorum*, nos ensaios de produção de metabólitos voláteis produzidos por 57 cepas de *Trichoderma* spp. após 120 horas de incubação com placas pareadas

Tabela 6. Peso fresco, peso seco, comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total e área foliar no teste de promoção de crescimento em plantas de feijão, com aspersão do fitopatógeno (*S. sclerotiorum*) nas folhas e tratamento com diferentes cepas de *Trichoderma* sp no substrato.

Tabela 7: Peso fresco, peso seco, comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total e área foliar nos testes de promoção de crescimento e em plantas de feijão com *S. sclerotiorum* e as cepas de *Trichoderma* sp adicionadas ao substrato.

Tabela 8: Porcentagem de germinação de sementes de feijão plantadas em substrato contendo micélio de *Sclerotinia Sclerotiorum*.

Tabela 9: Características culturais de T₂₅, T₂₇, T₅₁ e T₅₇ e das cepas isoladas das plantas de feijão em BDA e MEA

Tabela 10: Número de escleródios viáveis, porcentagem de redução, porcentagem de germinação (viabilidade) e número de escleródios germinados tratados com cepas de *Trichoderma* spp.

Tabela 11: Porcentagens de ganho de peso fresco e peso seco dos tratamentos com *Trichoderma* spp. em relação ao controle (C), nos testes de promoção de crescimento em plantas de feijão.

Tabela 12: Valores obtidos das variáveis analisadas no teste de promoção de crescimento em plantas de feijão, com *S. sclerotiorum* e diferentes cepas de *Trichoderma* sp no substrato.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA - ácido indol acético

AMF - fungos micorrizas arbusculares

BDA – batata, dextrose, ágar

BSA - albumina sérica bovina pnp: *p-nitrophenyl-N-N-diacetylchitobiose*

(C) - controle

CG/EM - cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

COVs - compostos orgânicos voláteis

CWDEs - enzimas degradadoras de parede celular

FMA- fungos micorrizas arbusculares

ISR- resistência sistêmica induzida

ISTH - Subcomissão Internacional de *Trichoderma* e *Hypocrea*

BCA - Agentes de Controle Biológico

MYG - extrato de malte, extrato de levedura, glicose

NAGases - *N*-acetil- β -D-glicosaminidases

PCA - Análise de componentes principais

PRRs - receptores de reconhecimento de padrões celulares

PTI - imunidade ativada

RPPN/UFMS – Reserva particular do Patrimônio Natural da Universidade

Federal de Mato Grosso do Sul

SAR - resistência sistêmica adquirida

Ss – *Sclerotinia sclerotiorum*

T – *Trichoderma* sp

RESUMO

O presente trabalho compreendeu na investigação de 57 cepas de *Trichoderma* spp. isolados do solo do Cerrado e Pantanal, ou endofíticos das espécies vegetais *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae), *Aspilia grazielae* Santos (Asteraceae) e *Vockysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), nativas do Pantanal e Cerrado do MS, quanto à capacidade de induzir o crescimento de plantas de feijão e inibir o crescimento e propagação do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Foram realizados testes de confrontação direta, cultura em placas pareadas e ensaios de atividade de enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs). Todos apresentaram resultados significativos na inibição de crescimento frente à *S. sclerotiorum*. Quanto à produção de CWDEs, todas as cepas apresentaram uma alta atividade específica das enzimas β -1,3- glucanases e proteases. No teste de proteção quanto à severidade da doença (mofo branco), após aspersão do fitopatógeno (*S. sclerotiorum*) nas folhas de plantas de feijão, destacaram-se os tratamentos com as cepas T₂₅ e T₅₅, que conferiram 90 a 100% de proteção contra a doença. Nos testes com a adição do fitopatógeno no substrato as plantas tratadas com as cepas T₂₅ e T₅₅ também foram assintomáticas. Foram testadas as capacidades das oito cepas de *Trichoderma* sp em hiperparasitar escleródios de *S. sclerotiorum* e a viabilidade destes em discos de cenoura. Elas inviabilizaram entre 93 e 100% a germinação dos escleródios. Para detectar a presença de *Trichoderma* sp como endofítico em plantas de feijão, as oito cepas do experimento com *S. sclerotiorum* no substrato foram testadas e os reisolados de T₂₅ e T₂₇ foram caracterizados como semelhantes, comparando as características morfológicas com a cepa inoculada. A capacidade de *Trichoderma* spp. em promover o crescimento de plantas de feijão foi determinada através da comparação da massa fresca e seca total, comprimento das raízes, caule e área foliar com o controle (sem *Trichoderma* sp). Todos os tratamentos com as cepas de *Trichoderma* sp testadas evidenciaram potencial como promotoras de crescimento, havendo diferença estatística em relação ao controle e entre elas, sendo que as cepas T₅₅ e T₅₇ apresentaram a maior porcentagem de ganho de massa seca. Por outro lado, o tratamento com a cepa T₄₆ apresentou inibição de crescimento das plantas. Foram selecionadas cepas para análise de compostos voláteis por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM), e alguns compostos foram identificados, tais como acorenol, β -cedreno, sesquifelandreno, cembreno, sesquisabineno, 7-metanoazuleno, α -cedrol, acorenona, epicubenol, verticellol, cadina-1,4-dieno e naftaleno. As cepas de *Trichoderma* sp testadas neste trabalho apresentam potencial como agentes de biocontrole contra *S. sclerotiorum*. Os resultados apresentados neste trabalho podem contribuir fortemente na elaboração de novos produtos com redução de custos, fazer parte do manejo integrado, reduzir o uso de pesticidas químicos na agricultura e ser usados como bioestimulantes, devido a capacidade de aumentar o crescimento e o desenvolvimento de plantas e com isto a produção de alimentos de qualidade. Também, poderão ser utilizados como insumo básico nos programas de recuperação ou conservação de ecossistemas, contribuindo para a preservação da biodiversidade.

ABSTRACT

The present work comprised the investigation of 57 isolates of *Trichoderma* spp. which were isolated from the soil of Mato Grosso do Sul, or endophytic from the plant species *Bauhinia unguolata*, *Aspilia grazielae* and *Vockysia divergens*, native species from the Pantanal and Cerrado of MS, regarding the ability to induce growth of bean plants and inhibit the growth and propagation of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Confrontation tests, culture in paired plates and cell wall degrading enzymes (CWDEs) activity assays were performed. All showed significant results in growth inhibition against *S. sclerotiorum*. As for the production of CWDEs, the 57 strains tested in this work showed a high specific activity of β -1,3-glucanases and proteases enzymes. In the protection test for disease severity (white mold), after spraying the phytopathogen (*S. sclerotiorum*) on the leaves of bean plants, the treatments with strains T₂₅ and T₅₅ stand out, which provided 90 to 100% protection against the disease. Tests with the addition of the phytopathogen in the substrate, the plants treated with strains T₂₅ and T₅₅ were also asymptomatic. The ability of eight strains of *Trichoderma* sp to hyperparasitism of *S. sclerotiorum* sclerotia and their viability in carrot discs was tested. The tested strains prevented between 93 and 100% of sclerotia germination. In order to detect the presence of *Trichoderma* sp as an endophytic in common bean plants, the eight strains of the experiment with *S. sclerotiorum* in the substrate were tested, and the reisolates of T₂₅ and T₅₇ were characterized as similar, comparing with the inoculated strain. The ability of *Trichoderma* spp. to promote the growth of common bean plants was determined by comparing the total fresh and dry mass, length of roots, stem and leaf area with the control, without fungi. All treatments with the tested *Trichoderma* strains showed potential growth promoters, with a statistical difference between the control and the T₅₅ and T₅₇ strains showing the highest percentage of dry mass gain. On the other hand, the treatment with strain T₄₆ showed plant growth inhibition. Eight isolates were selected for analysis of volatile compounds by gas chromatography (GC/MS), and some compounds were identified, such as acorenol, β -cedrene, sesquiphelandrene, cembrene, sesquisabinene, 7-methanoazulene, α -cedrol, acorenone, epicubenol, verticellol, cadina-1,4-diene and naphthalene (terpenoids). The results obtained show that the *Trichoderma* strains tested have potential as biocontrol agents against *S. sclerotiorum* and as biostimulants, increasing plant growth and development and with it the production of quality food. They can also be used as a basic input in ecosystem recovery or conservation programs, contributing to the preservation of biodiversity.

INTRODUÇÃO

O alimento é uma necessidade humana básica e para atender a essa demanda, desde a Revolução Verde, a produção de cereais triplicou e contribuiu para reduzir a insegurança alimentar, facilitando o desenvolvimento humano com benefícios para a expectativa de vida e melhoria na saúde. O dogma do século XX era que os produtos químicos sintéticos poderiam ser usados na agricultura sem restrições, porém chegou ao seu limite tanto para a saúde humana como para o meio ambiente, instigando uma mudança dos agrossistemas para uma abordagem mais sustentável (FAO 2017). O desafio fundamental do século XXI é continuar a atender às necessidades humanas de alimentos e manter a eficiência e a capacidade de produção conservando a biodiversidade e os serviços ecossistêmicos (Tamburini et al. 2020). A população e o PIB do Brasil e do mundo crescem em ritmo acelerado e conseqüentemente, a demanda global por safras de alimentos continua a crescer. Segundo Joly e colaboradores (2019), integrar a biodiversidade na vida diária é uma oportunidade única para promover o seu uso sustentável, assim como dos serviços ecossistêmicos, principalmente pela peculiaridade do Brasil de ser um país, cuja economia, está ancorada na agricultura. A Organização das Nações Unidas invoca por ação para acabar com a pobreza e proteger o planeta. São vários objetivos interligados para promover mudanças positivas no mundo do futuro. Diante desse cenário amplo e global, a resposta está no comprometimento para com a vida terrestre, assegurando os padrões de produção e de consumo sustentáveis, que por sua vez deterá a degradação e a perda da biodiversidade. A intensificação da agricultura molda a composição da comunidade e o funcionamento ecológico, incluindo serviços ecossistêmicos, como biocontrole ou polinização (Martin et al. 2019). As florestas são alvos constantes no domínio tropical e 83% das áreas agrícolas originaram-se de sua conversão e na América Latina, 90% da conversão florestal foram destinados para esta expansão (FAO 2016). Diferentes formas de agricultura desempenham diferentes papéis na biodiversidade e na conservação do solo (Alignier et al. 2021), sendo áreas estratégicas para investimentos em ações voltadas à conservação em diferentes escalas (Vasseur et al. 2013, Laurance et al. 2014, Tavares et al. 2019, Martel et al. 2017, Santos et al. 2021). Ações e implementação de princípios de conservação são alvos relevantes para serem estabelecidos, a fim de alcançar a melhoria dos serviços ecossistêmicos e preservação da biodiversidade em diferentes regiões e sistemas agrícolas (Batáry et al. 2020). A biodiversidade pode proporcionar maior heterogeneidade da paisagem e,

consequentemente, maior disponibilidade de recursos para sua manutenção ao longo do tempo e do espaço (Vasseur et al. 2013).

Ao longo das últimas décadas, o uso de tecnologias modernas, incluindo o cultivo de monoculturas, nos permitiu aumentar a quantidade de terra necessária para a produção de alimentos (Montagu 2020). A questão crucial das plantas cultivadas é a suscetibilidade a doenças e pragas (Liu et al. 2018), como por exemplo para as culturas de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays ssp. Mays*), trigo (*Triticum aestivum*) e soja (*Glicine max*), uma vez que estes fornecem metade dos alimentos consumidos pela humanidade (Borrill 2019). Entre os vários agentes causais bióticos das doenças em plantas estão os fungos e eles afetam a capacidade de produção, de reprodução ou crescimento da planta (Nazarov et al. 2020). O rendimento pode diminuir de 80 até 98% e coletivamente, eles causam perdas de mais de \$1 bilhão de dólares em todo o mundo a cada ano, para a cadeia de produção de alimentos (FAO 2019). Além das perdas, as doenças, muitas vezes, podem alterar o ecossistema culminando em um impacto social (Velásquez et al. 2018). Temos como exemplo *Phytophthora infestans*, que causou a “fome da batata” na Irlanda e levou à morte ou emigração de mais de 3 milhões de pessoas (Schumann 1991).

As plantas têm imunidade celular inata, mas os fitopatógenos têm a capacidade de escapar dessa imunidade e podem se espalhar de um hospedeiro suscetível a outro. Estas características diferem das doenças não infecciosas, que são causadas por condições de crescimento desfavoráveis e elas não são transmitidas de uma planta doente para uma saudável (Fontana et al. 2021). Atualmente, estão disponíveis no mercado muitos agentes sintéticos antimicrobianos para uso agrícola (Nazarov et al. 2020) responsáveis por causar contaminação de todo o ecossistema (Sodhi et al. 2021). Além disso, um número crescente de fitopatógenos desenvolve resistência a estes produtos, havendo necessidade de aplicações inovadoras para uma agricultura sustentável e contra doenças fúngicas na proteção de plantas e de safras inteiras (Köhl et al. 2019). Dados de pesquisas no Brasil demonstram o efeito potencialmente benéfico no manejo de doenças por agentes de biocontrole, que ao contrário da maioria dos defensivos químicos, possuem diferentes modos de ação, com funções distintas, que agem em sinergia, dificultando o surgimento de resistência dos fungos fitopatogênicos.

Visão Ecológica – Holobioma

Na natureza, as plantas em associação dinâmica proporcionam benefícios à comunidade por meio da competição e facilitação, restringindo o desenvolvimento de

doenças e aumentando a estabilidade da comunidade (Newton 2016). Elas coabitam com diversos microrganismos, dentre eles os fungos, que formam associações complexas e impactam no crescimento e produtividade (Berendsen 2012, Hassani et al. 2018, Trivedi et al. 2020). Esses microrganismos moldam os fenótipos das plantas hospedeiras e impulsionam a diversificação das comunidades, sendo esta associação uma unidade ecológica discreta, ou holobionte (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). As unidades funcionais evolutivas interagem e muitas vezes são, também, replicadoras de adaptação, onde ocorre transferência de informações genéticas entre os simbioses e proliferação dentro do hospedeiro ao longo do tempo (Rosenberg & Rosenberg, 2011, Roughgarden et al. 2017). O exemplo mais antigo de uma função simbiótica específica dentro da planta surgiu da endossimbiose de uma alfa-proteobactéria e uma cianobactéria. Agora são respectivamente a mitocôndria e o cloroplasto, totalmente integrados às células vegetais. Esses endossimbiontes não substituíram funções da planta ancestral, mas forneceram novas funções, dando uma vantagem competitiva evolutiva para as novas plantas em evolução (Lloyd et al. 2019).

Uma importante contribuição geral do microbioma para a aptidão do holobionte é o desempenho de processos metabólicos, que a planta não pode realizar por si própria (Lyu et al. 2021). Os efeitos benéficos dos microrganismos para as plantas hospedeiras incluem ativação do sistema imunológico da planta (Kurokawa et al. 2021), supressão de doenças (Trivedi et al. 2020), indução de resistência sistêmica (Olowe et al. 2018), aumento da aquisição de nutrientes e maior tolerância a estresses abióticos (Porter et al. 2019).

A interação ocorre entre suas células, sendo o crescimento e o desenvolvimento eventos da comunicação entre as diferentes formas de vidas (Hermosa et al. 2013, Kembel et al. 2014). As vias bioquímicas do hospedeiro e do simbionte são integradas e o metabolismo ocorre em função das enzimas tanto dos microrganismos quanto dos hospedeiros (Sudha et al. 2016). Além da contribuição dos microrganismos na produção de biomassa vegetal, eles desempenham um papel na manutenção da diversidade de espécies (Carthey et al. 2020). Estudos têm mostrado que o sistema imunológico de uma planta é criado com as contribuições do microbioma adquirido, então, a imunidade do holobionte não é simplesmente um exército defensivo para manter a planta (Belkaid e Hand 2014) e o hospedeiro distingue fungos benéficos de patógenos potenciais (Roughgarden et al. 2017). Parte da defesa do hospedeiro é usada para facilitar a colonização e isto inclui a ativação de receptores de reconhecimento de padrões celulares

(PRRs), que ativam um programa de defesa denominado imunidade adquirida (PTI) e vai fornecer resistência contra as doenças (Vishwakarma et al. 2020). A capacidade dos microrganismos em usar as vias de imunidade inata e adquirida para iniciar uma interação benéfica, leva a uma discriminação pela planta entre patógenos e não patógenos. Assim o microrganismo promove a proteção contra patógenos e o *fitness* do hospedeiro (Roughgarden et al. 2017).

Interações Fungo-Planta

A simbiose de fungos com plantas foi detectada em fósseis, há mais de 400 milhões de anos (Bonfante & Genre 2008, Selosse et al. 2015, Martin et al. 2017, Lutzoni et al. 2018). Esse tipo de interação compreende uma sucessão de processos biológicos, que levam a uma variedade de efeitos úteis tanto em ecossistemas naturais quanto em sistemas agrícolas (Van der Heijden et al. 2015), manifestando fortes efeitos na estrutura da comunidade e na diversidade de organismos associados (Omacini et al. 2001). Com base no tipo de colonização e os papéis que desempenham, a associação de plantas com os microrganismos pode ser classificada em micorriza, patogênica, epifítica, saprotrófica e endofítica (Brader et al. 2017). Os fungos micorrizas e as plantas co-evoluíram a partir da colonização inicial em ecossistemas terrestres, pois, na ausência de solo, os hospedeiros da planta enfrentaram grandes problemas de limitação de nutrientes e água (Genre et al. 2020). As condições adversas podem ter impulsionado a aliança das primeiras plantas terrestres e os fungos em direção às associações simbióticas (Martin et al. 2017), de modo que o fungo fornecia nutrientes inorgânicos e água para a planta hospedeira, que em troca recebia carboidratos. Há uma sobreposição parcial entre a microbiota endosférica e rizosférica e evidências sugerem que a primeira originou do solo, enquanto a segunda derivou de microrganismos de sementes por transferência vertical e depósitos atmosféricos (Nelson 2018). O reconhecimento e a colonização dependem dos tecidos das plantas colonizadas e dos fatores abióticos e bióticos no estabelecimento de simbiose, sendo importantes na estruturação da microbiota (Hassani et al. 2018).

Os fungos Ascomycota estão entre os táxons mais abundantes que colonizam a filosfera, enquanto que na rizosfera Ascomycota e Glomeromycotina dividem as interações na maioria dos ecossistemas terrestres (Martin et al. 2018). Quando os nutrientes estão indisponíveis no solo ou estão em baixas quantidades, ou mesmo quando há formação de complexos metálicos, que os tornam menos móveis, os fungos micorrizas

arbusculares (AMF) podem aumentar o acúmulo de macro e micronutrientes essenciais nas plantas, como N, P, K, Zn, Fe, Cu, Mg, Mn, Ca e S. Estes, por sua vez, aumentam a produção de fotossintato das plantas hospedeiras, que incrementam a produção de biomassa (Begum et al. 2019).

Os endofíticos habitam os diferentes tecidos de uma planta, enquanto que as micorrizas produzem estruturas externas nas raízes (Hardoim et al. 2015, Martin et al. 2017, Begum et al. 2019). Todos os microrganismos que habitam o interior de um vegetal, por pelo menos um período de seu ciclo de vida, podem ser considerados endófitos. São principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, de modo geral, nas partes aéreas, como folhas, caules, frutos, flores, mas podem também habitar as raízes sem causar aparentemente nenhum sintoma e/ou dano a seus hospedeiros (Azevedo et al. 2000, Schulz and Boyle, 2005) como lesões, retardo no crescimento, descoloração ou clorose (Hardoim et al. 2015, Puri et al. 2016). A maioria, senão todas, as plantas em ecossistemas naturais são simbióticas com fungos micorrízicos e/ou endófitos (Petrini, 1986).

Os endófitos são atualmente considerados uma fonte de novos metabólitos secundários com potencial para exploração médica, agrícola e industrial. São fontes de produtos naturais bioativos, que no interior do hospedeiro ocupam nichos biológicos únicos em ambientes variados e incomuns. Estas condições podem ser importantes na seleção de espécies com atividade biológica (Strobel et al. 2003, Atanasov et al. 2021). Para o crescimento e desenvolvimento, as plantas obtêm compostos químicos da atmosfera, do solo, da água e da matéria orgânica, e os endófitos induzem a absorção desses nutrientes através de diferentes modos de ação. Atuam de modo sinérgico na produção de fitormônios, como auxinas, citocininas, ácidos giberélicos e ácido indol acético (AIA), que promovem o crescimento da planta (Nair et al. 2014).

Fungos endofíticos produzem pigmentos, como por exemplo, a quercetina, um flavonóide antioxidante e anti-inflamatório, além de outros pigmentos que podem ser utilizados como corantes naturais de alimentos (Lopes et al. 2013, Arruda et al. 2019, Morales-Oyervides et al. 2020, Kalra et al. 2020, Menezes et al. 2020). Muitas enzimas comercialmente importantes são produzidas por várias espécies de fungos e são promissoras para implantação de processos biotecnológicos envolvendo a produção de pectinases, celulases, xilanases e proteases (Khan 2017, Da Silva et al. 2019).

Vários endofíticos isolados de plantas são conhecidos por sua bioatividade contra um amplo espectro de microrganismos patogênicos de plantas e animais (Nair et al. 2014,

Gouda et al. 2016, Silva et al. 2019). Além destes compostos, as pesquisas têm mostrado a descoberta de novos fármacos incluindo alcalóides, terpenóides, flavonóides e esteróides. Muitos têm funções de imunossupressores, antibióticos e anticancerígenos, como o taxol, por exemplo (Kaul et al. 2012, Gouda et al. 2016). Compostos biologicamente ativos, como os sideróforos, são componentes da virulência de microrganismos, que têm funções quelantes de íons como o ferro, apresentam extensas aplicações no campo da agricultura e da medicina (Saha et al. 2016, Sood et al. 2020). Os microrganismos endofíticos são considerados agentes eficazes de biocontrole, alternativos ao controle químico, pois podem facilmente colonizar diferentes plantas de cultivo com sucesso (Sharma et al. 2020, Nair et al. 2014).

A ciclagem de nutrientes é um processo contínuo nos ecossistemas e muitos organismos saprofíticos desempenham um papel importante nele. Durante a biodegradação da serapilheira, os fungos endofíticos facilitam a ação dos micróbios saprofíticos aumentando o processo de decomposição (Peršoh 2015). Estudos comprovam que os endófitos têm a capacidade de decompor componentes orgânicos, incluindo lignina, celulose e hemicelulose, com diferentes intensidades. Compostos complexos também podem ser decompostos utilizando fungos, a fim de remover poluentes do meio ambiente, por biorremediação (Hyde et al. 2019). Além disso, são capazes de realizar a decomposição de plásticos, como o polímero de poliéster poliuretano (Russel et al. 2011). Um espectro variado de compostos orgânicos voláteis (COVs) de atividade antimicrobiana como sesquiterpenos, furanos, alcenos, álcoois, fenóis, hidrocarbonetos alifáticos, aldeídos, cetonas, derivados de benzeno, ésteres, etc. já foram identificados e podem desempenhar importante papel na biologia do fungo e da sobrevivência da planta hospedeira (Troian et al. 2014, Silva et al. 2019, Oszako et al. 2021). Os fungos endofíticos se destacam pela capacidade de produzirem substâncias voláteis e apesar de serem produzidas em pequenas quantidades, representam uma nova fronteira na bioprospecção para a descoberta de novos produtos para exploração humana (Morath et al. 2012).

Parasitismo

As plantas exibem resistências à maioria dos microrganismos patogênicos por meio de barreiras químicas ou físicas constitutivas (Sharma & Gupta 2020). A pressão de seleção induzida por seus inimigos promove várias adaptações morfoanatômicas e bioquímicas que aumentam gradualmente a flexibilidade e a aptidão individual em

relação a seus patógenos (Janda et al. 2014). Apesar das doenças serem exceção, muitos patógenos são especializados para superar barreiras de defesa pré-formadas (Dangl et al. 1997) e as perdas são importantes nos sistemas de produção agrícola em todo o mundo (Nelson 2019).

Os fungos patogênicos constituem um grupo de microrganismos evolutivamente e ecologicamente diverso, cujo estilo de vida é diferenciado dependendo das estratégias utilizadas para adquirir nutrientes de seus hospedeiros (Jacoby et al. 2017). Eles apresentam estilo de vida parasitário, alguns colonizam o tecido vivo (biotróficos) utilizando moléculas efetoras para suprimir a morte das células vegetais e manipulam o metabolismo da planta a seu favor, enquanto outros matam seus hospedeiros (necrotróficos) secretando toxinas para matar o tecido vegetal e se alimentar dele (Ökmen & Doehlemann, 2014). Entre esses dois estilos de vida, se encontra uma grande variedade de fungos hemibiotróficos com uma fase biotrófica inicial, seguida de um estágio necrotrófico (Jiang et al. 2013).

Neste trabalho foram utilizados alguns fungos fitopatogênicos de importância comercial. Estes fitopatógenos habitantes do solo causam grandes perdas em culturas econômicas. Eles produzem estruturas de resistência na ausência de hospedeiros e/ou nas condições climáticas desfavoráveis. Uma vez introduzidos em uma área cultivada, estes fungos constituem um problema de difícil controle como *Sclerotinia sclerotiorum*. Este é um fungo cosmopolita, agressivo e inespecífico que pode causar danos significativos em culturas economicamente importantes para o Brasil como soja, feijão, milho, algodão dentre outras (Bolton et al. 2006, Silva et al. 2019). *Rhizoctonia solani* representa um grupo economicamente importante e geneticamente diverso de patógenos (Harman et al. 2004, Silva et al. 2019), apresenta ampla distribuição e ataca diversas culturas dentre elas feijão, soja e arroz (Wang, 2019). Fungos do gênero *Fusarium* atacam culturas de tomate, banana, pimenta, berinjela, feijão, girassol, trigo e milho (Bubici et al. 2019, Wang et al. 2019). *Macrophomina phaseolina* causa a podridão de raiz cinzenta que afeta as culturas de soja, feijão, batata, sorgo e milho nos campos brasileiros (Gupta et al. 2012, Silva et al. 2019).

Vários métodos de prevenção e/ou tratamento incluem nanotecnologia na produção de novos produtos e técnicas, que podem oferecer uma variedade muito grande de benefícios para a agricultura como o plantio de cultivares resistentes e controle biológico, mas ainda dependem principalmente de aplicações de fungicidas (Ferreira et al. 2021). Além dos custos, os fungicidas são prejudiciais ao ambiente e ao ser humano e

as taxas recentes de emergência de populações de fungos resistentes são sem precedentes (Fisher et al. 2020). Portanto, é necessário o desenvolvimento de novos métodos combinados de controle de fungos patogênicos para proteção de culturas (Sang et al. 2019). Com avanços no manejo integrado de doenças incorporadas à agricultura, os benefícios podem ser efetivos preservando, ao mesmo tempo, áreas para a vida silvestre e garantindo a produção (De Vos et al. 2016, Montagu, 2020). A atividade agropecuária impacta o meio ambiente, mas é possível conciliar uma agricultura moderna, tendo como base os avanços científicos, que visam minimizar os danos ambientais e conservar os recursos naturais (Paterniani, 2001).

A supressão de atividades prejudiciais de um organismo por um ou mais outros organismos, freqüentemente chamados de inimigos naturais, pode ser obtida e o organismo que suprime a praga ou patógeno é referido como o (BCA) - Agente de Controle Biológico (Pal, 2006). Mais especificamente, controle biológico é a utilização e introdução proposital de organismos vivos denominados hospedeiros para suprimir as atividades e populações de um ou mais fitopatógenos (Pal e Gardener, 2006, Mastouri et al. 2010, Harman et al. 2011).

Controle Biológico

O controle biológico surgiu como uma alternativa promissora, sendo fabricado a partir de um microrganismo e produzido em massa para mitigar as pragas de plantas (Parnell et al. 2016, van Lenteren et al. 2017). Os agentes usados como biopesticidas são geralmente divididos em três categorias: microrganismos, bioquímicos e quitosana, e apresentam muitas vantagens em termos de sustentabilidade ao meio ambiente, modo de ação e toxicidade, sem causar danos à saúde humana e de animais em comparação com os pesticidas químicos (Vinale et al. 2009, Sharp, 2013, Kumar et al. 2018, Chaud et al. 2021). Além disso, é amplamente utilizado em todo o mundo, com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (Barrat et al. 2018, Meena et al. 2020) na substituição de agrotóxicos fungicidas.

As características da agricultura no Brasil, com extensas áreas, nos levam a pensar num modelo para as regiões tropicais, sendo um desafio atual, que segundo Lopes et al. (2012) e Silva (2019), novos conhecimentos podem ser explorados para responder a questões-chave na ecologia fúngica e vegetal. Atualmente, vários agentes de biocontrole são reconhecidos e estão disponíveis como agentes bacterianos, por exemplo, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Agrobacterium* além de agentes fúngicos como *Trichoderma*,

Aspergillus, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Candida* e *Coniothyrium* (Pal & Gardener, 2006, Bettiol 2011, Naher et al. 2014, Khalid, 2017). Há uma diversidade de fungicidas para o controle do mofo-branco e outros fitopatógenos e para melhorar os resultados, o controle biológico tem sido utilizado como uma alternativa sustentável, por meio da aplicação de microrganismos antagonistas a patógenos habitantes do solo (Pomella et al. 2009).

Segundo Hyde et al. (2019), nos próximos anos provavelmente ocorrerão o aumento da aplicação de agentes de biocontrole na agricultura, com ênfase especial no uso de misturas de antagonistas no mesmo órgão vegetal. Esta abordagem pode levar a um espectro mais amplo de atividade do tratamento biológico ou a um aumento na eficácia ou consistência do tratamento biológico (de Vries & Wallenstein 2017, Kong et al. 2018). Nesse contexto, o controle biológico desempenha um papel fundamental nas tomadas de decisões fitossanitárias ao diminuir o uso de agrotóxicos em sistemas de produção agrícola, contribuindo de forma preponderante para a obtenção da inocuidade dos alimentos e sustentabilidade ambiental (Martinez, 2009, Barrat et al. 2018). No Brasil, a pesquisa com a prática de controle biológico está ganhando força, pois o crescente mercado de exportação de produtos alimentícios está contribuindo para a necessidade de reduzir os resíduos químicos nestes produtos (Gerage 2017).

Um grande número de cepas de *Trichoderma* pode ser classificado como “Agentes de Controle Biológico” contra vários tipos de fitopatógenos, como *Sclerotinia sclerotiorum* (Lorito et al. 2010, Lopes et al. 2012, Hermosa et al. 2013), *Macrophomina* spp. *Rhizoctonia* spp. e *Fusarium* spp. (Bettiol & Morandi, 2009, Samuels e Hebbbar, 2015), por intermédio do antagonismo, competição, antibiose e/ou parasitismo (Kubicek et al. 2011, Kredics et al. 2018). Um aspecto muito importante a ser considerado no controle biológico é que os mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. são relativamente mais lentos e duradouros, quando comparados com produtos químicos. Portanto, o seu uso deve ser preventivo, ou seja, antes do aparecimento da doença (Roblin et al. 2019) e curativo (de França et al. 2014, Marraschi et al. 2019), para mitigar os danos.

Trichoderma spp.

Microrganismos benéficos como fungos micorrízicos, bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos e bactérias endofíticos estão entre os organismos mais influentes na estrutura microbiótica da planta, dentre estes, encontram-se os fungos do gênero *Trichoderma* spp. O gênero *Trichoderma* Pers. (1794) pertence ao filo Ascomycota,

subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae. Desde janeiro de 2013, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Fungos e Plantas adotou-se uma única nomenclatura para as duas fases reprodutivas dos fungos pleomórficos (Hawksworth, 2014). No caso de *Trichoderma* a fase sexuada *Hypocrea* Fr. (1825), convencionou-se o nome *Trichoderma*, pela lei de prioridade e por preferência dos pesquisadores da Subcomissão Internacional de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH) e mais de 250 espécies foram descritas (Bissett 1991, Bissett et al. 2015, Cai et al. 2021).

Sobre o substrato colonizado a fase sexuada é caracterizada pela formação de peritécio, formados em estromas esverdeados, amarelados ou marrons. Dentro dos peritécios são formados ascos cilíndricos contendo oito ascósporos bicelulares, que se fragmentam em 16 esporos (Webster & Rifai 1968). Na fase assexuada, a partir do micélio vegetativo são formados conidióforos comumente agregados e espalhados pela colônia. Estes apresentam um eixo central com ramificações laterais, que terminam em espirais divergentes de células conidiogênicas do tipo fiálide, com formato de garrafa ou alongadas. No ápice das fiáldes são produzidos conídios unicelulares de formas variadas, podendo ser esféricos, ovais ou alongados, geralmente de cor verde (Chaverri 2003).

Muitas espécies de fungos não habitam o solo e possuem distribuição restrita compreendendo parasitas de fungos macroscópicos e apodrecedores de madeira em florestas tropicais e temperadas (Druzhinina et al. 2011). A capacidade de parasitar e se nutrir de biomassa morta de outros fungos sugere ser uma herança ancestral no gênero, que é compartilhada pela maioria dos *Trichoderma* spp. (Kubicek et al. 2011). Com a evolução, foram adquirindo a capacidade de produzir as enzimas necessárias para alterar o seu estilo de vida em direção à colonização da rizosfera, o endofitismo e a relação benéfica e estável com as plantas (Khare et al. 2018). Quando são encontrados e isolados dentro da planta hospedeira são endofíticos e se encontrados em matéria orgânica em decomposição são saprofíticos ou sapróbios (Naranjo-Ortiz et al. 2019).

O grande potencial de espécies do gênero *Trichoderma* como agentes de controle biológico é devido à sua elevada capacidade de reprodução e de resistir a condições pouco favoráveis do ambiente, com alta eficiência na utilização de nutrientes, grande capacidade em parasitar fungos, inclusive fungos patogênicos de plantas como *S. sclerotiorum*, produzir antibióticos, metabólitos voláteis e não voláteis e enzimas líticas (Harman et al. 2004, Guzmán-Guzmán 2018, Naranjo-Ortiz et al. 2019). Adaptados a todos os biomas, esses fungos vivem em regiões marinhas, de água doce e terrestre (Hyde et al. 2019,

Naranjo-Ortiz et al. 2019). As habilidades deste gênero em reconhecer, invadir e destruir outros fungos e alguns nemátodos tem sido a maior força diretora das pesquisas, além do sucesso comercial como biopesticidas (Verma et al. 2007). Por apresentarem estas características diferentes *Trichoderma* são isolados, testados e selecionados para o controle biológico de doenças e como promotores de crescimento, em várias partes do mundo (Woo et al. 2018).

As espécies de *Trichoderma* podem induzir a resistência de plantas contra patógenos, aumentar a tolerância de plantas a estresses abióticos e fisiológicos, aumentar o crescimento e o vigor de plantas, solubilizar nutrientes vegetais e podem ser usados para remoção ou redução das concentrações de substâncias poluentes como metais pesados em ambientes poluídos (Lorito & Woo, 2010, Shores et al. 2010, Hermosa et al. 2012, Mastouri et al. 2012, Martin et al. 2017). A interação entre *Trichoderma* e a planta hospedeira envolve reconhecimento, ligação, penetração, colonização e transferência de nutrientes a partir da raiz (Mukherjee et al. 2012). Para colonizar com facilidade os solos e as raízes, espécies de *Trichoderma* competem com os patógenos presentes, colaborando para que as plantas permaneçam saudáveis, sendo considerados biofungicidas naturais com capacidade de induzir defesas da própria planta (Punja & Utkhede, 2003). Segundo Howell (1987), estas defesas consistem na expressão de um conjunto de proteínas conhecidas como PRs (proteínas de resistência) e na liberação de fitoalexinas, que protegem a planta contra infecções fúngicas.

Nos últimos anos, no intuito de encontrar cepas com maior eficiência, muitas espécies endofíticas têm sido isoladas a partir de plantas tropicais, descritas e submetidas a testes de antagonismo frente a fitopatógenos *in vitro* (Chaverri e Samuels, 2013). Diferentes cepas/espécies de *Trichoderma* spp. têm demonstrado capazes de utilizar vários mecanismos de ação, como a competição, crescendo em diferentes ambientes, contornando o déficit de C e/ou N e tolerância ao estresse oxidativo, salino, térmico e osmótico, hiperparasitar fitopatógenos, secretando enzimas como β -1,3-glucanases, *N*-acetil- β -D-glicosaminidases (NAGases) quitinases, e proteases que degradam paredes celulares de fungos (Bettiol et al. 2009, Druzhinina et al. 2011, Geraldine et al. 2013). Também eliminam substâncias tóxicas atuando através da antibiose, propiciando ambiente desfavorável para a colonização de fitopatógenos (Vergara et al. 2019, Hyde et al. 2019). Sua versatilidade metabólica inclui a produção de sideróforos e fosfatases, podendo atuar como promotores de crescimento (Vinale et al. 2012). Ativam e induzem respostas de defesa em plantas do tipo SAR (resistência sistêmica adquirida) e respostas

ISR (resistência sistêmica induzida), regulam os níveis de etileno endógeno em plantas e produzem auxina (Hermosa et al. 2013, Romera et al. 2019). O uso de *Trichoderma* spp. como ferramenta biológica para o manejo de doenças agrícolas tem sido destaque em pesquisas no Brasil assim como sua utilização no incremento da produtividade (Lopes et al. 2012, Inglis et al. 2020).

Plantas do Pantanal e Cerrado de Mato Grosso do Sul

Trabalhos recentes mostraram que o Pantanal pode ser descrito como uma das áreas úmidas mais importantes do mundo devido às suas ligações com a hidrologia e biogeoquímica regional e global (Ivory et al. 2019). Sua vegetação é constituída por plantas do Cerrado, da Amazônia, do Chaco e da Mata Atlântica, ocorrendo raras espécies endêmicas (Pott et al. 2011). De modo geral, a vegetação está distribuída em formações vegetais (Assine et al. 2015, Ivory et al. 2019), sendo controlada pelo clima, intensidade de inundação, topografia e tipo de solo (Damasceno-Junior et al. 2005). A exploração excessiva e a falta de manejo deste bioma têm ameaçado sua biodiversidade (Alho e Silva 2012, Tomas et al. 2019) e o conhecimento da diversidade dos microrganismos associados às plantas do Pantanal ainda é muito escasso (Noriler et al. 2018), já que os fungos desempenham funções vitais no ecossistema como simbioses de plantas (Neori & Agami, 2017).

Fungos endofíticos são onipresentes na natureza e podem ser isolados de uma variedade de espécies de plantas saudáveis, desde plantações, espécies nativas e invasoras (Hardoim et al. 2015). Eles apresentam papel essencial para a adaptação de seus hospedeiros a ambientes específicos. Por exemplo, as plantas hospedeiras e microrganismos metalotolerantes estabelecem associações, devido ao potencial dos microrganismos em bioacumularem metais em ambiente poluído e mobilizar/imobilizar os metais, proporcionando o crescimento das plantas (Glick 2010, Ma 2011, Nedjimi et al. 2021). Este é o caso de *Aspilia grazielae* Santos (Asteraceae) uma espécie endêmica das Morrarias do Urucum, Corumbá, Mato Grosso do Sul (MS). Nesta região encontra-se uma grande jazida de ferro e manganês onde ela germina e cresce em condições consideradas altamente estressantes para a maioria das espécies vegetais (Weirich et al. 2021). *Aspilia grazielae* é uma espécie arbórea-arbustiva, da flora brasileira (Santos 2001, Hind & Miranda 2008), tem como *habitat* a região de transição entre os biomas Cerrado e Pantanal e está ameaçada pelo avanço das atividades de mineração no Pantanal (CNCFLORA 2015, Flora do Brasil Online 2020).

O Pantanal é berço de densas populações da espécie vegetal *Vochysia divergens* - Pohl (Vochysiaceae) popularmente conhecida como cambará, podendo ser encontrada em áreas periodicamente ou permanentemente alagadas (Junk et al. 1989, Arieira et al. 2006). O cambará produz diversas substâncias com potencial antimicrobiano (Honda et al. 1995) e farmacológico (Hess et al. 1999).

A espécie *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) conhecida como pata de vaca é uma leguminosa nativa do Brasil encontrada principalmente no Cerrado e Mata Atlântica (Barroso 1991, Maia Neto 2008, SiBBR 2021), é utilizada no tratamento do diabetes devido a sua ação hipoglicemiante (Morais et al. 2005, Santos et al. 2011, Paula et al. 2014).

Neste contexto, este estudo explorou e avaliou a biodiversidade e o potencial de cepas de *Trichoderma* spp. endofíticos isolados de folhas e raízes de *Aspilia grazielae*, *Vochysia divergens* e *Bauhinia unguolata* e cepas isoladas do solo do cerrado e pantanal, como estratégia alternativa para manejo de fungos fitopatogênicos.

Espécies vegetais nativas que toleram ambientes muitas vezes inóspitos são de grande interesse, devido a suas adaptações de sobrevivência ao longo do tempo e suas funções ecossistêmicas atuando diretamente na biodiversidade. Portanto, reconhecer e investigar os microrganismos endofíticos, é fundamental para obter cepas com um desempenho promissor (Montaño López et al. 2021). A exploração da diversidade de microrganismos de regiões remotas e ainda inexploradas, como o Pantanal, contribui para o conhecimento da riqueza de espécies de fungos endofíticos, bem como a descoberta de novas espécies e também de novos compostos produzidos por estes microrganismos, que podem ser explorados para diversas aplicações (Guo et al. 2011). Segundo García-Núñez, 2012 e Barbosa et al. 2021, as cepas de *Trichoderma* nativas são mais agressivos do que os armazenados em coleções. Dentro deste contexto, o conhecimento de aspectos ecológicos e bioquímicos desses fungos é essencial para o sucesso na seleção de cepas eficientes e seguras (Druzhinina et al. 2008). Portanto, o estudo secretômico destas espécies é de grande importância não apenas para o entendimento da fisiologia microbiana, mas pelo potencial natural que tais cepas podem apresentar.

JUSTIFICATIVA

O controle biológico de doenças em plantas agricultáveis é atualmente uma alternativa bastante utilizada para redução do uso de agrotóxicos, pois oferece soluções sustentáveis com potencial de controlar pragas agrícolas, sem causar danos à saúde

humana, de animais e ao meio ambiente e não requer grandes investimentos (Lipke 2018). A demanda por produtos e alimentos livres de resíduos deixados pelas aplicações de agrotóxicos é cada vez maior e o controle biológico de pragas e doenças é uma alternativa relevante.

O Brasil tem a sua economia baseada principalmente na agricultura e necessita do aumento na produção com oferta de alimentos mais saudáveis. Para se obter um sistema sustentável de produção agrícola, o controle biológico assume um papel indispensável que minimiza problemas não superados por produtos químicos, sendo uma alternativa bastante promissora. Nos últimos anos, os fungos receberam atenção e em muitos casos, as cepas fúngicas agora são relatadas como os verdadeiros produtores de substâncias bioativas (Nicoletti 2018).

O uso de biofungicidas, tais como *Trichoderma* spp. são atraentes para a agricultura comercial porque atingem alguns nichos onde o controle químico não é capaz de atuar (Vinale et al. 2008, Lopes 2009, Bettioli et al. 2014, Woo et al. 2017). *Sclerotinia sclerotiorum* é um fitopatógeno que ataca dezenas de culturas agrícolas de importância econômica e o controle químico tem eficiência baixa, além do custo elevado e trazer riscos de contaminação ambiental. As pesquisas com o uso de agentes de controle biológico têm se intensificado e fungos antagonistas como *Trichoderma* spp. são recomendados com sucesso para o controle do mofo branco no feijoeiro.

Vários estudos demonstraram que plantas tratadas com *Trichoderma*, além de controlar as doenças, apresentaram maiores rendimentos na produção do que as plantas não tratadas (Harman 2011, Shores et al. 2008, Rubio et al. 2017). Além disso, a prevenção pode criar sistemas de cultivo menos propensos a sofrer perdas econômicas significativas devido à presença de pragas e doenças.

O intuito deste trabalho foi determinar as habilidades de *Trichoderma* spp. como controle biológico de *S. sclerotiorum*, avaliando o potencial de 57 cepas de *Trichoderma* spp. isoladas do solo do Cerrado e do Pantanal, bem como cepas endofíticas de espécies nativas destes biomas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o potencial de cepas de *Trichoderma* spp. isoladas de solo do Cerrado e Pantanal de Mato Grosso do Sul, quanto à capacidade de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*, diminuir os sintomas do mofo branco *in vivo* e promover o crescimento de plantas de feijão.

Objetivos Específicos

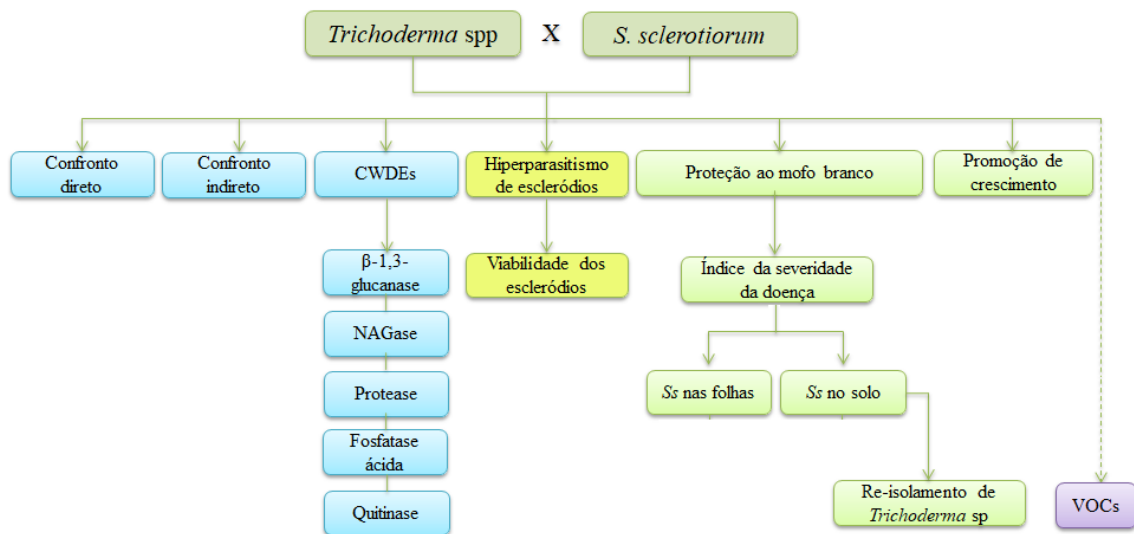
- Realizar ensaios de antagonismo de 57 cepas do gênero *Trichoderma* spp. com *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*, por confronto direto e através da produção e emissão de metabólitos voláteis,
- Realizar ensaios de atividade enzimática para detecção da atividade de β 1,3 glucanases, *N*-acetilglucosaminidase, proteases, fosfatases ácidas e quitinases com extratos enzimáticos de 57 cepas de *Trichoderma* spp.,
- Avaliar o efeito das cepas de *Trichoderma* spp. na severidade da doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijão,
- Realizar reisolamento de *Trichoderma* spp. de plantas de feijão após o teste com inóculo de micélio de *S. sclerotiorum* no substrato,
- Avaliar a capacidade de hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. em escleródios de *S. sclerotiorum*,
- Realizar teste de viabilidade dos escleródios de *S. sclerotiorum* após tratamento com cepas de *Trichoderma* spp.,
- Realizar ensaios de promoção de crescimento de plantas de feijão utilizando cepas de *Trichoderma* spp.,
- Análisar os metabólitos secundários de algumas cepas de *Trichoderma* sp por cromatografia em fase gasosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Foram utilizadas 57 cepas de *Trichoderma* spp. obtidos de diferentes substratos em diferentes regiões do Cerrado e Pantanal do Mato Grosso do Sul (Tab. 1). Entre 2012 e 2016, foram isolados fungos do gênero *Trichoderma* em diferentes localidades do

estado de Mato Grosso do Sul, com formas de vida endofítica, bem como a partir do solo. Também em 2016 o doutorando Carlos Eduardo Weirich realizou a coleta de folhas e raízes de *Aspilia grazielae* (Santos), uma espécie endêmica do Morro do Urucum (Corumbá – MS). A partir deste material vegetal, foram em torno de 600 isolados de fungos endofíticos de folhas e raízes de *A. grazielae*, sendo que foram cedidas 47 cepas de *Trichoderma*, para serem utilizados no presente trabalho.



Fluxograma simplificado das etapas executadas neste trabalho no controle biológico de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* spp

Tabela 1: Ano de coleta, número de identificação dos *Trichoderma* spp. isolados de folha, raíz, casca do caule e solo de diferentes regiões do estado de Mato Grosso do Sul.

Ano da Coleta	Cepa/Hábito	Local da coleta	Coordenadas	Substrato
2008	T1*	Pantanal	S18°49'57,1"/W 55°49'35,6"	Folha/ <i>V.divergens</i>
2012	T2**	Morro do Azeite	S19°34'39,6"/W 57°01'09,4"	Solo alagado
2012	T3**	Passo do Lontra	S19°35'48"/W57°03'35,6"	Solo com herbáceas
2013	T4**	RPPN / UFMS	S20° 30'37"/ W54°36'58"	Cerrado arborizado
2013	T5*	L Amor / UFMS	S20°26'34"/ W54°38'47"	Caule/ <i>Acrocomia totai</i>
2013	T6*	RPPN / UFMS	S20°30'36"/W54°36'58"	Folha/ <i>B. ungulata</i>
2013	T7**	Passo do Lontra	S19°35'48"/W54°36'58"	Solo com herbáceas
2005	T8*	Água Clara	S20° 26' 53"/W52°52'41"	Folha/ <i>B.brizanta</i>
2013	T9*	RPPN / UFMS	S19°2'19 53"/W52°52'41"	Folha/ <i>B. ungulata</i>
2013	T10*	RPPN / UFMS	S19°2'19,3"/W57°35'07,1"	Folha/ <i>B.ungulata</i>
2016	T11 ao T33*	Morro do Urucum	S19°12'19,3"/W57°35'07,1"	Raíz/ <i>Aspilia grazielae</i>
2016	T34*	Morro do Urucum	S19°11'48,1"/W57°33'19,1"	Folha/ <i>Aspilia grazielae</i>
2016	T35 ao T57*	Morro do Urucum	S19°12'19,3"/W57°35'07,1"	Raíz/ <i>Aspilia grazielae</i>

*Endofítico e **Sapróbio

Obs: Número da autorização de coleta: MMA/ICMBio/SisBio 50900-1 em 08/09/2015.

Fitopatógenos e sementes de feijão

- *Sclerotinia sclerotiorum* – foi cedido pelo pesquisador Celso Dornelas Fernandes, da EMBRAPA Gado de Corte – Campo Grande – MS, Brasil em janeiro de 2013.
- *Fusarium* sp, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*, foram cedidos pela Profa Dra. Bianca Obes Corrêa da Universidade Anhanguera Uniderp Agrárias, em outubro de 2019.
- As sementes de feijão do tipo carioca (*Phaseolus vulgaris*) utilizadas neste trabalho foram cedidas pela Profa. Dra. Bianca Obes Corrêa da Universidade Anhanguera Uniderp Agrárias, em 2019.

Locais de coletas

As localizações das coletas podem ser observadas na figura abaixo:

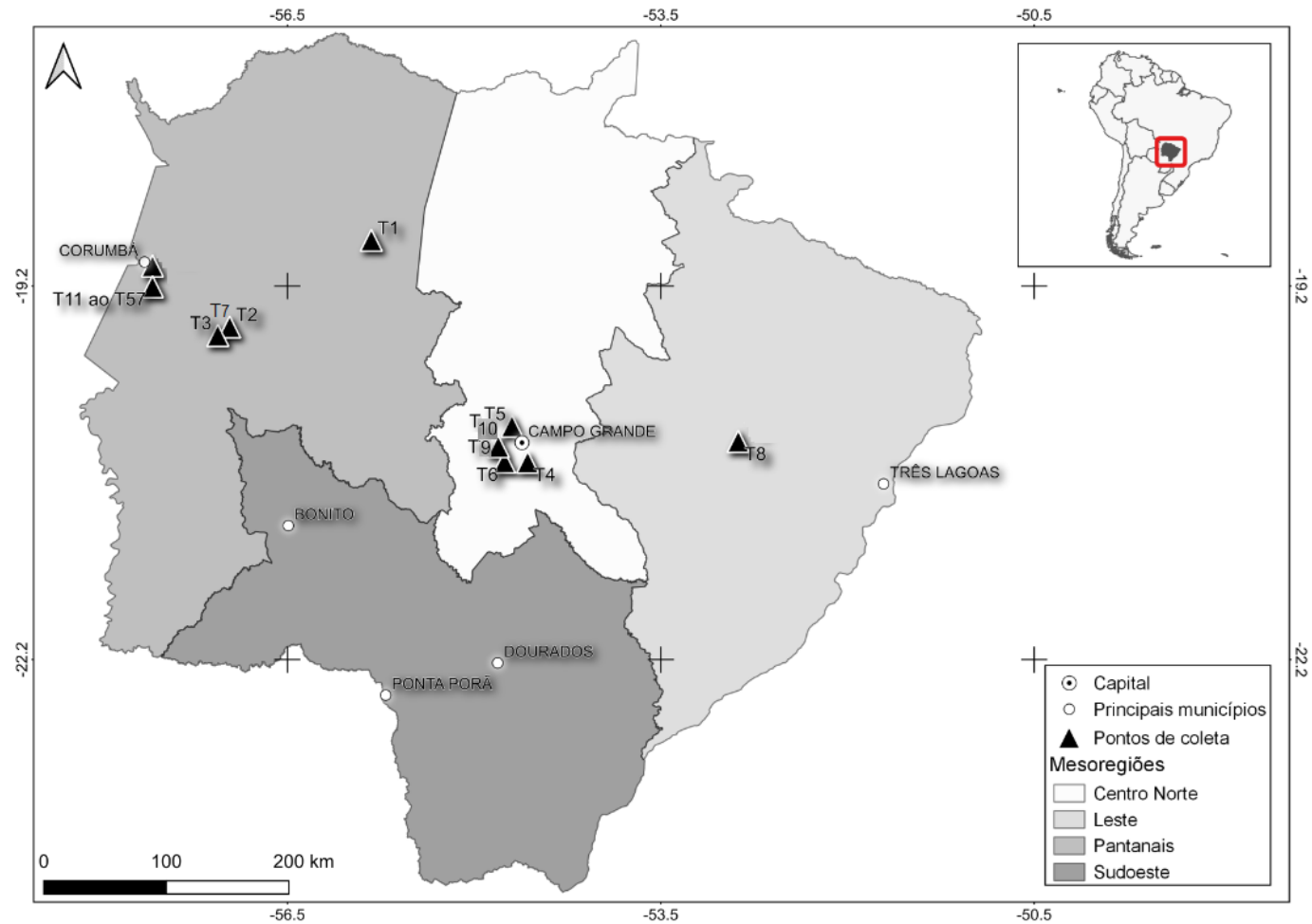


Figura 1. O mapa mostra a localização espacial dos pontos de coletas de material vegetal ou solo.

Cultivo dos fungos

As cepas selecionadas foram cultivadas em meio BDA em tubos inclinados e placas de Petri. Periodicamente, os fungos foram re-inoculados em novos meios de cultura, para manutenção. O mesmo procedimento foi feito com os fungos fitopatogênicos.

Teste de antagonismo em confrontação direta

As cepas de *Trichoderma* sp foram testados contra o *Sclerotinia sclerotiorum* de acordo com a metodologia proposta por Martins-Corder & Melo (1998). Discos de ágar de 5 mm contendo micélio do fitopatógeno foram inoculados em placas de Petri (135 mm de diâmetro), contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), a uma distância de aproximadamente 20 mm da borda. Discos de meio de cultura das cepas de *Trichoderma* sp também foram inoculadas nas placas, mantendo a mesma distância da borda, em posição oposta à colônia do fitopatógeno e incubadas à 28 °C durante 5 dias ou até que toda placa fosse colonizada pelos fungos (Fig 2). Considerando os critérios de Bell et al. (1982), as avaliações foram feitas através de uma escala de notas com valores de 1 a 5. Considerou-se um bom antagonista, as cepas que obtiveram nota ≤ 2 .

Tabela 2: Escala de notas segundo Bell et al. (1982) e as porcentagens de inibição, que correspondem as % da superfície do meio na placa de Petri coberta por *Trichoderma* sp.

Escala de notas	% de inibição
1	~100%
1,5	~87,5%
2	~66,6%
2,5	~62,5%
3	~50,0%
3,5	~37,5%
4	~33,3%
5	~0,0%

Os procedimentos foram realizados em condições assépticas utilizando capela de fluxo laminar. Para avaliação da eficácia do tratamento foi mensurado o crescimento micelial da colônia do fitopatógeno em intervalos de 24 horas. Durante o período de desenvolvimento foram efetuadas medições ortogonais do diâmetro das colônias, tendo como referência o desenvolvimento da placa controle contendo apenas o fitopatógeno em meio de cultura (Fig 2). O mesmo teste foi realizado com outros fitopatógenos:

Macrophomina phaseolina, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia* sp. Foram avaliados oito cepas (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇), quanto à capacidade de inibir o crescimento destes patógenos. Os testes foram realizados em triplicata, obtendo assim, a média do desenvolvimento micelial em mm/dia. Para o cálculo da porcentagem de inibição foi utilizada a fórmula de Mccalley et al. (1992).

$$\%In = [(C - T)/C] \times 100$$

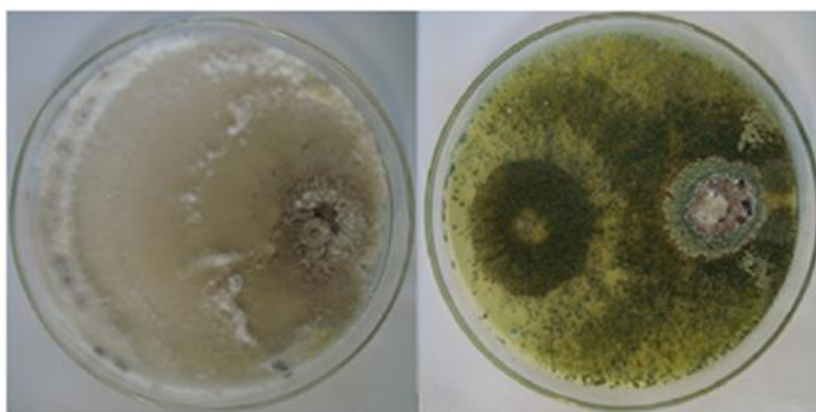
Sendo:

(C) médias dos diâmetros das colônias controle,

(T) médias dos diâmetros das colônias teste e

(%In) porcentagem de inibição.

As medidas foram obtidas após 120 horas.



(a)

(b)

Figura 2: Exemplo de um teste de antagonismo em confrontação direta. Em (a) placa o controle contendo somente o fungo fitopatogênico (*Sclerotinia sclerotiorum*) e em (b), o fungo fitopatogênico co-cultivado com *Trichoderma* sp, após 120 horas de incubação.

Teste de antagonismo em confrontação indireta

As cepas de *Trichoderma* sp e do fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, foram inoculadas no centro de placas de Petri (90 mm) contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), ambos na forma de discos (0,5 cm). As placas contendo os fungos foram posicionadas uma sobre a outra, de modo que na placa inferior ficasse o *Trichoderma* sp e na superior *S. sclerotiorum*. As tampas foram vedadas lateralmente com filme plástico e em seguida as placas foram incubadas a 28°C, por sete dias (Bharat et al.1980). O teste foi realizado duas vezes com cinco repetições, contendo também placas testemunhas do

fitopatígeno e de *Trichoderma* sp. As medidas do crescimento das colônias foram realizadas em intervalos de 24 horas. Para o cálculo da porcentagem de inibição foi utilizada a fórmula de Mccalley et al. (1992).

$$\%In = [(C - T)/C] \times 100$$

Sendo:

(C) médias dos diâmetros das colônias em BDA sem *Trichoderma* sp,

(T) médias dos diâmetros das colônias em BDA com *Trichoderma* sp e

(%In) porcentagem de inibição

As medidas foram obtidas após 120 horas.

Produção e determinação da atividade de hidrolases de parede celular de cepas de *Trichoderma* spp

Para produção de enzimas hidrolíticas, cepas de *Trichoderma* foram cultivadas em meio BDA sólido e posteriormente cinco, discos (5 mm de diâmetro) foram inoculados em frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio TLE: [CaCl₂.2H₂O, 0,3 g L⁻¹, KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄, 1,4 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O, 0,3 g L⁻¹, ureia, 0,3 g L⁻¹, peptona, 1,0 g L⁻¹, solução de elementos traços (Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺) a 0,1%] e parede celular de *S. sclerotiorum* na proporção de 0,5% como fonte de carbono, como forma de estimular a produção de enzimas pelas cepas de *Trichoderma* spp. Os frascos foram incubados sob agitação constante (110 rpm) a 28°C por 48 horas. O líquido foi filtrado separado em alíquotas e armazenado a 4°C para posterior quantificação enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada cepa, segundo Lopes et al. (2012).

- a. Produção de parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* para ensaios de atividade de enzimas degradadoras de parede celular

A parede celular de *S. sclerotiorum* foi obtida, após o inóculo de discos de 5 mm de diâmetro do fitopatígeno originados das placas em meio sólido, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250mL de meio MYG (extrato de malte, 0,5%, extrato de levedura, 0,25% e glicose 1,0 %). Esses frascos foram incubados sob agitação constante (110 rpm) a 28°C por 10 dias. O micélio foi filtrado, lavado, autoclavado, liofilizado, macerado com nitrogênio líquido (Fig 3) e armazenado a -4°C. O material resultante foi considerado extrato de parede celular de *S. sclerotiorum*.

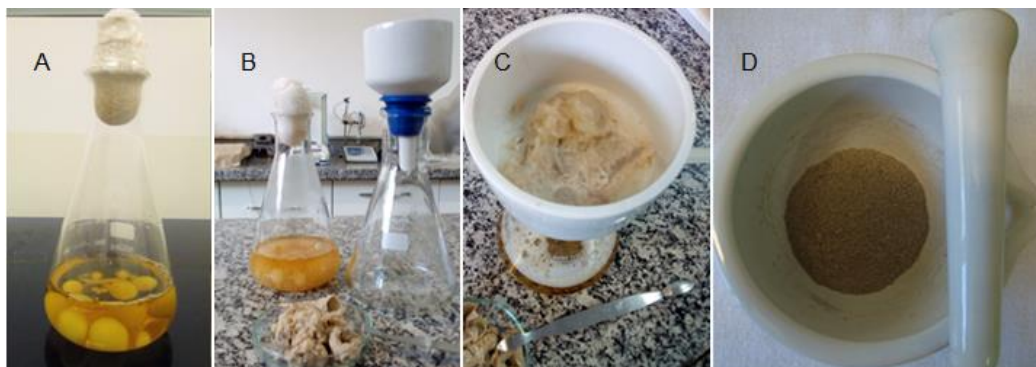


Figura 3: Produção de parede celular de *S. sclerotiorum*. Inóculo cultivado em meio MYG (A), Filtragem do fungo crescido após 10 dias (B e C) e produto final (parede celular) após autoclavagem, liofilização e maceração (D).

b. Determinação do conteúdo de Proteína Total

A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA-Sigma®) como padrão. Neste método, 100 μL de cada amostra enzimática foi homogeneizada com 700 μL de água destilada e 2500 μL do reagente de Bradford (100 mg de Coomassie Blue, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico completando com água destilada até 1000 mL) e após incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Foram transferidos 200 μL para uma placa de 96 poços e a quantidade de proteína foi mensurada por leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

c. Atividade de β -1,3-glucanase

Foi determinada utilizando laminarina como substrato a uma concentração de 0,75% p/v em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) (Ramada et al. 2010). Utilizou-se uma mistura contendo 25 μL de solução enzimática e 50 μL de solução de laminarina. A mistura foi incubada a 40° C por 10 minutos e em seguida foram adicionados 250 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e a reação incubada a 95°C durante 5 minutos (Noronha e Ulhoa, 2000). Foram transferidos 200 μL para uma placa de 96 poços e quantidade de açúcar redutor foi mensurada em 540 nm. Uma unidade de atividade

enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 μm de açúcar redutor. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

d. N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase)

Para determinação da atividade de N-acetil-glicosaminidase, 175 μL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 foram incubados com 50 μL de *p*NP-Nacetil- β -D-glicosamina 5 mM e 25 μL de amostra a 40°C por 20 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 250 μL de NaOH 0,1 M (Ulhoa e Peberdy, 1992). Foram transferidos 200 μL para uma placa de 96 poços e a absorbância foi mensurada a 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 μm de *p*-nitrofenol. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteínas.

e. Atividade de protease

A atividade de protease foi determinada utilizando-se azocaseína como substrato a 0,25% em tampão fosfato/citrato 50 mM, pH 5,0. A mistura de ensaio continha 20 μL de solução enzimática, 40 μL de azocaseína e 40 μL do tampão. Após incubação da mistura a 37°C por 30 minutos, 100 μL de TCA 10% (p/v) foram adicionados às amostras e estas incubadas a 4°C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas à 2.500 $\times g$ por 30 minutos e o sobrenadante foi transferido para microplacas contendo 100 μL de NaOH 1 M, sendo então, realizada a leitura em placa de 96 poços a 450nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em uma unidade por minuto (Qualhato et al. 2013).

f. Atividade da fosfatase ácida

Foi determinada usando substrato derivado de de fosfato de *p*-nitrofenil-fosfato (*p*-NPP) (5 mM). A mistura de ensaio continha 10 μL de solução enzimática, 40 μL de solução derivada de pnp e 100 μL de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4.8. A mistura foi incubada a 37°C durante 15 minutos e a reação foi interrompida adicionando-se 100 μL de NaCO₃ (0,1 M), (Monteiro et al. 2015). Foram transferidos 200 μL para uma placa de 96 poços e a absorbância mensurada a 405 nm utilizando um leitor de microplacas. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μm de *p*-nitrofenol. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteínas.

g. Atividade da quitinase

Foi determinada usando substrato derivado de pnp: *p*-nitrofenil-*N-N*-diacetil quitobiose (*p*-NPNND) (2,5 mM). A mistura de ensaio continha 10 μ L de solução enzimática, 40 μ L de solução derivada de pnp e 100 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0. A mistura foi incubada a 37°C durante 15 minutos e a reação interrompida adicionando 100 μ L de NaOH (0,1 M) (Qualhato et al. 2013). Foram transferidos 200 μ L para uma placa de 96 poços e a absorbância mensurada a 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ Mol de *p*-nitrofenol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteínas.

Testes para obtenção dos índices da severidade da doença causada por *S.sclerotiorum* em plantas de feijão cultivadas em substratos contendo esporos de *Trichoderma* spp.

Os testes foram realizados segundo Pedro et al. (2012), com algumas adaptações. O solo utilizado foi coletado 20 cm abaixo da superfície de uma área desprovida de vegetação. Foi passado por peneira fina e autoclavado em pequenas porções. Os experimentos foram realizados em local com luminosidade natural (11 h), arejado e em temperatura ambiente e regados com água diariamente. Os vasos foram acomodados sobre bancadas de tábua a 50 cm do chão. A temperatura média foi de 28°C e o tempo de luminosidade de aproximadamente 11 horas por dia. Esta etapa do trabalho foi realizada em abril e maio de 2020 na UFMS.

a. Cultivo das cepas de *Trichoderma* spp.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de inibição do crescimento (confronto direto e indireto) do fitopatógeno, atividade enzimática, locais de origem e características culturais em diferentes meios de cultura foram selecionadas oito cepas (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇). Dentre eles, as maiores porcentagens de inibição do fitopatógeno (T₂₅ e T₅₇), duas com as menores porcentagens de inibição do fitopatógeno (T₅₁ e T₅₅) e outras quatro cepas (T₁, T₈, T₂₇ e T₄₆) com resultados intermediários e diferentes entre si. Os meios de cultura foram para detectar diferenças entre as cepas foram:

MEA – extrato de malte e ágar

CYA – extrato de levedura e ágar

BDA – batata, dextrose e ágar

T₁ – *Trichoderma* sp- endofítico isolado de folhas de *Vochysia divergens*

T₈, *Trichoderma* sp – endofítico isolado de folhas de *Brachiaria brizanta*

T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ – endofíticos isolados de raízes de *Aspilia grazielae*

Os inóculos das cepas foram produzidos separadamente, em frascos de vidro transparentes, contendo grãos de arroz umedecidos e autoclavados, mantidos por sete dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e 11h no claro (Fig 4).

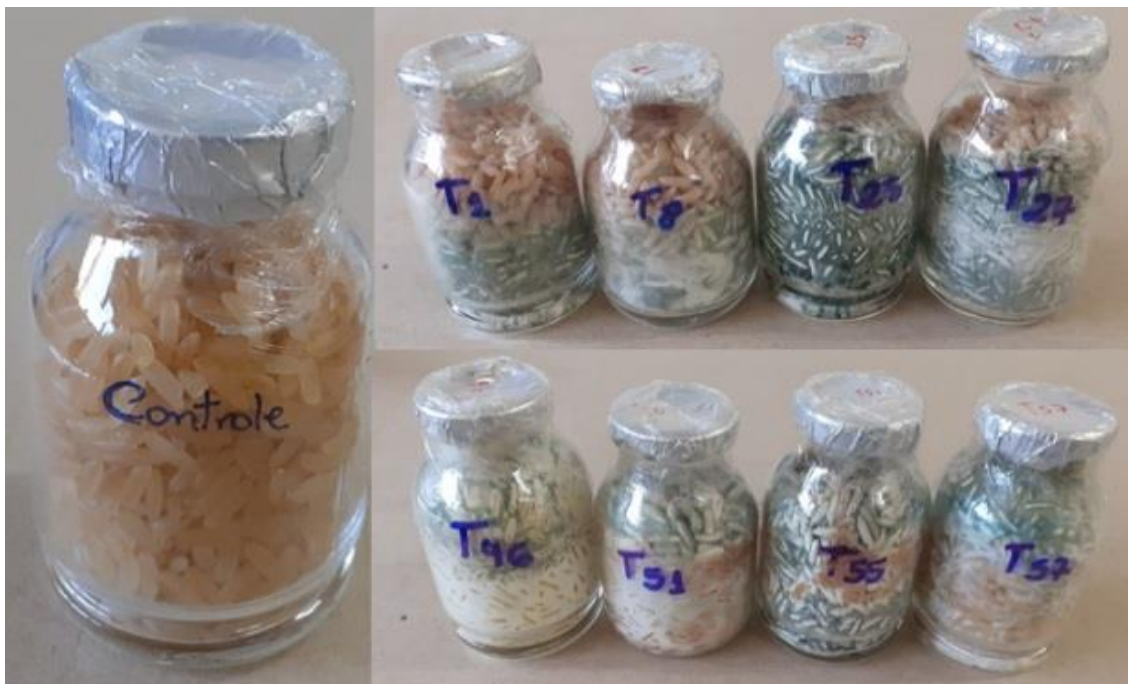


Figura 4: Cultivo das cepas de *Trichoderma* sp em frascos de vidro contendo arroz autoclavado após sete dias.

b. Obtenção de solução de conídios de *Trichoderma* spp.

A solução de conídios de *Trichoderma* spp. foi determinada por meio de diluição de 1g de arroz colonizado em 9 mL de solução salina. A contagem dos conídios foi realizada em microscópio ótico usando câmara de Neubauer e variaram de $2,4 \times 10^9$ a $3,0 \times 10^9$ conídios.

-Teste com aspersão de suspensão de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* nas folhas de plantas de feijão crescidas em solo inoculado com cepas de *Trichoderma* spp.

a. Preparo do solo e cultivo de feijão

Foram distribuídos 300g de solo autoclavado em vasos e o plantio foi realizado com cinco sementes de feijão por vaso com cinco repetições, sendo 25 plantas por tratamento. No sétimo dia após o plantio, grãos de arroz inoculados com as cepas selecionadas de *Trichoderma* spp. foram inseridos em torno da base das plantas na proporção de 2% (p/v) por vaso. Os vasos com as plantas foram acomodados em local com luminosidade natural e em temperatura ambiente. Foram realizadas regas diárias com 50 mL de água da torneira, molhando apenas o solo.

b. Preparo e obtenção da suspensão de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*

O fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi cultivado em erlenmeyer contendo meio MYG (extrato de malte, 0,5%, extrato de levedura, 0,25% e glicose 1,0 %) por dez dias, 110 rpm a 25°C. A suspensão do fitopatógeno foi obtida triturando o micélio em água destilada autoclavada (1g/100ml).

c. Aspersão da suspensão de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*

Quinze dias após o plantio das sementes de feijão, as partes aéreas das plantas de cada vaso foram inoculadas por aspersão, com 10 mL da suspensão aquosa de micélio de *S. sclerotiorum*. Sete dias após a aspersão do fitopatógeno, avaliou-se a severidade da doença, pela estimativa da área foliar lesionada. As plantas foram removidas e lavadas com água corrente. Foram obtidas as medidas do caule até o último nó, da raiz principal, peso total fresco e seco. A área foliar foi obtida através do contorno das folhas do primeiro nó, em papel milimetrado. O peso seco foi obtido após secagem do material vegetal em estufa por 72 horas, a 50°C. O controle foi constituído por arroz umedecido e autoclavado sem *Trichoderma* spp.

d. Avaliação do índice de severidade da doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum*

A severidade da doença foi expressa em porcentagem da área da folha com lesão. A incidência e a severidade da doença foram obtidas, avaliando-se todas as plantas, sendo atribuídas notas de 1-6 conforme mostrado na Tabela 3.

-Teste com inoculação de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo com plantas de feijão, crescidas em solo inoculado com cepas de *Trichoderma* spp.

a. Preparo do solo

Foram adicionados 20g de arroz colonizado pelas cepas de *Trichoderma* spp. em para cada litro de substrato autoclavado e umedecidos com 200mL de água. Os sacos transparentes contendo a mistura (solo e inóculo) foram incubados por sete dias em temperatura ambiente. O controle compreendeu a mistura de arroz autoclavado sem *Trichoderma* spp. Após sete dias o solo contendo a mistura *Trichoderma* sp e arroz, foi homogeneizada e transferida para sacos pretos (600g por saco). O plantio foi feito com 10 sementes de feijão 'carioca' por saco para cada tratamento. As soluções de conídios das cepas de *Trichoderma* spp foram obtidas como descrito no item anterior.

b. Preparo e obtenção de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*

O fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi cultivado em placas contendo meio de cultura BDA por sete dias a 25°C. Discos de 0,5cm contendo micélio do fungo foram obtidos para o teste com o fitopatógeno no solo.

c. Cultivo de feijão com o fitopatógeno nos vasos

Após o preparo do material (solo, arroz e *Trichoderma*) foram adicionados 10 discos de 0,5cm de diâmetro de meio de cultura contendo micélio de *S. sclerotiorum* por tratamento. Em seguida 10 sementes de feijão 'carioca' foram plantadas em cada um dos tratamentos. O controle I continha arroz umedecido e autoclavado sem *Trichoderma* sp, 10 discos de 0,5cm do micélio de *S. sclerotiorum* e as sementes de feijão, e o controle II apenas arroz umedecido e autoclavado e as 10 sementes de feijão. As plantas foram acomodadas em local com luminosidade natural, arejado e em temperatura ambiente. Após 24 dias do plantio avaliou-se a severidade da doença. As plantas foram removidas e lavadas com água corrente. Foram obtidas também, as medidas do caule até o último nó, da raiz principal, peso total fresco e seco. A área foliar foi obtida através do contorno das folhas do primeiro nó, em papel milimetrado. O peso seco foi obtido após secagem do material vegetal em estufa por 72 horas, a 50°C.

d. Avaliação do índice de severidade da doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum*

A severidade da doença foi expressa em porcentagem da área da folha com lesão. A incidência e a severidade da doença foram obtidas, avaliando-se todas as plantas, sendo atribuídas notas de 1-6 conforme mostrado na Tabela 3, segundo os critérios de Napoleão et al. (2005).

Tabela 3: Notas atribuídas à severidade da doença

Nota	% da doença na planta
1	planta sadia
2	1% a 5%
3	6% a 20%
4	21% a 50%
5	mais de 50%
6	planta morta

$$IS = \frac{\sum_{i=1}^6 (i.n)}{N}$$

IS = índice de severidade,
 i = nota atribuída,
 n = número de plantas na nota,
 N = número total de plantas.

Reisolamento de *Trichoderma* sp de plantas de feijão após o teste com inóculo de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo

Na tentativa de detectar a presença de *Trichoderma* sp como endofítico em plantas de feijão, foi separada uma planta com aspecto saudável (folhas íntegras e coloração verde uniforme) de cada tratamento do teste de índice de severidade da doença com o fitopatógeno no substrato. As plantas foram removidas e lavadas com água corrente. Em câmara de fluxo laminar elas foram esterilizadas com detergente 10% por 3 min, lavadas em água estéril, hipoclorito de sódio 10% por 3 min, lavadas em água estéril e etanol 70% por 3 min. Em seguida, foram lavadas em água estéril por três vezes e secas sobre papel de filtro. Pequenos fragmentos de raízes, caules e folhas, foram depositados em placas de Petri contendo BDA (Fig 5) e incubados a 28° C. As colônias foram isoladas e posteriormente caracterizadas morfológicamente sendo identificadas as características do gênero segundo Riddell (1950) & Rifai (11209). Foram consideradas também, as características macroscópicas como cor e textura do verso e reverso da superfície da colônia, presença ou ausência de pigmentação e padrão de crescimento e esporulação. Os caracteres microscópicos foram analisados quanto à morfologia, tamanho e disposição

dos conídios e das fiálides, utilizando lamínulas preparadas sobre meio de cultura, coradas em azul sobre lâminas.

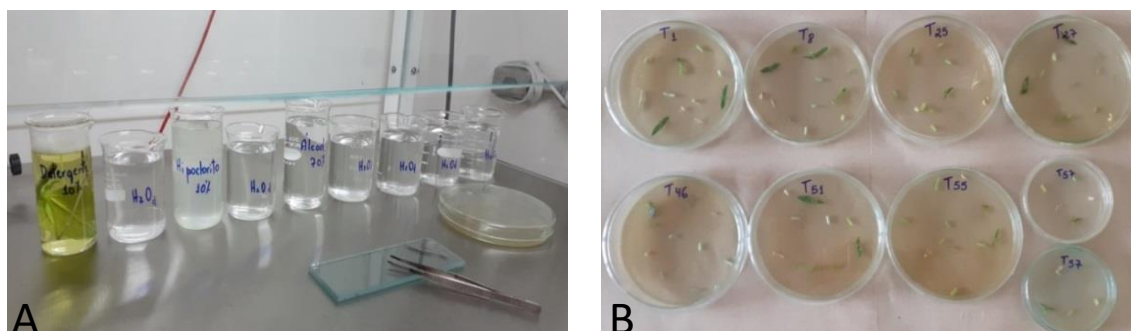


Figura 5. A - Sequência da assepsia das plantas em e B- pequenos fragmentos das plantas depositados sobre o meio de cultura BDA.

Teste de hiperparasitismo

Foram preparadas placas com meio BDA e inoculadas com o fitopatógeno. Após 30 dias de incubação a 28° C os escleródios foram removidos, secos ao ar por 24 horas e transferidos para a superfície de 250 g de amostras de solo autoclavado com umidade ajustada para 100% da capacidade de campo, espalhada uniformemente em caixas transparentes de 12x8x5 cm. Cada caixa recebeu 15 escleródios e para avaliar a ação das cepas de *Trichoderma* sp, cada caixa de escleródios do fitopatógeno foi pulverizada com 10 mL da suspensão de conídios de cada *Trichoderma* sp a uma concentração de 2×10^6 mL⁻¹. As caixas foram incubadas a 25 ± 2 °C, luz/escuro (12/12h) por 15 dias (Fig 6). O substrato foi mantido com umidade borrifando-se periodicamente água destilada estéril. Após este período os escleródios foram retirados do substrato e lavados em água corrente e secos sobre papel de filtro. Em seguida foram testados quanto à sua viabilidade.

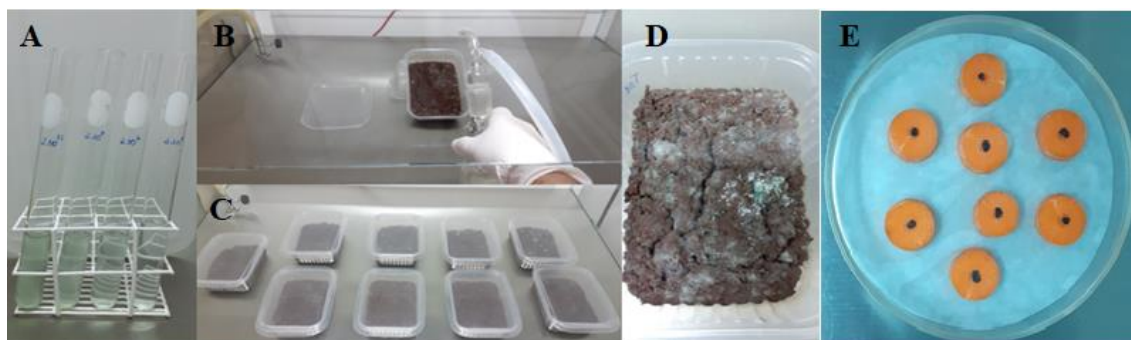


Figura 6. Preparo da solução de esporos (A), pulverização de *Trichoderma* sp (B), caixas contendo escleródios de *S. sclerotiorum* (C), caixa 15 dias após a incubação (D) e escleródios sobre discos de cenoura em placa de Petri (E).

Teste da viabilidade dos escleródios

Após o teste de hiperparasitismo nos escleródios, foi testada a viabilidade deles em placas de Petri, usando discos de cenoura lavados com água autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, a superfície dos escleródios foram desinfetados usando detergente 10% por 3 min, lavados em água estéril, hipoclorito de sódio 10% por 3 min, lavados em água estéril e etanol 70% por 3 min. Em seguida foram lavados em água estéril por três vezes e secos sobre papel de filtro. Posteriormente, as estruturas resistentes foram colocadas sobre discos de cenoura de 0,5 cm de espessura e dispostas em placas de Petri de 90 mm de acordo com Hoes e Huang (1975) (Fig 6 E). Após sete dias de incubação a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, os escleródios foram avaliados quanto à viabilidade assim como o hiperparasitismo por *Trichoderma* spp. Esse experimento realizado duas vezes.

Teste de promoção de crescimento de plantas de feijão

Para avaliar a capacidade de *Trichoderma* spp. promover o crescimento de plantas de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) foram utilizadas as mesmas cepas do teste de hiperparasitismo e severidade da doença (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇).

a. Preparo da solução de conídios

A concentração de conídios de *Trichoderma* spp. foi determinada por meio de diluição de 1 g de arroz colonizado em 10 mL de água destilada estéril. A contagem dos

conídios foi realizada em microscópio ótico usando câmara de Neubauer e variaram de $2,4 \times 10^9$ a $3,0 \times 10^9$ conídios.

b. Preparo do solo

Foram adicionados 20g de arroz colonizado pelas cepas de *Trichoderma* spp. para cada litro de solo autoclavado e umedecidos com 200mL de água. Os sacos transparentes contendo a mistura (solo e inóculo) foram incubados por sete dias em temperatura ambiente. O controle compreendeu a mistura de arroz autoclavado sem *Trichoderma* spp. Após este período, a mistura foi homogeneizada e distribuída em vasos (300 g por vaso). O plantio foi feito com cinco sementes de feijão 'carioca' por vaso, sendo cinco repetições, no total de 25 plantas por tratamento. A duração do teste foi de 15 dias. As plantas foram removidas e lavadas com água corrente e após secagem foram obtidas as medidas do caule até o último nó, da raiz principal, peso total fresco e seco. A área foliar foi obtida através do contorno das folhas do primeiro nó, em papel milimetrado O peso seco foi obtido após secagem do material vegetal em estufa por 72 horas, a 50°C. As soluções de conídios das cepas de *Trichoderma* spp foram obtidas como descrito no teste de hiperparasitismo.

Análise de metabólitos voláteis de cepas de *Trichoderma* spp. por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

As cepas de *Trichoderma* T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ foram testados contra o *Sclerotinia sclerotiorum*. As cepas *Trichoderma* sp e do fitopatógeno, foram inoculadas no centro de placas de Petri (90 mm) contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA). As placas contendo os fungos foram posicionadas uma sobre a outra, ambos na forma de discos (0,5 cm). Lateralmente, as tampas foram vedadas com parafilme e incubadas a temperatura de 28°C, por sete dias (Bharat et al.1980). O teste foi realizado em quatro repetições, com placas testemunhas do fitopatógeno, do *Trichoderma* sp e do meio de cultura. Após 168 horas os compostos voláteis extraídos por micro-extração em fase sólida utilizando fibra de polidimetil siloxano (PDMS, 100µm, Sulpelco), sendo que a fibra foi mantida exposta nas culturas por 50 min para a extração e subsequentemente foram desorvidas na câmara de injeção do espectrômetro de massas para as análises por CG-EM. As amostras foram analisadas utilizando um sistema Shimadzu QP2010

acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização por elétrons operando a 70 eV. A coluna cromatográfica foi uma Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 mm). Hélio foi utilizado como gás carreador com pressão de 86,7 kPa e vazão de 1,40 mL/min. A temperatura no injetor foi de 220°C, a fibra foi mantida exposta na câmara de injeção por 5 min e as injeções foram realizadas com split 1:5. A temperatura do forno foi programada para variar de 60°C a 240°C com taxa de aquecimento de 3°C/min.

RESULTADOS

Teste de antagonismo em confrontação direta das cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Neste trabalho foi avaliado o potencial de 57 cepas de *Trichoderma* spp. em inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* através de ensaios de antagonismo direto e os resultados com as frequências e suas classes podem ser observados na Fig 7. Considerando os critérios de Bell et al. (1982) todas as cepas de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno apresentando resultados significativos. As cepas exibiram notas entre 1,5 e 2,0 e as médias das porcentagens de inibição variaram entre 69,8% (T₃₆) a 84,3% (T₂₃). A média geral de inibição foi 78,6 %, a partir de nove repetições para cada tratamento. O crescimento micelial do fitopatógeno, foi significativamente afetado durante o teste de confrontação direta com todas as cepas de *Trichoderma* spp. indicando que tais cepas foram bastante eficientes no controle de *S. sclerotiorum*, após 120 horas de cultivo (Fig 7).

Observou-se que nas placas onde o fitopatógeno produziu escleródios como por exemplo com T₁, T₂₅ e T₅₅ (Fig 8) o crescimento das cepas de *Trichoderma* foram maiores e mais rápidos, com porcentagens de inibição variando entre 80 a 84,9% (Tab. 4). Nos cultivos em lâminas foram observadas também, projeções de hifas diferenciadas (apressórios), envolvendo as hifas do fitopatógeno (Fig 9A) enquanto que lâminas preparadas apenas com o fitopatógeno, não apresentaram estas estruturas (Fig 9B). Os micélios não confrontados com *Trichoderma* sp (controle), germinaram sobre toda a superfície do meio de cultura (100%), enquanto que a maioria dos tratamentos reduziram significativamente a germinação de *S. sclerotiorum* para menos de 20%. Ressalta-se que as cepas T₃₆, T₅₄ e T₅₇ reduziram o crescimento micelial para menos de 10%, além de retardar o início do crescimento em placa em 48 e 72 horas respectivamente (Fig 10).

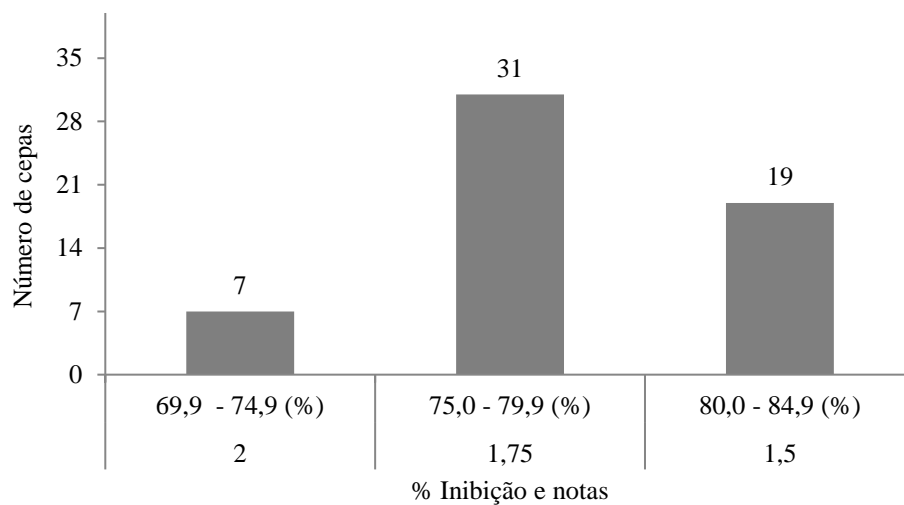


Figura 7: Resultado do teste de antagonismo com 57 cepas de *Trichoderma* sp em confrontação direta com *S. sclerotiorum* após 120 horas de cultivo. A Figura mostra as frequências das cepas (N), suas classes em (%) de inibição de crescimento do fitopatógeno e as notas obtidas, segundo critérios de Bell et al. (1982).

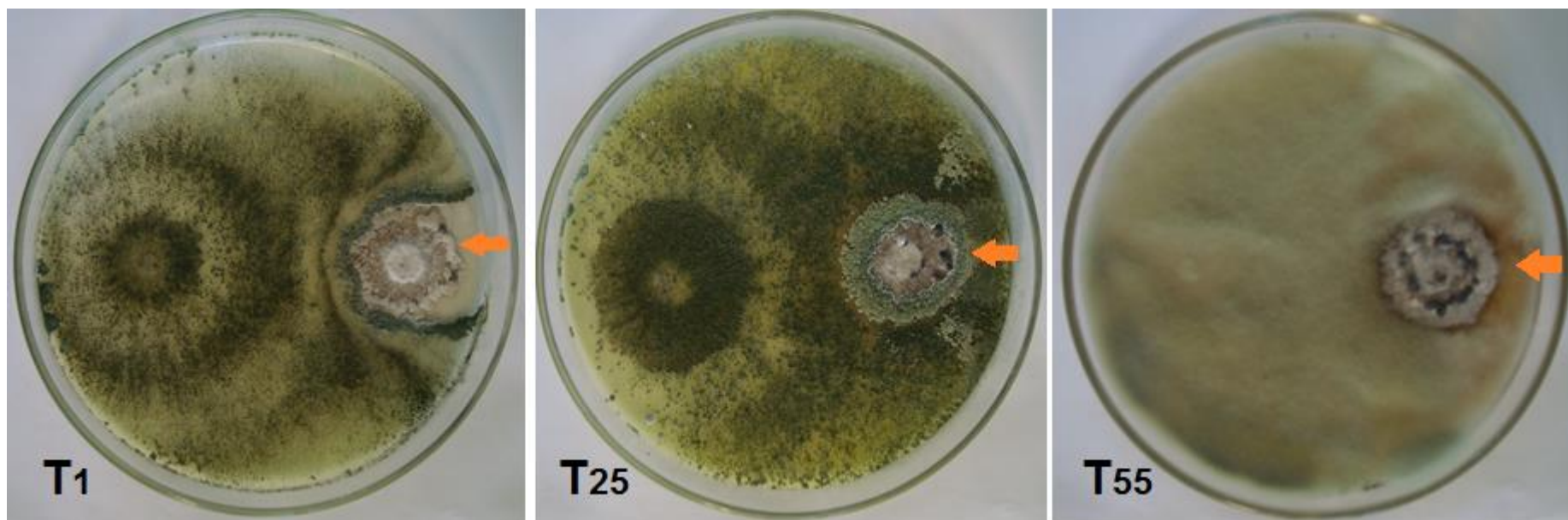


Figura 8: A seta aponta escleródios (pontos escuros) do fitopatógeno (*S. sclerotiorum*), nas placas de pareamento de confrontação direta com as cepas de *Trichoderma* sp T1, T25 e T55.

Tabela 4. Resultado do experimento de confrontação direta de 57 cepas do gênero *Trichoderma* com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Os resultados são mostrados em % de inibição de crescimento após 120 horas de incubação.

Tratamentos	% inibição
T36	69.872222 a1
T35	72.052222 a2
T22	72.513333 a2 a3
T31	73.841111 a2 a3 a4
T37	74.116667 a3 a4
T28	74.118889 a3 a4
T10	74.331111 a3 a4 a5
T42	75.124444 a4 a5 a6
T29	75.377778 a4 a5 a6
T38	75.120111 a5 a6 a7
T19	76.068889 a5 a6 a7
T39	76.118889 a5 a6 a7
T20	76.431111 a6 a7
T2	76.442222 a6 a7
T32	76.873333 a6 a7 a8
T18	76.880000 a6 a7 a8 a9
T21	77.317778 a7 a8 a9 a10
T44	77.607778 a7 a8 a9 a10 a11
T4	78.360000 a8 a9 a10 a11 a12
T6	78.547778 a8 a9 a10 a11 a12 a13
T14	78.553333 a8 a9 a10 a11 a12 a13
T48	78.555556 a8 a9 a10 a11 a12 a13
T50	78.711111 a9 a10 a11 a12 a13 a14
T43	78.732222 a10 a11 a12 a13 a14
T3	78.750000 a10 a11 a12 a13 a14
T41	78.918889 a10 a11 a12 a13 a14 a15
T26	78.940000 a10 a11 a12 a13 a14 a15
T49	78.955556 a10 a11 a12 a13 a14 a15
T16	79.058889 a10 a11 a12 a13 a14 a15
T33	79.086667 a10 a11 a12 a13 a14 a15
T34	79.097778 a10 a11 a12 a13 a14 a15
T46	79.103333 a10 a11 a12 a13 a14 a15
T47	79.216667 a11 a12 a13 a14 a15 a16
T5	79.265556 a11 a12 a13 a14 a15 a16 a17
T15	79.444444 a12 a13 a14 a15 a16 a17 a18
T30	79.793333 a12 a13 a14 a15 a16 a17 a18 a19
T53	79.814444 a12 a13 a14 a15 a16 a17 a18 a19
T8	79.903333 a12 a13 a14 a15 a16 a17 a18 a19
T7	80.005556 a12 a13 a14 a15 a16 a17 a18 a19
T52	80.071111 a12 a13 a14 a15 a16 a17 a18 a19
T40	80.353333 a13 a14 a15 a16 a17 a18 a19 a20
T11	80.480000 a14 a15 a16 a17 a18 a19 a20 a21
T9	80.672222 a15 a16 a17 a18 a19 a20 a21 a22
T1	80.705556 a15 a16 a17 a18 a19 a20 a21 a22 a23
T56	81.026667 a16 a17 a18 a19 a20 a21 a22 a23
T24	81.065556 a17 a18 a19 a20 a21 a22 a23
T51	81.246667 a18 a19 a20 a21 a22 a23 a24
T25	81.316667 a19 a20 a21 a22 a23 a24
T23	81.577778 a19 a20 a21 a22 a23 a24
T54	81.998889 a20 a21 a22 a23 a24
T13	82.125556 a20 a21 a22 a23 a24
T27	82.182222 a20 a21 a22 a23 a24
T12	82.281111 a21 a22 a23 a24
T17	82.363333 a22 a23 a24
T55	82.521111 a23 a24 a25
T45	82.921111 a24 a25
T57	84.331111 a25

CV (%) = 1.21

P ≤ 0,0001

Números iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 1% de probabilidade entre os tratamentos submetidos ao teste de confrontação direta.

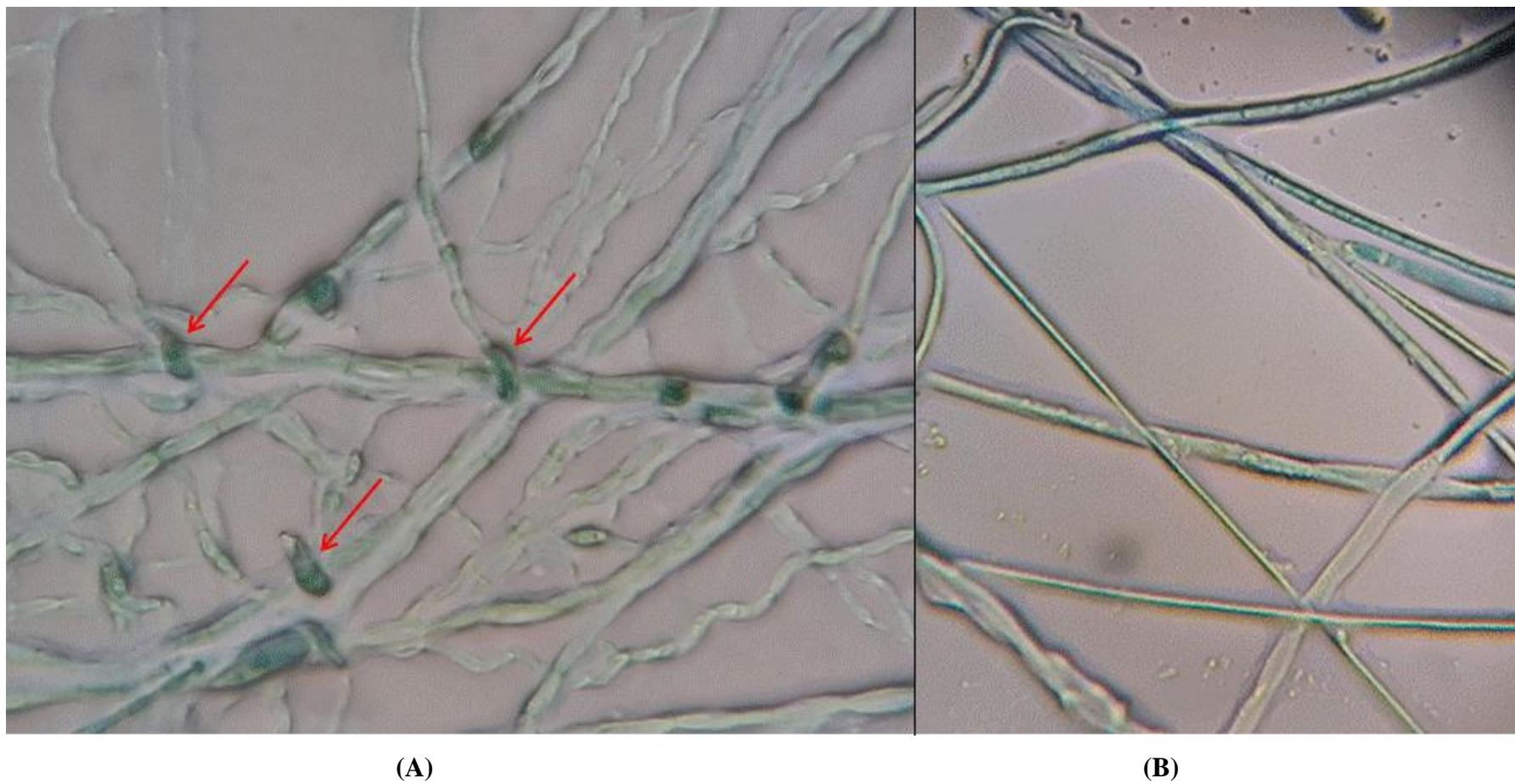


Figura 9: (A) *Trichoderma* sp (T₅₇) parasitando hifas de *S. sclerotiorum*. As setas apontam para os apressórios de *Trichoderma* envolvendo as hifas do fitopatógeno (40x) e (B) Hifas de *S. sclerotiorum* sem a presença de *Trichoderma* sp (40x).

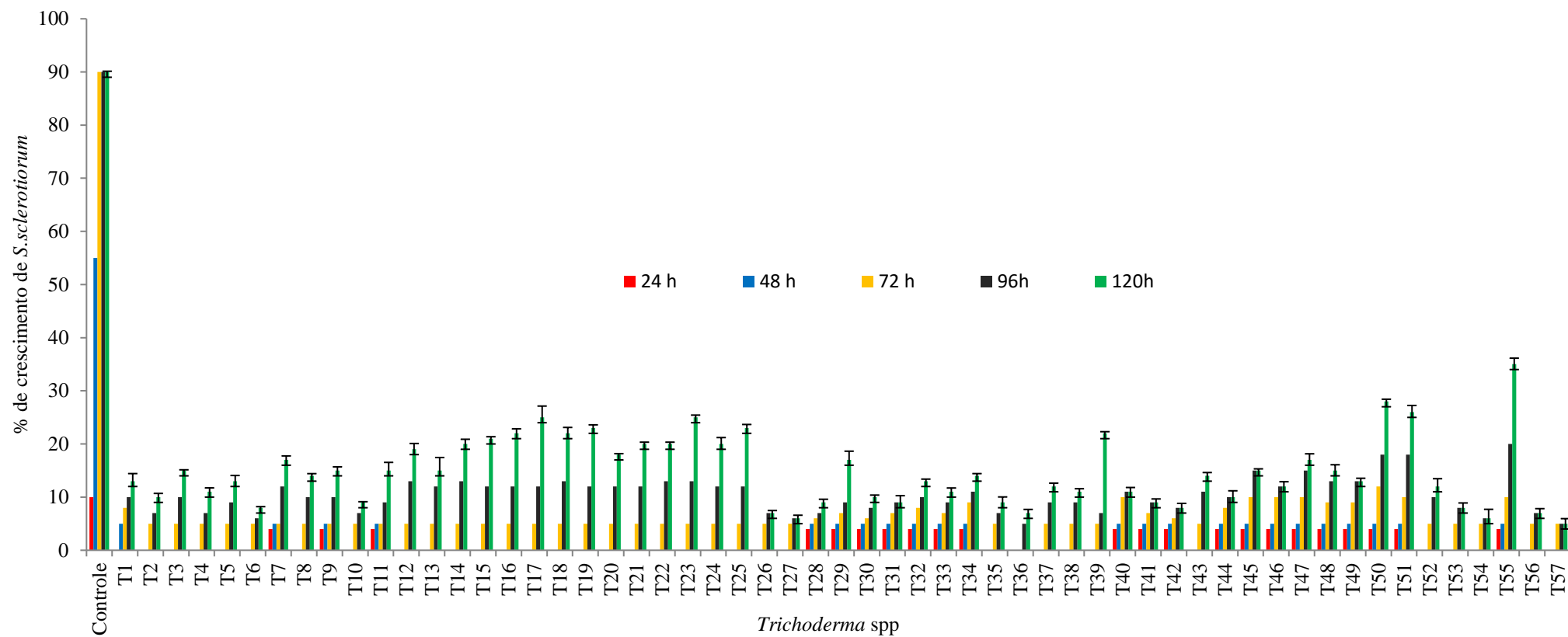


Figura 10: Porcentagem de crescimento de *S. sclerotiorum* em relação ao controle, durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas, no teste de confrontação direta com as 57 cepas de *Trichoderma* spp. Média de 9 repetições.

Foram selecionados oito cepas de *Trichoderma* (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇) apenas com intuito de avaliar e confirmar o potencial de inibição de crescimento dos mesmos com relação a outros fitopatógenos: *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* sp e *Rhizoctonia solani*. Os resultados obtidos foram significativos e as porcentagens de inibição de crescimento dos fitopatógenos ficaram entre 58,5% e 86,0%, sendo as maiores inibições obtidas nos ensaios realizados com a cepa T₅₇ sobre *Fusarium* sp (Fig 11). Após 120 horas, as hifas de *Trichoderma* spp. entraram em contato com o fitopatógeno e cresceram sobre ele. (Fig 12).

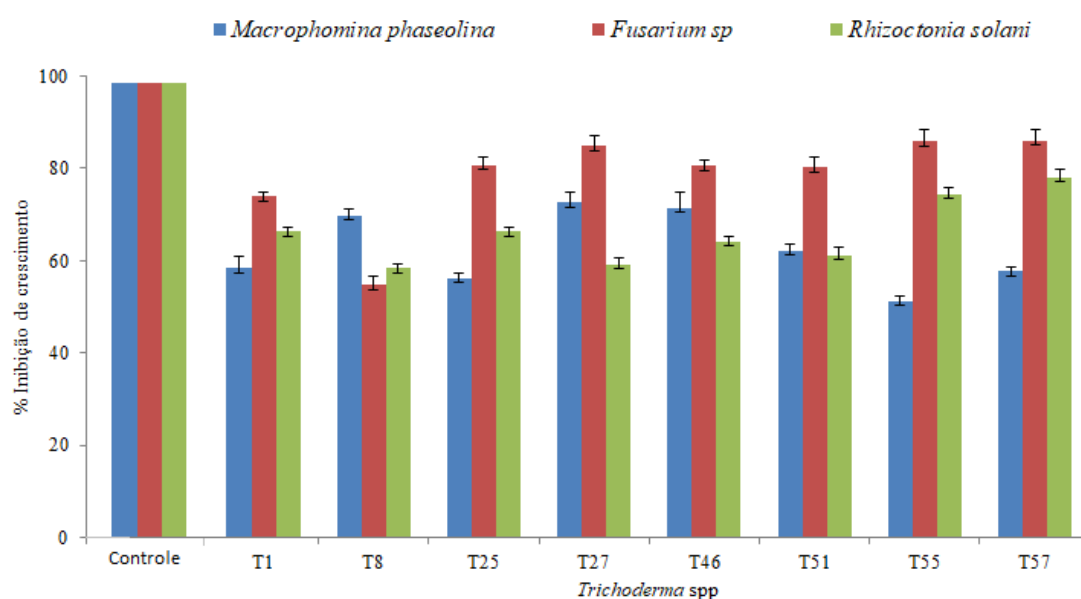
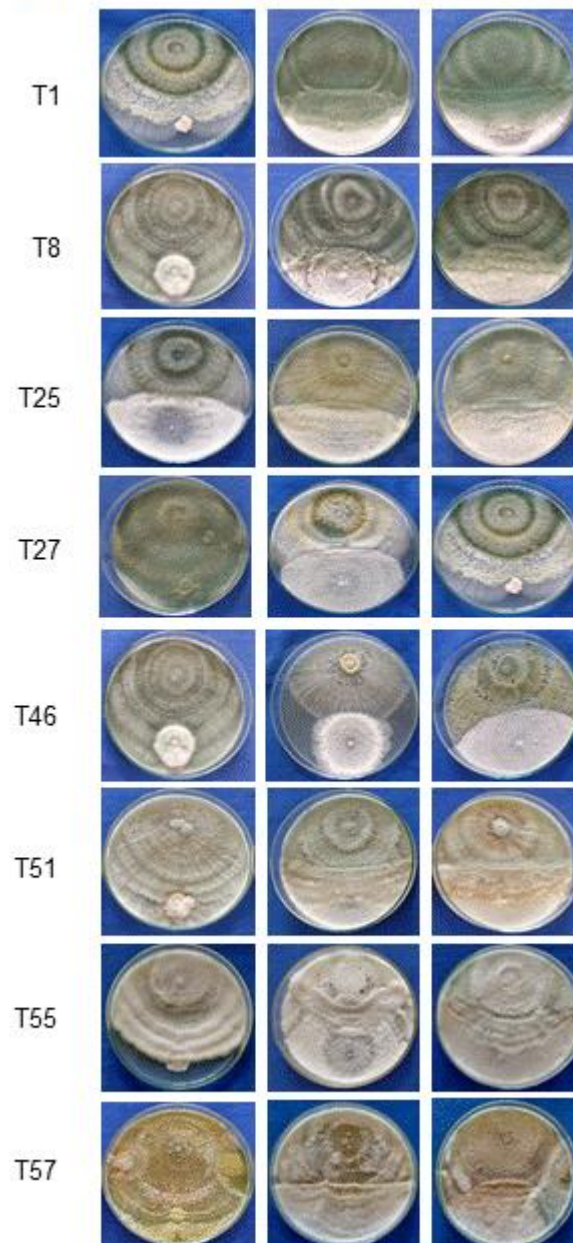


Figura 11: Resultados do antagonismo em confrontação direta e das placas controle dos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* sp e *Rhizoctonia solani*, após 120 horas de cultivo, com média de três repetições. Foram testadas as cepas T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇ de *Trichoderma* spp.

(A) *Fusarium* sp - *M. phaseolina* - *R. solani*



(B) *Fusarium* sp *M. phaseolina* *R. solani*

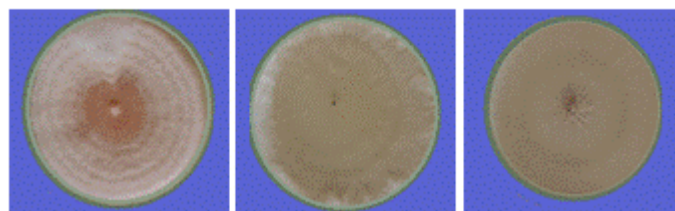


Figura 12: (A) Teste de antagonismo em confrontação direta de *Trichoderma* spp. (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇) - colônias superiores e fitopatógenos – colônias inferiores das placas e (B) placas controles dos fitopatógenos *M. phaseolina*, *Fusarium* sp e *R. solani*, após 120 horas de cultivo.

Nos testes de antagonismo com *Rhizoctonia solani*, foi observada a produção de um pigmento alaranjado por algumas cepas de *Trichoderma* spp. (T₅₁, T₅₅ e T₅₇). Estes apresentaram também uma faixa de coloração mais intensa coincidente com a zona de confronto e sobreposição de hifas de *Trichoderma* sp sobre o fitopatógeno (Fig 13).

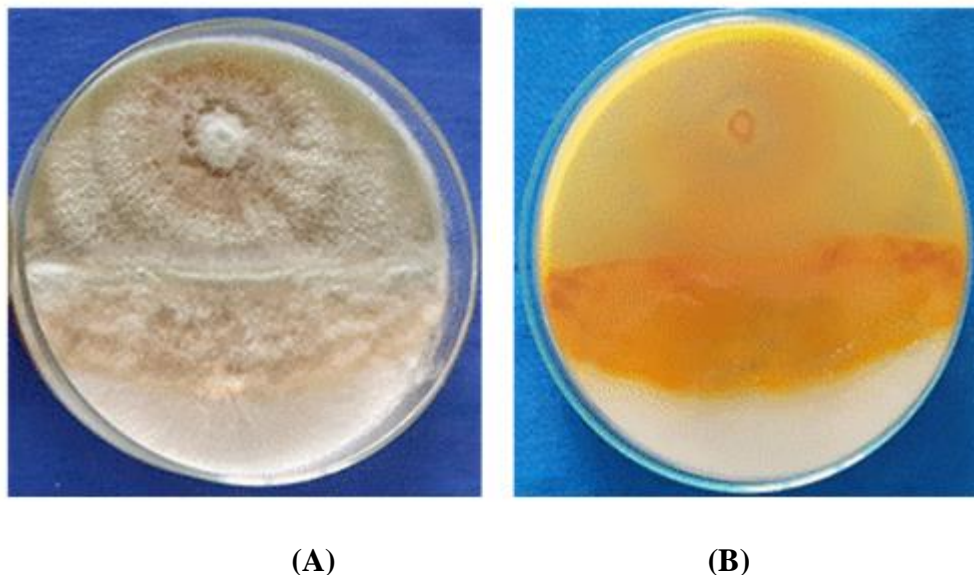


Figura 13: (A) Foto da placa do teste de confrontação direta (T₅₁ x *R. solani*) e (B) foto do seu reverso mostrando a produção de pigmento laranja, com uma zona de coloração mais intensa.

Teste de antagonismo em confrontação indireta e avaliação do efeito de metabólitos voláteis das cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

Os resultados dos efeitos dos metabólitos voláteis das cepas de *Trichoderma* spp sobre *Sclerotinia sclerotiorum* são mostrados, considerando os critérios de Bell et al. (1982) (Fig 14). Todas as cepas exibiram notas $\leq 2,5$ e podem ser consideradas antagonistas eficientes. As porcentagens de inibição do crescimento do fitopatógeno variaram entre 60,9% (T₅₅) e 92% (T₂₅), após 120 horas de cultivo (Tabela 5). O teste com a cepa T₂₅ pode ser observado na Fig 15.

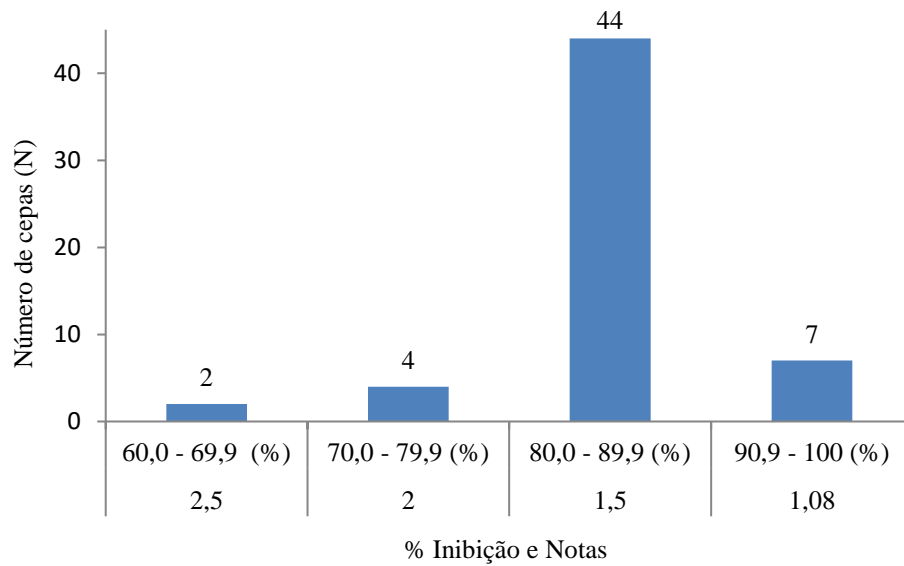


Figura 14: Porcentagem de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*, quando exposto ao teste de produção de voláteis produzidos por 57 cepas de *Trichoderma* sp após 120 horas de cultivo (N) = frequências das cepas, classes em (%) de inibição de crescimento do fitopatógeno e notas obtidas, segundo critérios de Bell et al. (1982).

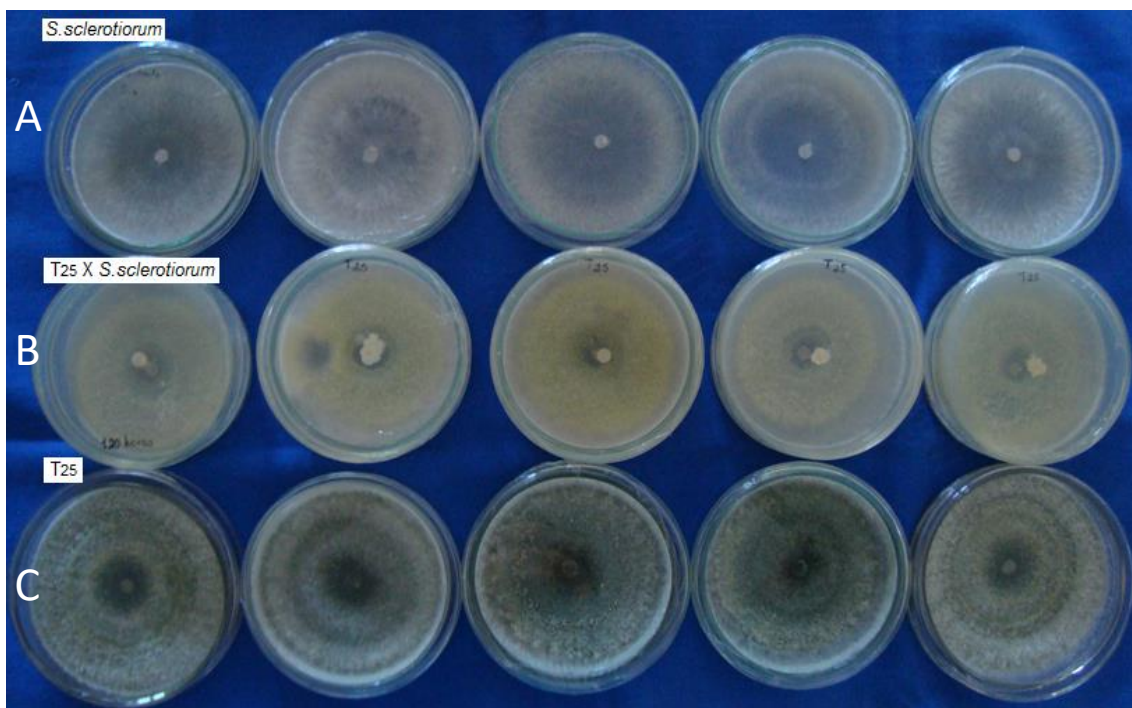


Figura 15: Exemplo dos ensaios de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* através da produção de metabólitos voláteis por cepas de *Trichoderma* spp. A - O fitopatógeno sem antagonista, B - o fitopatógeno pareado com o isolado T₂₅ e C - *Trichoderma* T₂₅. N=5.

Tabela 5. Resultado do experimento de confrontação indireta de 57 cepas do gênero *Trichoderma* com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Os resultados são mostrados em % de inibição de crescimento após 120 horas de incubação.

Tratamentos	% inibição	
T55	60.922222	a1
T50	69.176667	a2
T51	71.468889	a2
T39	77.555556	a3
T12	77.572222	a3
T20	77.678889	a3
T27	80.816667	a4
T47	81.408889	a4 a5
T7	81.851111	a4 a5
T3	82.523333	a4 a5 a6
T48	82.570000	a4 a5 a6
T9	82.680000	a4 a5 a6
T34	82.772222	a4 a5 a6
T21	82.778889	a4 a5 a6
T46	82.990000	a4 a5 a6 a7
T11	83.072222	a4 a5 a6 a7
T32	83.666667	a4 a5 a6 a7 a8
T8	83.828889	a5 a6 a7 a8 a9
T43	83.880000	a5 a6 a7 a8 a9
T45	84.264444	a5 a6 a7 a8 a9 a10
T5	84.882222	a6 a7 a8 a9 a10 a11
T49	84.120555	a6 a7 a8 a9 a10 a11
T23	85.051111	a6 a7 a8 a9 a10 a11
T18	85.257778	a6 a7 a8 a9 a10 a11
T30	85.267778	a6 a7 a8 a9 a10 a11
T1	85.388889	a6 a7 a8 a9 a10 a11 a12
T40	85.803333	a7 a8 a9 a10 a11 a12 a13
T52	86.371111	a8 a9 a10 a11 a12 a13
T44	86.721111	a9 a10 a11 a12 a13 a14
T16	86.911111	a10 a11 a12 a13 a14 a15
T10	87.117778	a10 a11 a12 a13 a14 a15
T4	87.248889	a11 a12 a13 a14 a15
T38	87.545556	a11 a12 a13 a14 a15 a16
T13	87.561111	a11 a12 a13 a14 a15 a16
T37	87.641111	a11 a12 a13 a14 a15 a16
T17	87.746667	a11 a12 a13 a14 a15 a16
T31	88.294444	a12 a13 a14 a15 a16
T28	88.368889	a13 a14 a15 a16
T29	88.375556	a13 a14 a15 a16
T15	88.391111	a13 a14 a15 a16
T2	88.484444	a13 a14 a15 a16
T14	88.412066	a13 a14 a15 a16
T22	88.566667	a13 a14 a15 a16
T41	88.586667	a13 a14 a15 a16 a17
T19	88.643333	a13 a14 a15 a16 a17
T35	89.444444	a14 a15 a16 a17 a18
T42	89.467778	a14 a15 a16 a17 a18
T26	89.604444	a14 a15 a16 a17 a18
T53	89.753333	a15 a16 a17 a18 a19
T33	90.261111	a16 a17 a18 a19 a20
T6	90.470000	a16 a17 a18 a19 a20 a21
T24	91.540000	a17 a18 a19 a20 a21
T56	92.017778	a18 a19 a20 a21
T54	92.048889	a18 a19 a20 a21
T36	92.683333	a19 a20 a21
T57	92.776667	a20 a21
T25	93.363333	a21

CV (%) = 1.81 P ≤ 0,0001

Números iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 1% de probabilidade entre os tratamentos submetidos ao teste de inibição de crescimento do fitopatógeno pela produção de compostos voláteis.

Detecção e medida da atividade de enzimas degradadoras de parede celular produzidas por cepas de *Trichoderma* spp.

Todas as 57 cepas de *Trichoderma* spp. secretaram as enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs), quando cultivadas na presença de micélio liofilizado e macerado de *Sclerotinia sclerotiorum* (Fig 18). As atividades específicas das diferentes enzimas variaram entre as cepas, sendo que a maior atividade específica quantificada foi da enzima β -1,3- glucanase, exibida pelo isolado T₈ (5,30 U.mg⁻¹), seguida por T₅₇, T₁₇, T₅₆, T₁₃ T₁₄ T₂₀ e T₄₅ (4,50 U.mg⁻¹). Com relação à NAGase, de modo geral, a atividade específica foi $\leq 0,9$ U.mg⁻¹ e as maiores atividades ficaram em torno 1,40 U.mg⁻¹, sendo apresentadas pelas cepas T₁₈ e T₃₀.

Comparando os perfis de protease, as cepas T₇, T₁₉, T₂₆, T₂₇, T₂₈, T₃₀, T₃₁, T₃₄, T₄₅, T₅₁ e T₅₅ apresentaram atividade em torno de 2,50 U.mg⁻¹, enquanto que T₂₀, T₂₁, T₂₂, T₂₄ e T₃₇ apresentaram atividade em torno de 3,30 U.mg⁻¹. Os melhores resultados de atividade proteásica foram aqueles obtidos com as cepas T₂₃ (4,20 U.mg⁻¹) e T₅₇ (5,4 U.mg⁻¹) (Fig 16).

A atividade específica da fosfatase ácida variou entre as cepas e os maiores valores ficaram entre 0,100 U.mg⁻¹ e 0,130 U.mg⁻¹, apresentados pelas cepas T₄₄, T₅₃, T₄₁, T₂₉ e T₁₅. Para a atividade quitinásica as cepas T₁₈, T₂₄, T₄₅ e T₄₉ apresentaram atividades entre 0,100 U.mg⁻¹ e 0,150 U.mg⁻¹ (Fig 17).

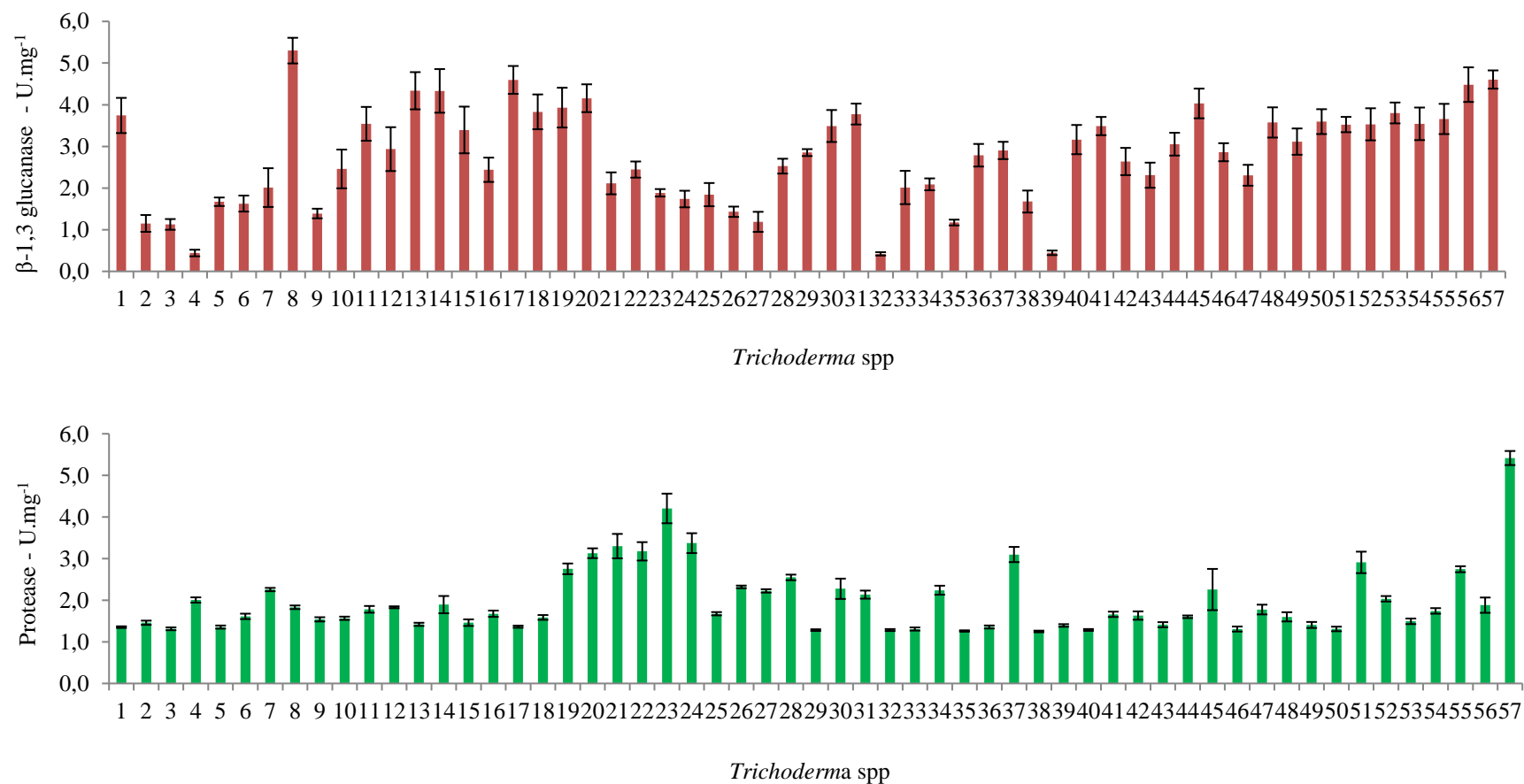


Figura 16: Atividade específica (em U.mg⁻¹ de proteína) das enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs) das 57 cepas de *Trichoderma*, sendo: β -1,3- glucanase e proteases, dos filtrados de cultura das cepas crescidas na presença de micélio liofilizado de *Sclerotinia sclerotiorum*.

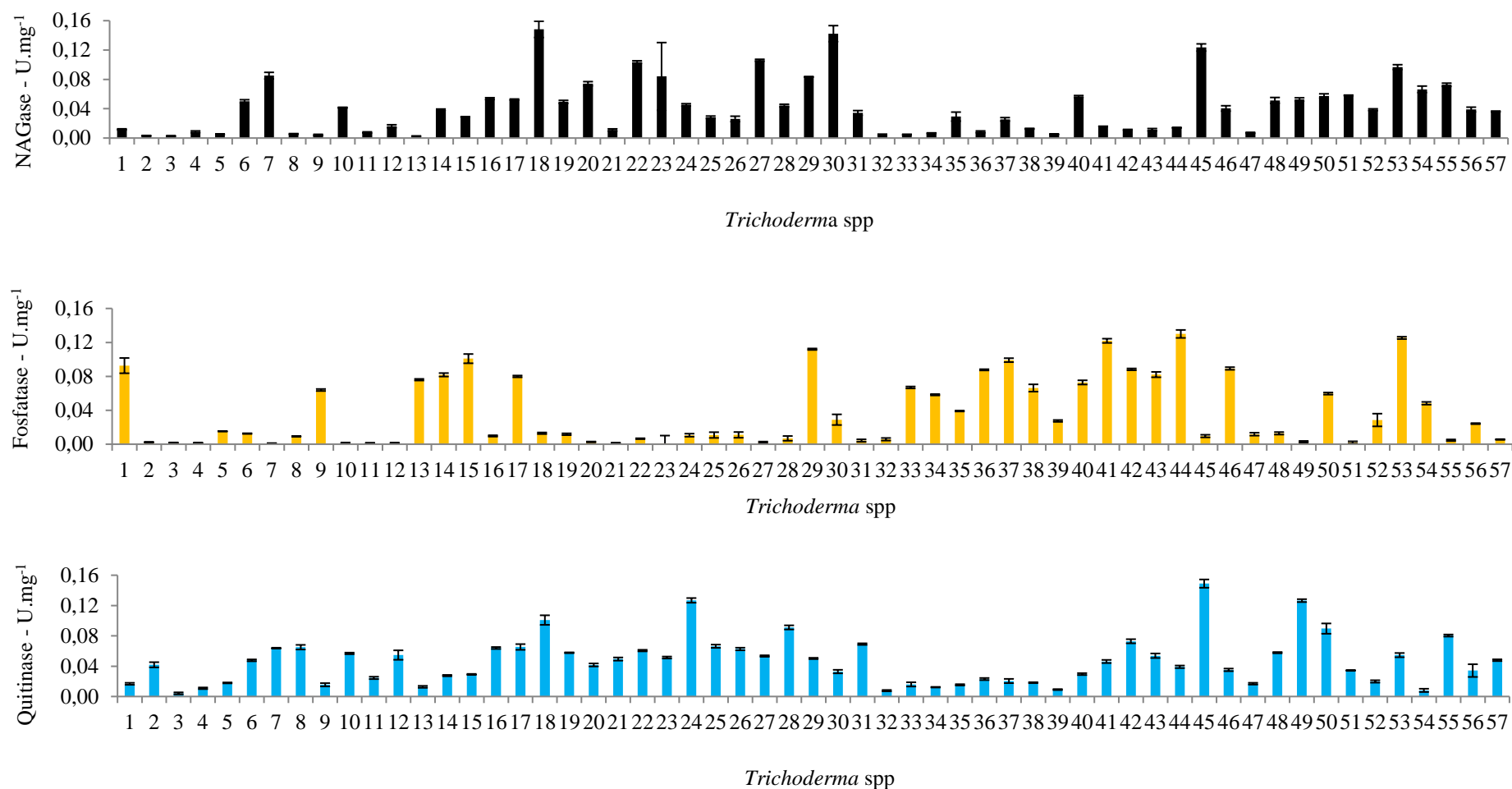
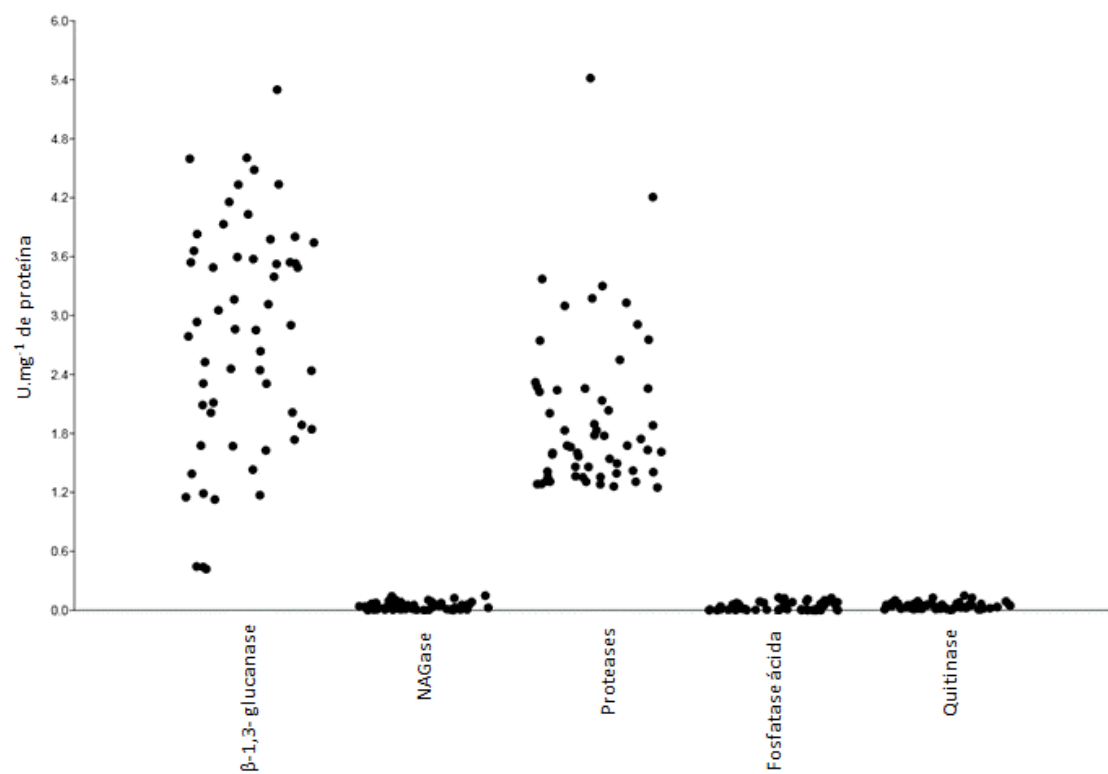


Figura 16: Atividade específica (em U.mg⁻¹ de proteína) das enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs) das 57 cepas de *Trichoderma*, sendo: NAGase, proteases, fosfatase ácida e quitinase, dos filtrados de cultura das cepas crescidas na presença de micélio liofilizado de *Sclerotinia sclerotiorum*.



Figuras 17: Perfil da atividade específica (em U.mg⁻¹ de proteína) das enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs) das 57 cepas de *Trichoderma* spp. β-1,3- glucanase, NAGase, proteases, fosfatase ácida e quitinase.

Promoção do crescimento e severidade da doença mofo branco em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) tratadas com esporos e micélios de *Sclerotinia sclerotiorum*

Nos experimentos descritos abaixo, 6 g de grãos de arroz inoculados com as cepas de *Trichoderma* spp. foram inseridos em torno da base das plantas, em cada vaso, sete dias após o plantio das sementes de feijão. Para avaliar a capacidade de *Trichoderma* sp em proteger as plantas de feijão, foram testadas oito cepas (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇), selecionadas com base nos resultados obtidos nos ensaios de inibição do crescimento de fitopatógenos, atividade enzimática, locais de origem e características culturais das cepas em diferentes meios de cultura. Sendo:

MEA – extrato de malte e ágar

CYA – extrato de levedura e ágar

BDA – batata, dextrose e ágar

T₁ – *Trichoderma* sp- endofítico isolado de folhas de *Vochysia divergens*

T₈, *Trichoderma* sp – endofítico isolado de folhas de *Brachiaria brizanta*

T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ – endofíticos isolados de raízes de *Aspilia grazielae*

a. Plantas de feijão nebulizadas com solução de esporos de *S. sclerotiorum*

As variáveis analisadas foram o peso fresco, peso seco, comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total e área foliar, cujos dados numéricos são apresentados na Tab. 6 e os resultados obtidos em termos de peso fresco e seco estão na Fig 20. As plantas tratadas com a cepa T₅₅ apresentaram o maior valor médio de peso seco, não diferindo estatisticamente de T₂₅ e T₅₇, mas com valores diferentes das plantas tratadas com as cepas T₁, T₈, T₄₆ e controle. Ao final do experimento, as plantas tratadas com T₄₆ apresentaram o menor valor médio de peso fresco e seco, sendo que neste tratamento, seis sementes de feijão não germinaram.

Os tratamentos com T₅₅ e T₅₇ apresentaram os maiores valores de peso fresco, quando comparados com o controle. As plantas do tratamento T₄₆ apresentaram o menor peso fresco e diferiram dos outros tratamentos e do controle (Fig 18). As médias do comprimento do caule foram maiores nos tratamentos com T₂₅, T₅₁ e T₅₇. Já os demais tratamentos e o controle não diferiram entre si. Os maiores valores de comprimento total da planta foram obtidos nos tratamentos com T₁, T₂₅, T₂₇, T₅₅ e T₅₇. Aparentemente,

nenhuma das cepas de *Trichoderma* aumentaram a área foliar não diferindo do controle e observou-se uma diminuição desta área em alguns tratamentos (Tab 6).

O tratamento com a cepa T₄₆ diferiu de todos os outros em todas as variáveis analisadas (Fig 19) e houve um decréscimo nos valores das variáveis analisadas com plantas de feijão.

Tabela 6. Média dos valores obtidos das variáveis peso fresco, peso seco, comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total e área foliar no teste de promoção de crescimento em plantas de feijão, com aspersão do fitopatógeno (*S. sclerotiorum*) nas folhas e tratamento com diferentes cepas de *Trichoderma* sp no substrato.

Fitopatógeno na parte aérea	Controle	T ₁	T ₈	T ₂₅	T ₂₇	T ₄₆ [*]	T ₅₁	T ₅₅	T ₅₇
P fresco	1,10 ± 0,09BC	0,98 ± 0,08CD	0,92 ± 0,18D	1,15 ± 0,18B	1,11 ± 0,17BC	0,52 ± 0,36E	1,18 ± 0,08B	1,55 ± 0,15A	1,52 ± 0,10A
P seco	0,10 ± 0,00c	0,10 ± 0,00c	0,10 ± 0,00c	0,13 ± 0,01ab	0,12 ± 0,01b	0,04 ± 0,03d	0,11 ± 0,00bc	0,13 ± 0,00a	0,12 ± 0,01ab
C caule	15,52 ± 1,95ab	13,44 ± 3,46bc	13,98 ± 2,90bc	15,78 ± 2,70ab	16,90 ± 2,30a	4,14 ± 4,50d	12,92 ± 3,86bc	16,84 ± 3,32a	16,92 ± 2,59a
C Raíz	6,81 ± 2,16de	13,12 ± 4,38ab	10,02 ± 3,19bcd	13,13 ± 4,90ab	14,06 ± 5,00a	4,48 ± 3,82e	7,92 ± 2,61cd	11,76 ± 3,75ab	10,70 ± 3,91abc
Comp total	22,32 ± 3,28cd	26,56 ± 4,32abc	24,00 ± 4,120bcd	28,92 ± 6,91a	30,88 ± 5,93a	8,62 ± 7,29e	20,84 ± 4,89d	28,60 ± 4,98a	27,62 ± 4,120ab
Área foliar	15,90 ± 0,78a	8,03 ± 3,18c	13,54 ± 1,21b	15,15 ± 1,2ab	16,63 ± 1,00a	5,59 ± 4,09d	17,32 ± 1,94a	17,10 ± 2,98a	16,64 ± 2,10a

C: ausência de *Trichoderma* sp e do fitopatógeno. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre o controle e os tratamentos. O asterisco (*) corresponde ao tratamento que diferiu de todos os outros. Peso fresco (P fresco), peso seco (P seco), comprimento do caule (C caule), comprimento da raiz (C raíz), comprimento total (C total) e área foliar.

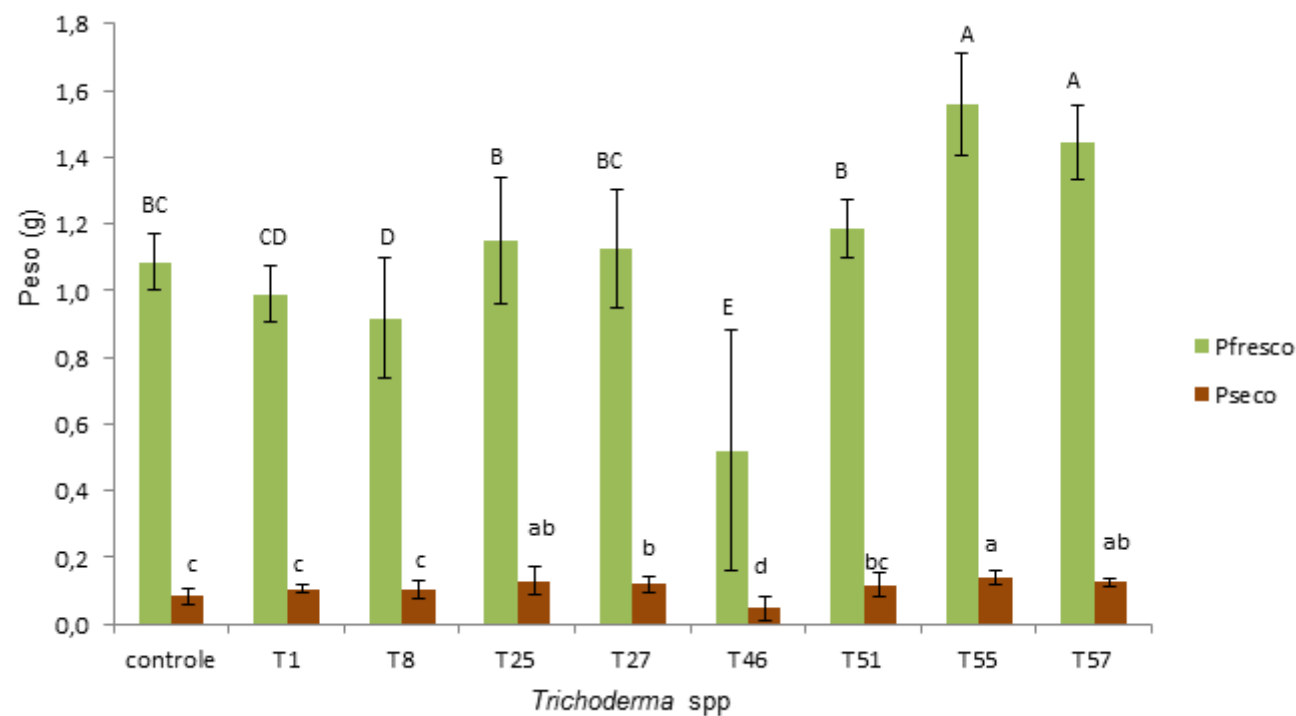


Figura 18: Peso fresco e seco (média dos valores) das plantas de feijão tratadas com cepas de *Trichoderma* e aspersão de micélio de *S. sclerotiorum*. O controle consistiu nas plantas sem tratamento. Letras maiúsculas ou minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre o controle e os tratamentos. Foram utilizadas 25 plantas de feijão por tratamento.

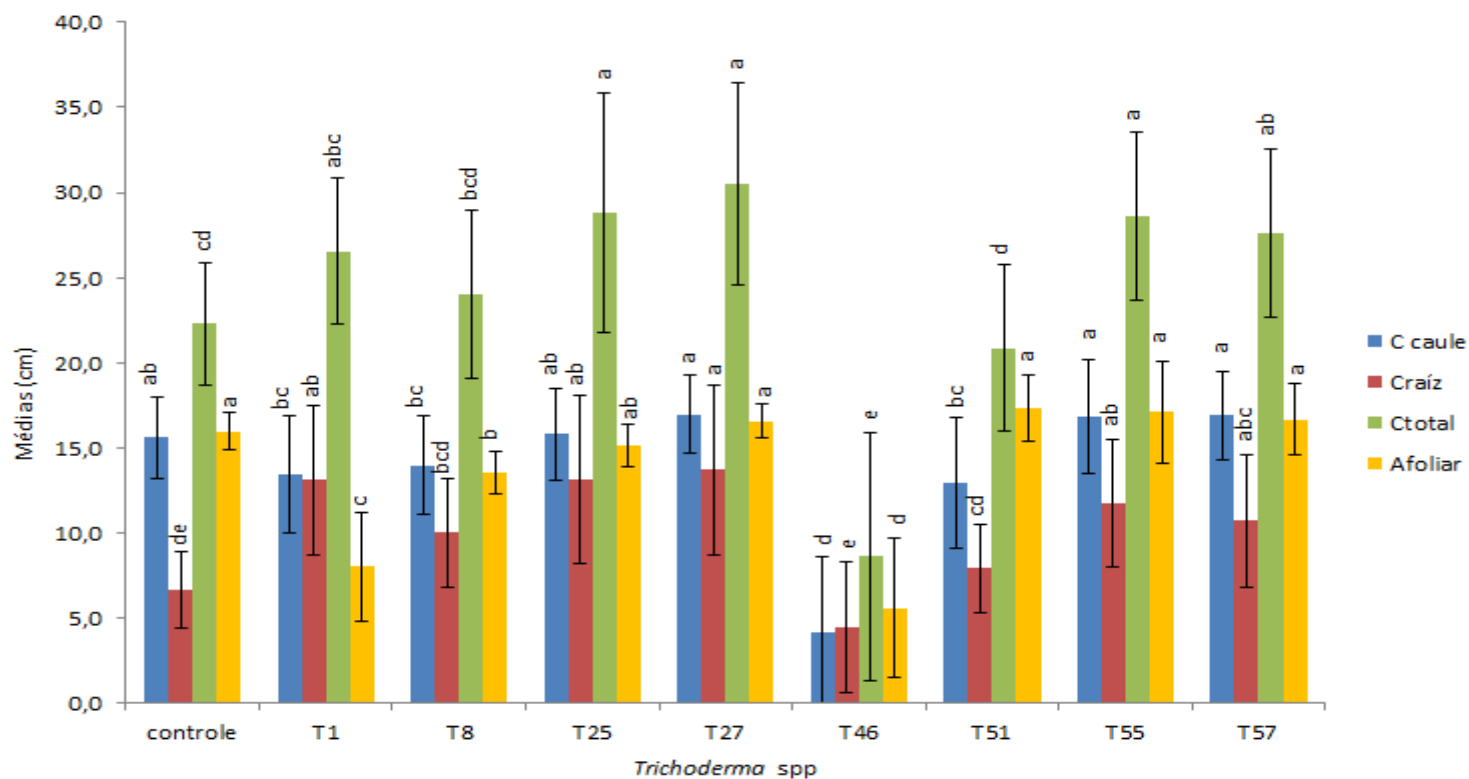


Figura 19: Médias (cm) do comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total e área foliar (cm²) das plantas de feijão tratadas com cepas de *Trichoderma* e aspersão de micélio de *S. Sclerotiorum*. O controle consistiu nas plantas sem tratamento. Letras minúsculas iguais nas barras de mesma cor não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre o controle e os tratamentos. N=25 plantas de feijão por tratamento.

- Índice de severidade da doença em plantas de feijão nebulizadas com solução de micélio de *S. sclerotiorum*

Os resultados apresentados foram obtidos no 21^o dia após o plantio das sementes de feijão. As plantas foram avaliadas individualmente usando uma escala de notas de 0 a 6, segundo Napoleão et al. (2005). A área foliar necrosada foi estimada a partir de folhas extraídas para a obtenção de suas medidas. A Fig 21 mostra que as plantas tratadas com as cepas T₂₅ e T₅₅ apresentaram as menores notas (ver Escala de Napoleão et al, 2005, em Material e Métodos) e todas se mostraram assintomáticas para a doença, apresentando-se saudas tanto na parte aérea quanto nas raízes. Já com as demais cepas, nas condições em que o experimento foi realizado, a incidência da doença foi menor nos tratamentos com as cepas T₁, T₂₇, T₅₁, T₅₇, onde as plantas receberam nota 1,8, no tratamento com a cepa T₈ as plantas receberam nota 2. Plantas tratadas com a cepa T₄₆ apresentaram a maior nota, estimada em 5,2 sendo que seis sementes não germinaram, sendo que estas receberam nota 6,0, ou seja, as que exibiram a maior severidade da doença. As plantas tratadas com as cepas T₂₅ apresentaram poucas manchas e menor área foliar necrótica e receberam nota 1,2, enquanto que as plantas tratadas com T₅₅ se apresentaram completamente saudas, isto é, sem manchas necróticas nas folhas (Fig 20).

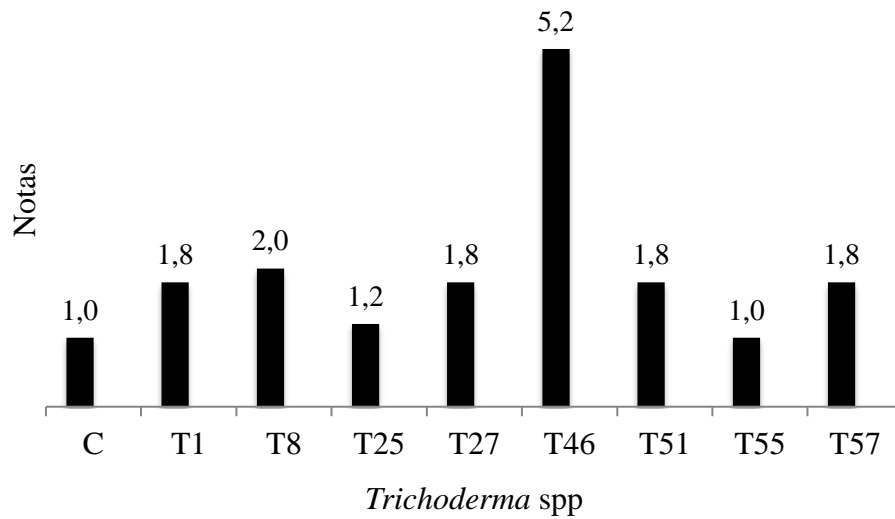


Figura 20: Índice da severidade da doença após aspersão de *S. sclerotiorum* nas folhas. O controle (C) foi realizado na ausência de cepas de *Trichoderma* sp e do fitopatógeno. A nota 1,0 equivale a plantas saudáveis, isto é, sem manchas necróticas nas folhas. Quanto maior a nota, maior a área foliar necrosada (severidade da doença), sendo a nota máxima 6,0. Foram utilizadas 25 plantas de feijão por tratamento.



Figura 21: Aspectos foliares das plantas de feijão nebulizadas com solução de micélio de *S. sclerotiorum*.

C: controle (ausência do fitopatógeno).

b. Plantas de feijão cultivadas em solo contendo micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* e cepas de *Trichoderma* spp.

Neste experimento foram utilizadas as mesmas cepas de *Trichoderma* descritos nos itens A e B. Os dados numéricos são mostrados na Tabela 7. As plantas tratadas com a cepa T₅₅ apresentaram os maiores valores de peso fresco, mas foi estatisticamente igual aos demais tratamentos, diferindo apenas de Ss (tratamento somente com o fitopatógeno), T₈ e T₄₆. As plantas tratadas com o isolado T₅₅ também apresentaram o melhor resultado em termos de peso seco, diferindo estatisticamente das plantas tratadas com as cepas T₈, T₂₇, T₄₆, T₅₁ e T₅₇, bem como o controle e Ss. As plantas tratadas com as cepas T₈ e T₄₆ apresentaram pesos secos menores que o controle e não foram estatisticamente diferentes (Fig 22).

A Fig 23 mostra os resultados obtidos com as outras variáveis analisadas. Em relação ao comprimento do caule, não foram observadas diferenças estatísticas entre os controles e os tratamentos. As plantas tratadas com as cepas T₂₅ e T₅₅ apresentaram os maiores valores de comprimento de raiz e diferiram, em termos estatísticos, dos controles.

Quando analisada a variável comprimento total observa-se que os tratamentos com as cepas T₂₅, T₂₇ e T₅₅ foram os que apresentaram os melhores resultados. No quesito área foliar, verifica-se que as plantas tratadas com a cepa T₅₅ apresentaram os maiores valores, quando comparados com os demais tratamentos.

Tabela 7: Valores numéricos obtidos das variáveis peso fresco, peso seco, comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total e área foliar nos testes de promoção de crescimento e em plantas de feijão com o fitopatógeno e as cepas de *Trichoderma* sp adicionadas ao solo.

Fitopatógeno no substrato	Controle	T ₁	T ₈	T ₂₅	T ₂₇	T ₄₆ [*]	T ₅₁	T ₅₅	T ₅₇	S.s [*]
P fresco	1,15 ± 0,12A	1,28 ± 0,79A	0,55 ± 0,54B	1,59 ± 0,14A	1,20 ± 0,23A	0,55 ± 0,44B	1,145 ± 0,79 A	1,69 ± 0,43A	1,18 ± 0,06A	0,34 ± 0,39B
P seco	0,08 ± 0,02 cde	0,13 ± 0,07abc	0,05 ± 0,05def	0,14 ± 0,01ab	0,11 ± 0,01bc	0,03 ± 0,03ef	0,10 ± 0,07bcd	0,17 ± 0,03a	0,11 ± 0,06bcd	0,01 ± 0,02g
C caule	15,58 ± 1,80a	7,74 ± 5,28cde	4,00 ± 3,99de	15,20 ± 3,30a	13,40 ± 3,40ab	4,45 ± 4,21de	9,20 ± 8,06bcd	15,50 ± 3,00a	10,40 ± 6,97abc	3,73 ± 4,45e
C Raíz	6,73 ± 1,91bc	4,25 ± 3,07c	5,45 ± 5,43c	10,50 ± 4,50ab	12,80 ± 3,74a	3,65 ± 3,14 c	4,95 ± 4,28c	13,45 ± 2,82a	7,40 ± 4,50bc	3,05 ± 3,91c
Comp total	22,30 ± 2,93abc	11,99 ± 8,06de	9,45 ± 9,36de	25,70 ± 7,30ab	26,20 ± 6,18ab	8,10 ± 7,13e	14,15 ± 11,80cde	28,95 ± 5,35a	17,80 ± 10,17bcd	6,78 ± 8,28f
Área foliar	15,97 ± 1,44ab	11,72 ± 3,69bc	5,66 ± 4,91 d	14,29 ± 2,73ab	13,70 ± 3,20ab	4,02 ± 3,28dc	7,37 ± 6,07cd	16,80 ± 1,46a	11,70 ± 6,23bc	1,76 ± 2,54e

Controle: ausência das cepas de *Trichoderma* spp. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre os controles e os tratamentos no teste de promoção de crescimento. Os asteriscos (*) correspondem aos tratamentos que diferiram dos outros. Peso fresco (P fresco), peso seco (P seco), comprimento do caule (C caule), comprimento da raiz (C raíz), comprimento total (C total) e área foliar.

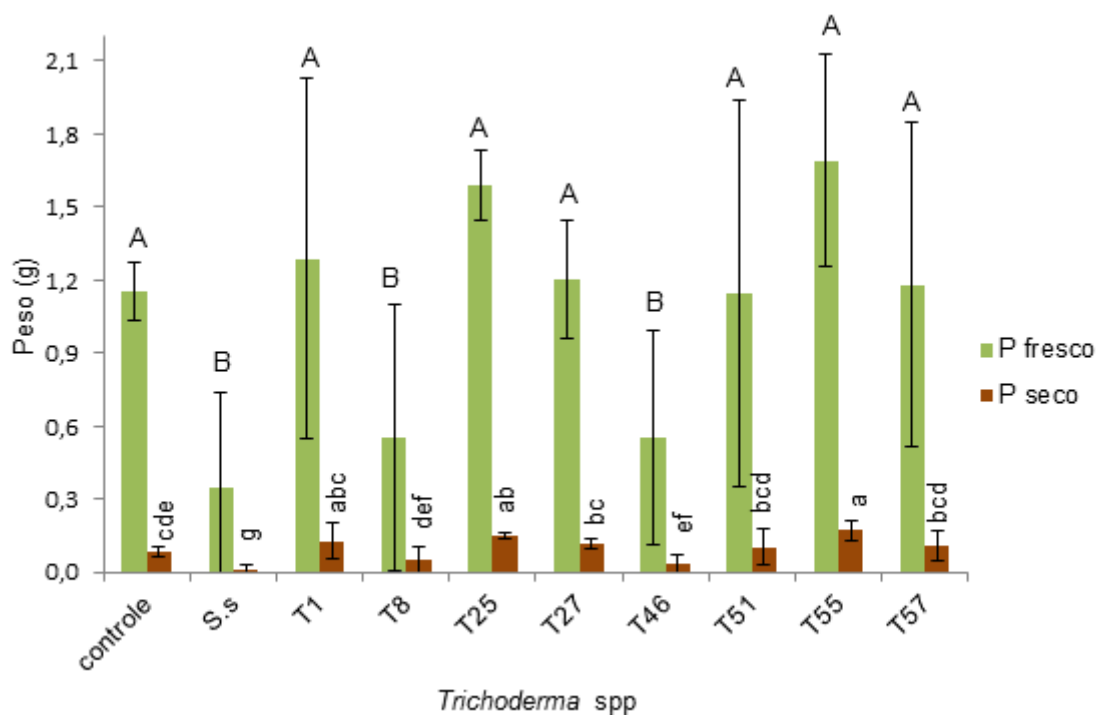


Figura 22: Média dos valores de peso fresco e peso seco das plantas de feijão cultivadas em solo inoculado com micélio de *S. sclerotiorum* e com cepas de *Trichoderma* spp. Ss: tratamento com discos do micélio de *S. sclerotiorum*, C: tratamento com arroz umedecido e autoclavado na ausência de *Trichoderma* spp. e do fitopatógeno no solo. Letras maiúsculas ou minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre o controle e os tratamentos. Foram utilizadas 10 plantas de feijão por tratamento.

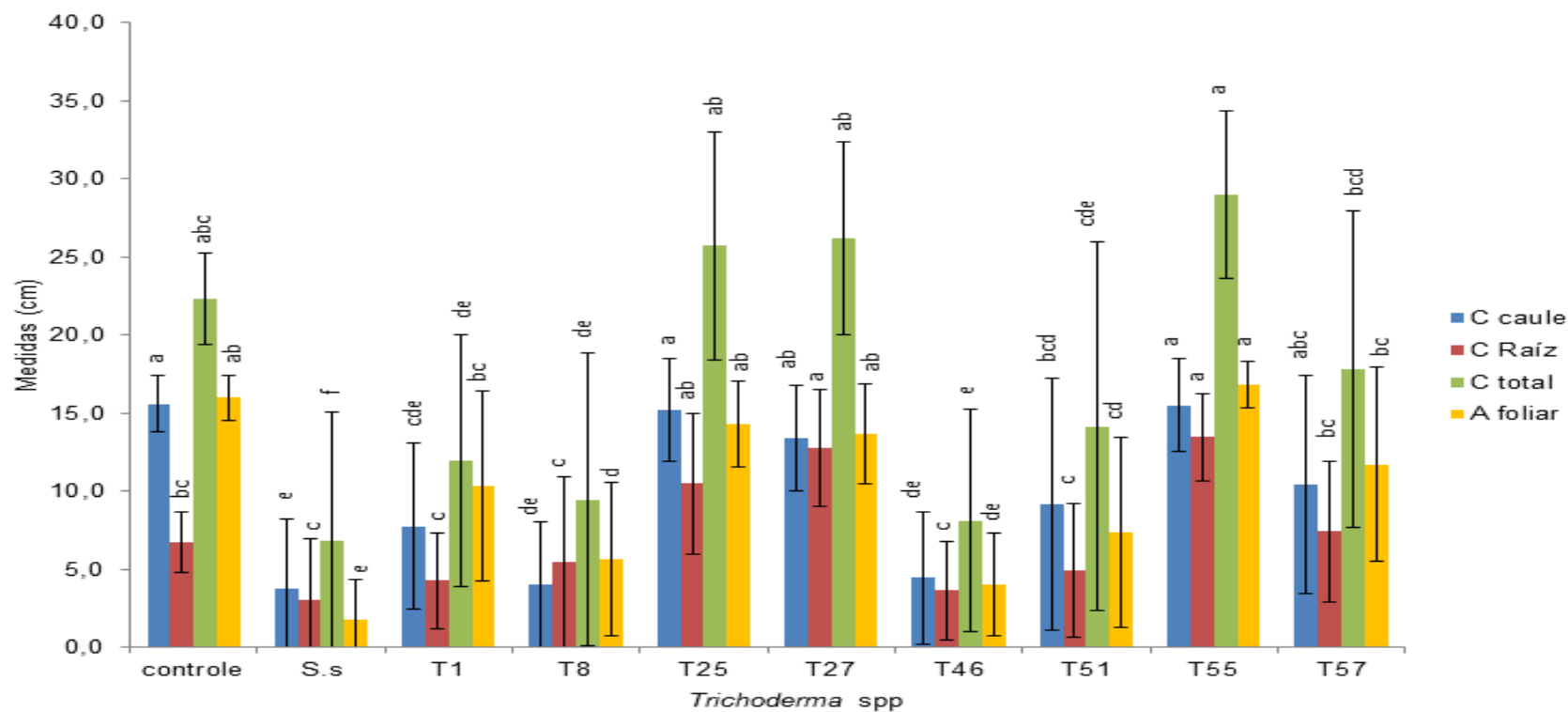


Figura 23: Médias (cm) do comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total e área foliar (cm²) das plantas de feijão tratadas com cepas de *Trichoderma* e fragmentos de micélio de *S. sclerotiorum*. Controle - ausência de *Trichoderma* sp e fitopatógeno, Ss – tratamento apenas com o fitopatógeno. Letras minúsculas iguais nas barras de mesma cor não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre o controle e os tratamentos. Foram utilizadas 10 plantas de feijão por tratamento.

- Índice da severidade da doença em plantas de feijão cultivadas em solo inoculado com micélio de *S. sclerotiorum*

As áreas das lesões foliares foram estimadas e a média dos valores foi determinada no 24º dia após o plantio das sementes. As plantas foram avaliadas individualmente usando uma escala de notas de 0 a 6 (Napoleão et al. 2005). A área foliar necrosada foi estimada a partir de folhas extraídas para a obtenção das medidas (Fig 24). As folhas tratadas com as cepas T₂₅ e T₅₅ assim como o controle (C), apresentaram nota igual a 1,0. Observou-se que as plantas estavam totalmente sadias tanto na parte área quanto nas raízes. As plantas do tratamento Ss receberam a maior nota, correspondendo a um alto grau de lesões, calculada em 4,1, neste tratamento cinco sementes não germinaram, sendo que, uma das plantas recebeu nota 6,0 (planta em ponto de murcha permanente). As plantas tratadas com as cepas T₁ e T₂₇ apresentaram poucas manchas de necrose em algumas folhas, sendo que a nota atribuída a cada uma das cepas foi 2,0 e 1,3, respectivamente. As plantas tratadas com T₈, T₄₆, T₅₁ e T₅₇ apresentaram notas entre 2,6 e 3,2 (Fig 25).

Os resultados indicaram que as cepas T₂₅ (Fig 26) e T₅₅ propiciaram um desenvolvimento das plantas de feijão tão satisfatório quanto as plantas do controle (ausência de *Trichoderma* sp e do fitopatógeno), já o tratamento com T₂₇ mostrou uma proteção parcial das plantas. Por outro lado, os tratamentos com as cepas T₁, T₈, T₅₁, e T₅₇ não apresentaram proteção à doença causada pelo fitopatógeno. O tratamento com a cepa T₄₆ apresentou resultado pouco promissor e haviam escleródios germinando em diferentes partes das plantas, como nas plantas do tratamento Ss (Fig 27).

Também foi testada a capacidade de proteção durante a germinação de sementes de feijão pelas cepas de *Trichoderma* sp, quando estas sementes foram colocadas em substrato contendo micélio de *S. sclerotiorum*. A tabela 8 sumariza os resultados obtidos em termos de número de sementes germinadas. Sementes de feijão sem a adição de *Trichoderma* sp na presença do fitopatógeno (Ss) apresentaram um índice de germinação 50%. Sementes tratadas com as cepas T₁, T₈, T₄₆, T₅₁ e T₅₇ apresentaram entre 60 e 80% de germinação, já as sementes tratadas com as cepas T₂₅, T₂₇ e T₅₅ apresentaram 100% de germinação, podendo ser consideradas eficientes na proteção de sementes contra as ações de *S. sclerotiorum*.

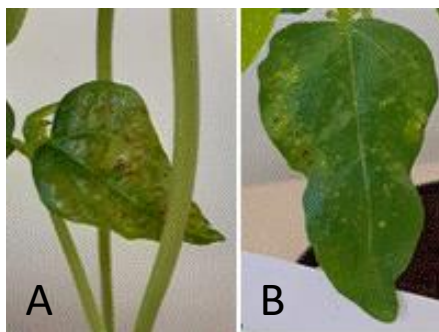


Figura 24: Foto de folhas ao final do experimento tratadas com as cepas de *Trichoderma* T₁ (A) e T₅₇ (B), pulverizadas com fragmentos de micélio de *S. sclerotiorum*.

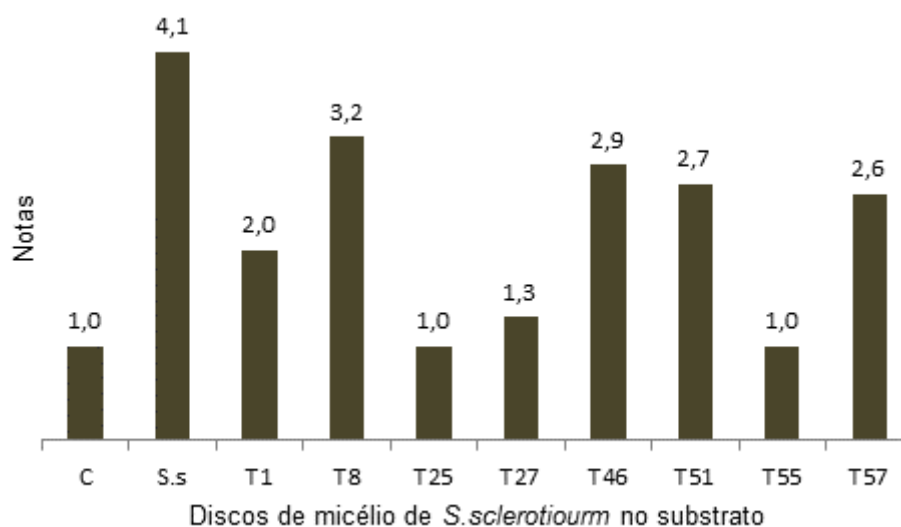


Figura 25: Índice da severidade da doença após adição de micélio de *S. sclerotiorum* no solo. Ss: tratamento com discos do micélio de *S. sclerotiorum* sem *Trichoderma* sp e C: tratamento com arroz umedecido e autoclavado sem *Trichoderma* spp. e sem o fitopatógeno no solo. Sementes não germinadas receberam nota seis. Foram utilizadas 10 plantas de feijão por tratamento.



Figura 26: A) Controle (C) - ausência de *Trichoderma* sp e fitopatógeno, B) plantas de feijão ao final do experimento tratadas com a cepa T₂₅ e fragmentos de micélio de *S. sclerotiorum* no solo.

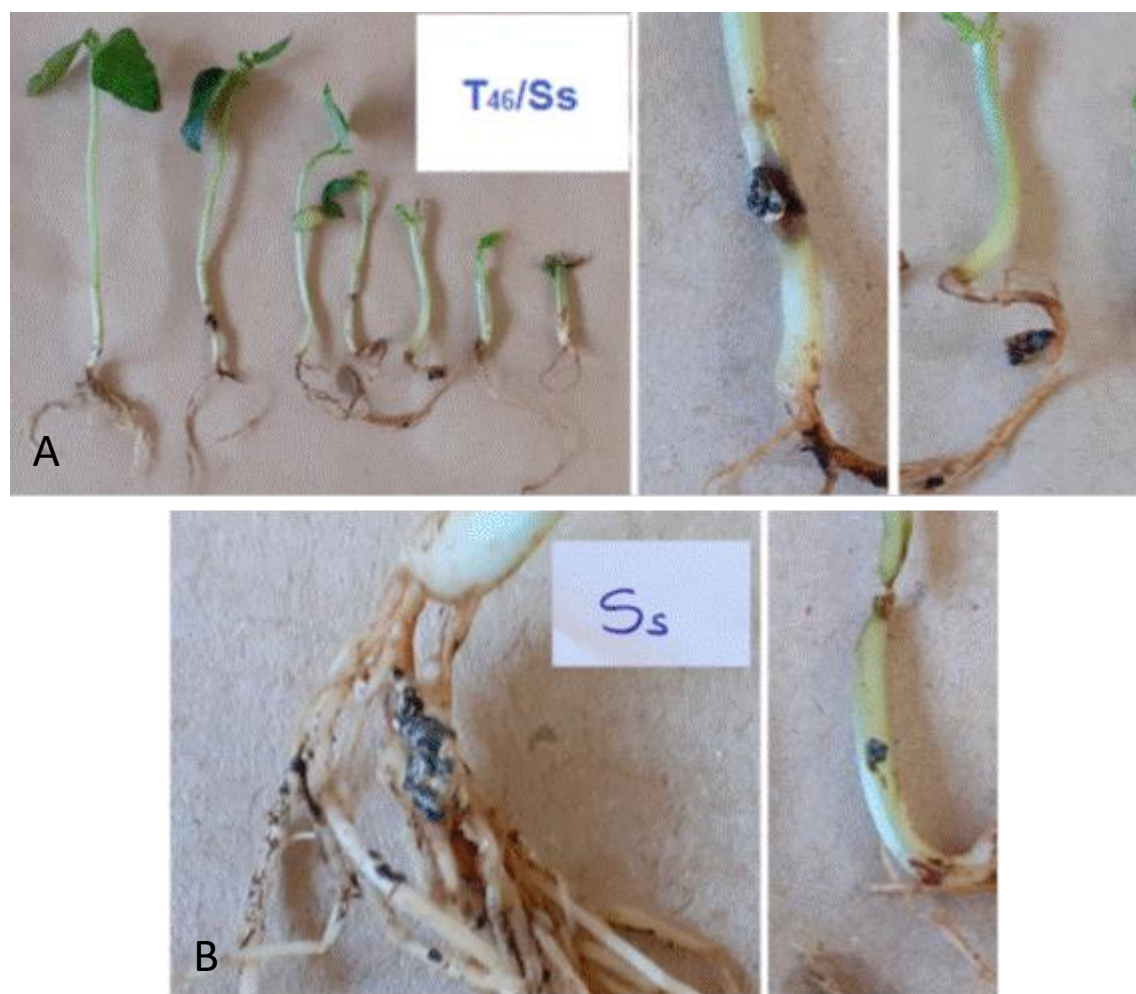


Figura 27: A) Tratamento com a cepa T₄₆/ Ss e ao lado escleródios germinando em diferentes partes das plantas, B) Tratamento com Ss e ao lado formação de escleródio na haste da planta.

Tabela 8: Porcentagem de germinação de sementes de feijão plantadas em solo contendo micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*, tratadas com inóculos das cepas de *Trichoderma* sp.

Tratamento	Número de Sementes Germinadas	% de Sementes Germinadas
Controle	10	100
Ss	5	50
T ₁	8	80
T ₈	6	60
T ₂₅	10	100
T ₂₇	10	100
T ₄₆	7	70
T ₅₁	7	70
T ₅₅	10	100
T ₅₇	8	80

Controle: Sementes plantadas em solo sem nenhum tratamento

Ss: Sementes plantadas em solo contendo somente micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*

Reisolamento das cepas de *Trichoderma* sp utilizadas nos tratamentos de plantas de feijão após o teste do inóculo de micélio de *S. sclerotiorum* no solo

Com o intuito de saber se as cepas de *Trichoderma* sp foram incorporadas nas plantas de feijão a partir do inóculo no solo, em um processo de endofitismo, fragmentos de diferentes partes das plantas que cresceram sob esta condição, foram inoculados em meio de cultura, após assepsia. Das oito cepas testados foram re-isoladas quatro cepas, quais sejam: T₂₅, T₂₇, T₅₁ e T₅₇ (Fig 28).

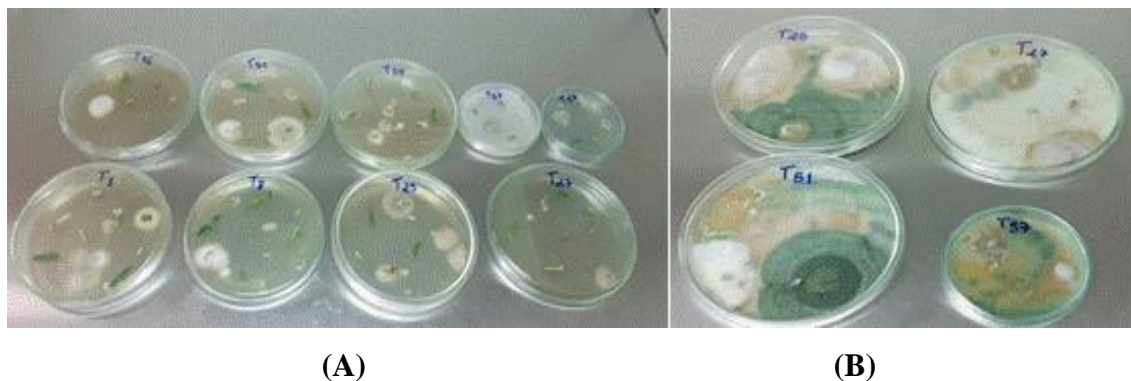


Figura 28: (A) Placas contendo fragmentos de plantas de feijão tratadas com as cepas de *Trichoderma* selecionadas: T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇. (B) Placas com fragmentos de plantas de feijão contendo as cepas re-isoladas de *Trichoderma* spp. T₂₅, T₂₇, T₅₁ e T₅₇.

As colônias isoladas foram inoculadas em dois meios de culturas diferentes (batata/dextrose/ágar e extrato de malte/ágar) e foram observadas as características morfológicas comparando as culturas entre si (Fig 29). Representantes do grupo *Trichoderma* têm conidióforos ramificados que se agrupam em fascículos. Suas hifas geralmente são retas, podendo se contorcer em qualquer direção. Eles podem ter pigmentos nos conídios que são de cor branca, verde claro até verde escuro e brilhante. Podem produzir pigmentos no meio de cultura e exalar odores frutados (Vinale et al. 2008).

Na Tabela 9, podemos observar as características morfológicas de T₂₅, T₂₇, T₅₁ e T₅₇ isoladas de *A. graziellae* e das cepas isoladas das plantas de feijão nos dois tipos de meio de cultura. Ao comparar as características culturais das cepas T₂₅ e T₂₇ (Fig 29), observou-se que as mesmas são diferentes, mas as culturas das cepas inoculadas no substrato, como daqueles re-isolados das plantas de feijão apresentam características microscópicas semelhantes entre si (Fig 30). Os conidióforos são ramificados, verticilados, contendo aglomerados de fiálides em forma de garrafas e as hastes podem ser curvas. Os conídios são em sua maioria verdes, às vezes hialinos, com paredes lisas ou ásperas e são formados numa cabeça conidial viscosa, agrupadas nas pontas das fiálides. Uma característica comum e marcante entre as cepas e os re-isolados foi a haste do conidióforo e número de ramificação. T₂₅ apresentou conidióforo curvo e curto, com menor número de ramificações e T₂₇ apresentou haste do conidióforo reta e longa com um maior número de ramificações. Tanto as cepas utilizadas neste trabalho, como os quatro re-isolados nas plantas de feijão serão identificados por técnicas de biologia molecular.

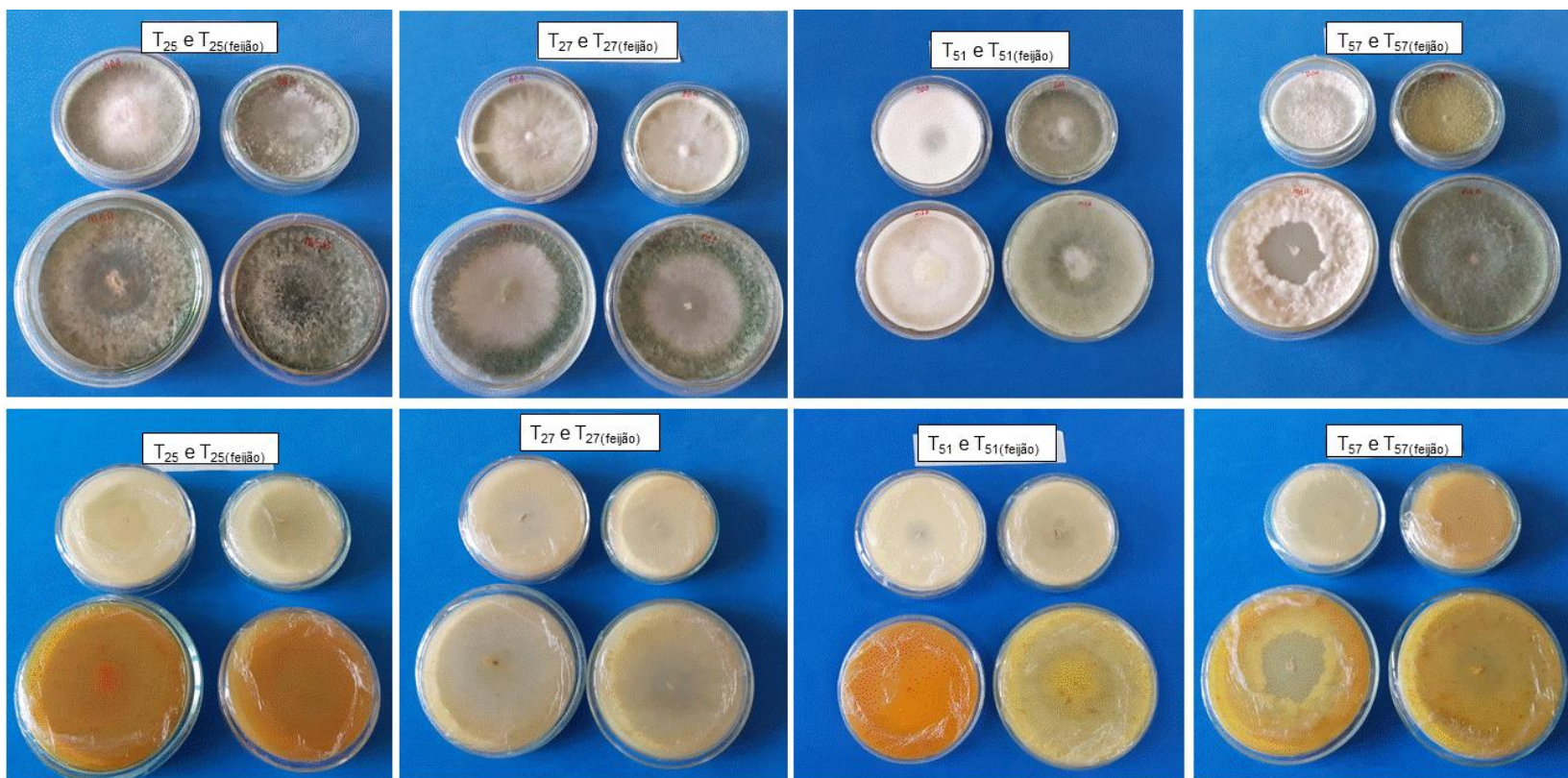


Figura 29: Características culturais de T₂₅, T₂₇, T₅₁ e T₅₇ isoladas de *A. grazielae* e das cepas isoladas das plantas de feijão. Da esquerda para direita: T₂₅(*A. grazielae*) e T₂₅(feijão), T₂₇(*A. grazielae*) e T₂₇(feijão), T₅₁(*A. grazielae*) e T₅₁(feijão), T₅₇(*A. grazielae*) e T₅₇(feijão). Placas da esquerda correspondem ao meio BDA, placas da direita correspondem ao meio MEA. As fotos superiores mostram a frente e as fotos inferiores mostram o verso das placas.

Tabela 9: Características culturais de T₂₅, T₂₇, T₅₁ e T₅₇ e das cepas isoladas das plantas de feijão em BDA e MEA a 28°C, após 48 e 72 horas de incubação, respectivamente, frente e reverso das placas.

Isolado	BDA - colônia (mm)	Forma	Elevação	Margem	Textura	Aparência	Odor	Cor	Reverso da placa
T ₂₅	50.0	circular	plano	uniforme	cotonosa	lisa	-	Verde e branco	branco
T _{25(feijão)}	50.0	circular	plano	uniforme	cotonosa	lisa	-	Verde e branco	branco
T ₂₇	50.0	circular	plano	uniforme	cotonosa	lisa	-	Verde cl e branco	branco
T _{27(feijão)}	50.0	circular	plano	uniforme	cotonosa	lisa	-	Verde cl e branco	branco
T ₅₁	50.0	circular	plano	uniforme	cotonosa	lisa	-	branco	branco
T _{51(feijão)}	50.0	circular	plano	uniforme	cotonosa	lisa	-	Verde e branco	branco
T ₅₇	50.0	circular	Sulcocentral	ondulada	camurça	lisa	-	Branco	branco
T _{57(feijão)}	50.0	circular	plano	uniforme	arenosa	lisa	-	Verde cl/amarelado	amarelo
Isolado	MEA - colônia (mm)	Forma	Elevação	Margem	Textura	Aparência	Odor	Cor	Reverso da placa
T ₂₅	70.0	circular	plano	uniforme	arenosa	lisa	-	Verde e branco	ocre
T _{25(feijão)}	70.0	circular	plano	uniforme	arenosa	lisa	-	Verde e branco	ocre
T ₂₇	70.0	circular	plano	uniforme	Cotonoso/arenoso	Halos concêntricos	-	Verde e branco	branco
T _{27(feijão)}	70.0	circular	plano	uniforme	Cotonoso/arenoso	Halos concêntricos	-	Verde e branco	branco
T ₅₁	70.0	circular	plano	uniforme	cotonosa	lisa	-	Br/amarelado	alaranjado
T _{51(feijão)}	70.0	circular	plano	uniforme	cotonosa	lisa	-	Verde e branco	amarelado
T ₅₇	70.0	circular	Sulcocentral	ondulada	aveludada	nodulada	-	Branco/denso	amarelado
T _{57(feijão)}	70.0	circular	plano	uniforme	aveludada	lisa	-	Verde/denso	amarelado

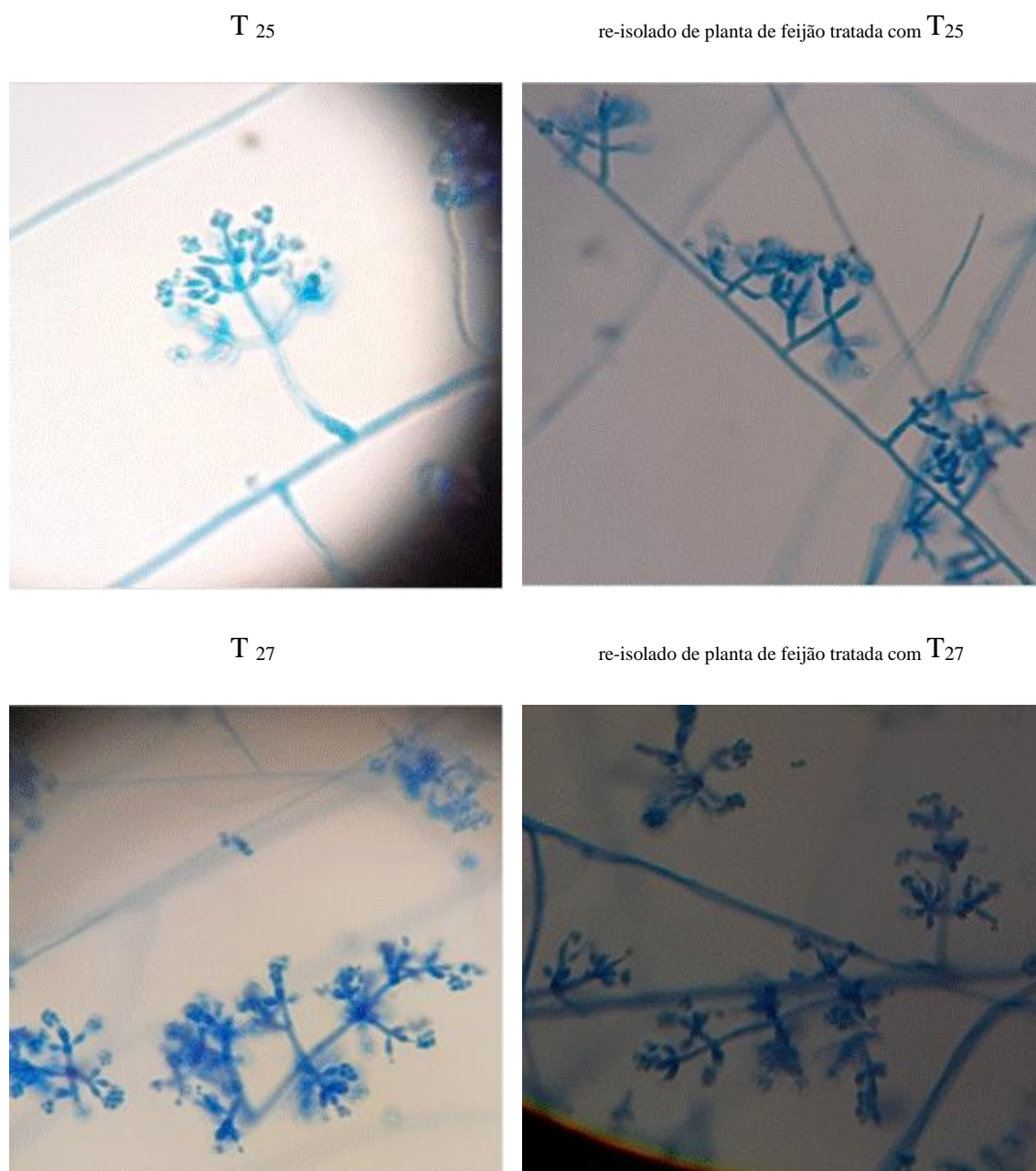


Figura 30: Características microscópicas das cepas T₂₅ e T₂₇ e dos re-isolados das plantas de feijão submetidas aos tratamentos.

Avaliação do hiperparasitismo e viabilidade dos escleródios

No teste de hiperparasitismo foram avaliadas as mesmas cepas selecionadas nos testes anteriores (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇). Caixas plásticas contendo 10 escleródios de *S. sclerotiorum* foram incubadas por 15 dias com cada uma das cepas de *Trichoderma* sp. Após esse período, os escleródios de *S. sclerotiorum* foram examinados

quanto à sua viabilidade e ao crescimento das cepas inoculadas. O tratamento com T₅₁, por exemplo, três escleródios se desintegraram quando retirados do solo (Fig 31).

A viabilidade foi observada através do número de escleródios germinados sobre discos de cenoura (Fig 32). Todos os tratamentos apresentaram redução no número de escleródios. A taxa de redução de escleródios tratados com o isolado T₂₇ foi de 60%. Os tratamentos com as cepas T₈, T₂₅, T₂₇, T₅₁, T₅₅ e T₅₇ levaram a uma redução no número de escleródios de 30%, já as cepas T₁ e T₄₆ causaram uma redução de 20%. Os escleródios tratados com as cepas T₁ e T₈ apresentaram uma porcentagem de germinação de 12,6%, correspondendo a apenas uma estrutura de resistência germinando sobre o disco de cenoura (Tabela 10). Nos tratamentos com as cepas T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇ não foi observado nenhum processo de germinação. No entanto, as cepas de *Trichoderma* sp. cresceram sobre os discos de cenoura. Foram realizados microcultivos em lâminas de microscópio coradas com azul de bromofenol para confirmar a presença das cepas de *Trichoderma* sp utilizados nos testes de hiperparasitismo.

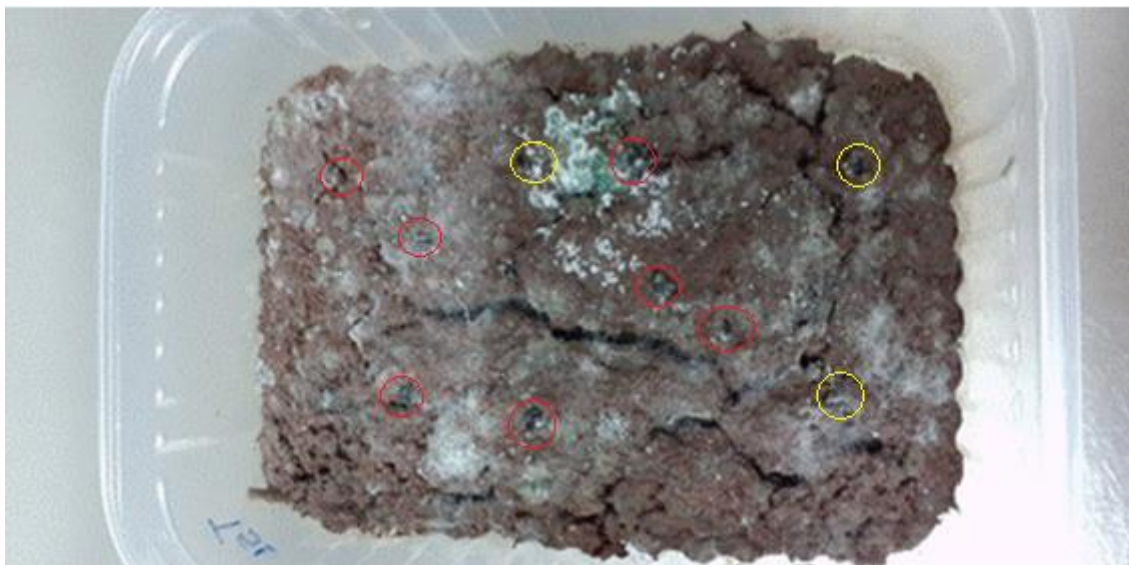


Figura 31: Caixa com solo contendo 10 escleródios de *S. sclerotiorum* após 15 dias de incubação com cepas de T₅₁.

Tabela 10: Número de escleródios viáveis, porcentagem de redução, porcentagem de germinação (viabilidade) e número de escleródios germinados tratados com cepas de *Trichoderma* spp.

Tratamento	Nº de Escleródios	% de Redução no nº de Escleródios	Nº de Escleródios Germinados	% de Viabilidade dos Escleródios
Controle	10	0	10	100%
T ₁	8	20%	1	12,6%
T ₈	7	30%	1	12,6%
T ₂₅	7	30%	0	0
T ₂₇	4	40%	0	0
T ₄₆	8	20%	0	0
T ₅₁	7	30%	0	0
T ₅₅	7	30%	0	0
T ₅₇	7	30%	0	0

Promoção de crescimento em plantas de feijão utilizando cepas de *Trichoderma* spp. na ausência de fungos fitopatogênicos

Para avaliar a capacidade de *Trichoderma* spp. em promover o crescimento e o desenvolvimento de plantas de feijão, foram medidas as seguintes variáveis: peso fresco e peso seco, comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total da planta e área foliar. Os resultados obtidos para peso fresco e seco das plantas tratadas com as cepas de *Trichoderma* spp encontram-se ilustrados na Fig 32. Os resultados mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) para peso fresco e seco entre os tratamentos com *Trichoderma* spp. e o controle. Os valores obtidos no controle e no tratamento com T₄₆ diferiram entre si e estes em relação a todos os outros tratamentos. Em todos os tratamentos observamos um aumento de peso fresco e seco acima de 33%. O maior aumento de peso fresco foi de 50% nas plantas tratadas com o isolado T₈ e de peso seco foi 53,92% para o tratamento com o isolado T₅₇, em relação ao controle (Tab. 11). Por outro lado, plantas de feijão tratadas com T₄₆ apresentaram perda de peso fresco e seco.

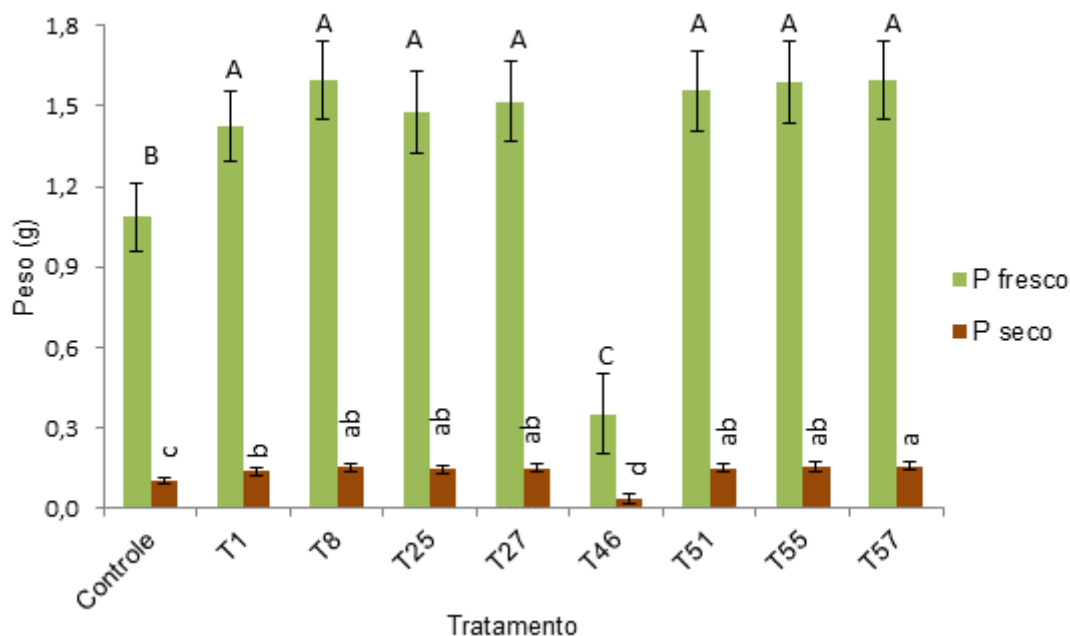


Figura 32: Média dos valores de peso fresco e seco obtidos no teste de promoção de crescimento com as cepas de *Trichoderma* sp. Controle (ausência de *Trichoderma* sp). Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre os controles e os tratamentos no teste de promoção de crescimento. N= 25 plantas por tratamento

Tabela 11: Porcentagens de ganho de peso seco e peso fresco dos tratamentos com *Trichoderma* spp. em relação ao controle (C), nos testes de promoção de crescimento em plantas de feijão.

Tratamento	% de ganho	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
C*	0,00	1,08 ± 0,08 b	0,102 ± 0,01 c
T ₁	33,33	1,42 ± 0,13 a	0,136 ± 0,01 b
T ₈	50,00	1,59 ± 0,20 a	0,153 ± 0,20 ab
T ₂₅	40,20	1,47 ± 0,14 a	0,143 ± 0,01 ab
T ₂₇	45,10	1,51 ± 0,11 a	0,148 ± 0,01 ab
T ₄₆ *	-67,65	0,35 ± 0,48 c	0,033 ± 0,04 d
T ₅₁	45,93	1,55 ± 0,13 a	0,149 ± 0,01 ab
T ₅₅	51,46	1,58 ± 0,13 a	0,154 ± 0,01 ab
T ₅₇	53,92	1,59 ± 0,11 a	0,157 ± 0,01 a

C - (Controle) ausência de *Trichoderma* sp

Valores com as letras minúsculas iguais nos parâmetros alisados, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade entre o controle e os tratamentos.

* Tratamentos que diferiram entre si e entros os outros.

Em relação às outras variáveis analisadas, os resultados são apresentados na Tab. 12 e na Fig 33. Não houve diferenças significativas no comprimento do caule entre as plantas tratadas com as cepas de *Trichoderma* T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₅₁, T₅₅ e T₅₇ e o controle, com exceção da cepa T₄₆, que apresentou comprimento de caule menor de todos. Ao analisar a variável comprimento da raiz e comprimento total, as plantas tratadas com a cepa T₅₇ apresentaram os maiores valores não diferindo apenas de T₂₅ e T₅₅. Considerando o comprimento total da planta, T₅₅ e T₅₇ apresentaram as maiores médias e diferiram de T₁, T₈ e controle. Os valores obtidos para área foliar das plantas revelaram que a média obtida no tratamento com T₅₅ foi maior sendo estatisticamente diferente de T₁, T₂₇ e T₅₁ (Fig 33 ou Tab. 12).

Tabela 12: Valores obtidos das variáveis analisadas no teste de promoção de crescimento em plantas de feijão, com diferentes cepas de *Trichoderma* sp no solo.

Promoção de crescimento	Controle	T ₁	T ₈	T ₂₅	T ₂₇	T ₄₆ *	T ₅₁	T ₅₅	T ₅₇
P fresco (g)	1,08 ± 0,08B	1,42 ± 0,12A	1,5970 ± 0,20A	1,4750 ± 0,14A	1,5160 ± 0,11A	0,3500 ± 0,48C	1,56 ± 0,13A	1,58 ± 0,13A	1,59 ± 0,11A
P seco (g)	0,10 ± 0,01c	0,13 ± 0,01b	0,1530 ± 0,20ab	0,1430 ± 0,01ab	0,1480 ± 0,01ab	0,0330 ± 0,04d	0,15 ± 0,01ab	0,15 ± 0,01ab	0,15 ± 0,01a
C caule (cm)	15,60 ± 2,4a	15,52 ± 2,42a	15,12000 ± 3,33a	17,6400 ± 3,12a	17,5600 ± 2,37a	4,7200 ± 6,74b	18,20 ± 3,07a	18,58 ± 2,34a	18,62 ± 3,08a
C raíz (cm)	6,68 ± 2,22c	9,10 ± 2,84bc	8,8000 ± 4,15bc	10,4000 ± 3,43ab	9,7800 ± 2,58b	2,6000 ± 3,52d	10,04 ± 2,93b	10,88 ± 3,28ab	13,00 ± 3,23a
C total (cm)	22,28 ± 3,61c	24,62 ± 3,48bc	24,7600 ± 5,87bc	28,0400 ± 4,77ab	27,3400 ± 2,95ab	7,3200 ± 9,92d	28,24 ± 4,73ab	29,46 ± 3,78a	31,62 ± 4,69a
Área foliar (cm ²)	15,45 ± 1,11c	11,90 ± 2,26d	16,05 ± 1,29abc	15,9500 ± 1,11bc	14,1490 ± 1,74dc	5,4500 ± 6,39e	14,75 ± 1,28bc	17,75 ± 1,55a	16,75 ± 1,42ab

(C): ausência de *Trichoderma* sp e do fitopatógeno no solo, * tratamento que diferiu do controle e de todos os outros.

Peso fresco (P fresco), peso seco (P seco), comprimento do caule (C caule), comprimento da raíz (C raíz), comprimento total (C total) e área foliar.

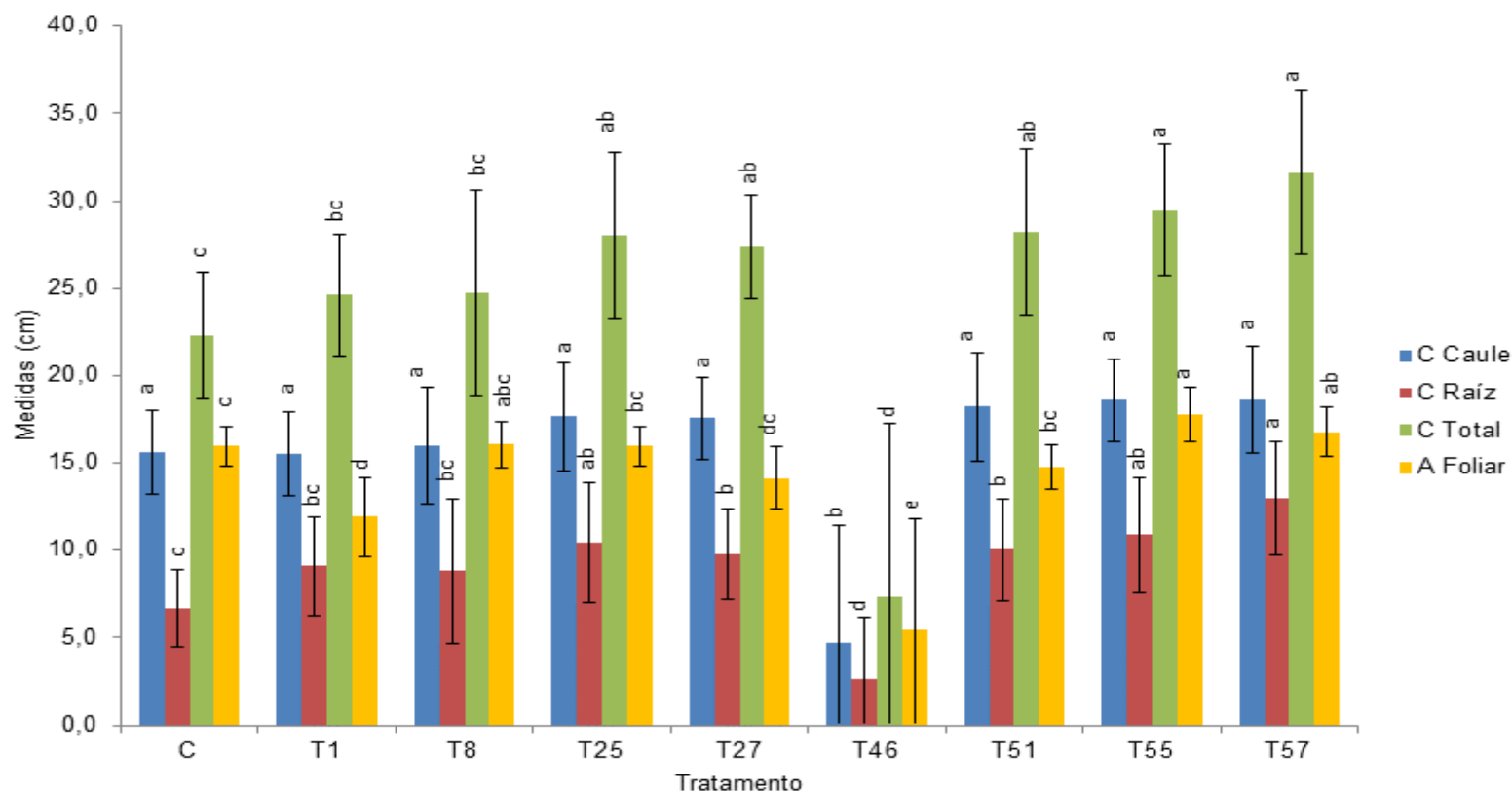


Figura 33: Parâmetros analisados nos testes de promoção de crescimento de plantas de feijão tratadas com cepas de *Trichoderma* spp. Comprimento do caule, comprimento da raiz, comprimento total da planta em cm e média da área foliar em cm². O controle compreende plantas não tratadas com as cepas de *Trichoderma* spp. Letras minúsculas iguais nas barras de mesma cor não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% e probabilidade entre os controles e os tratamentos. N=25 por tratamento.

Foi realizada uma análise dos componentes principais com os resultados obtidos em todas as variáveis analisadas (Fig 34). Estas variáveis explicaram 99,29% a variabilidade total dos dados, sendo 96,39% explicadas pelo primeiro componente e 2,92% explicadas pelo segundo. Nesta análise conjunta em resposta à inoculação de *Trichoderma* spp. no solo, o controle (C) ficou isolado em um quadrante, mostrando correlação inversa com os tratamentos T₂₅, T₂₇, T₅₁, T₅₅ e T₅₇. Por outro lado, a cepa T₄₆ mostrou respostas distintas de todos os outros tratamentos e do controle. Esta cepa inibiu o crescimento de plantas de feijão. O tratamento controle (ausência de *Trichoderma* sp) apresentou valores menores que os dos tratamentos com T₈, T₂₅, T₂₇, T₅₁, T₅₅ e T₅₇, enquanto que T₁ não diferiu do controle.

As partes aéreas das plantas de feijão ao final do experimento, tratadas com as cepas T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇ e o controle (sem *Trichoderma* sp) podem ser observadas nas figuras 35a e 35b. Na figura 36 são mostrados detalhes das plantas de feijão e raízes do tratamento T₂₇.

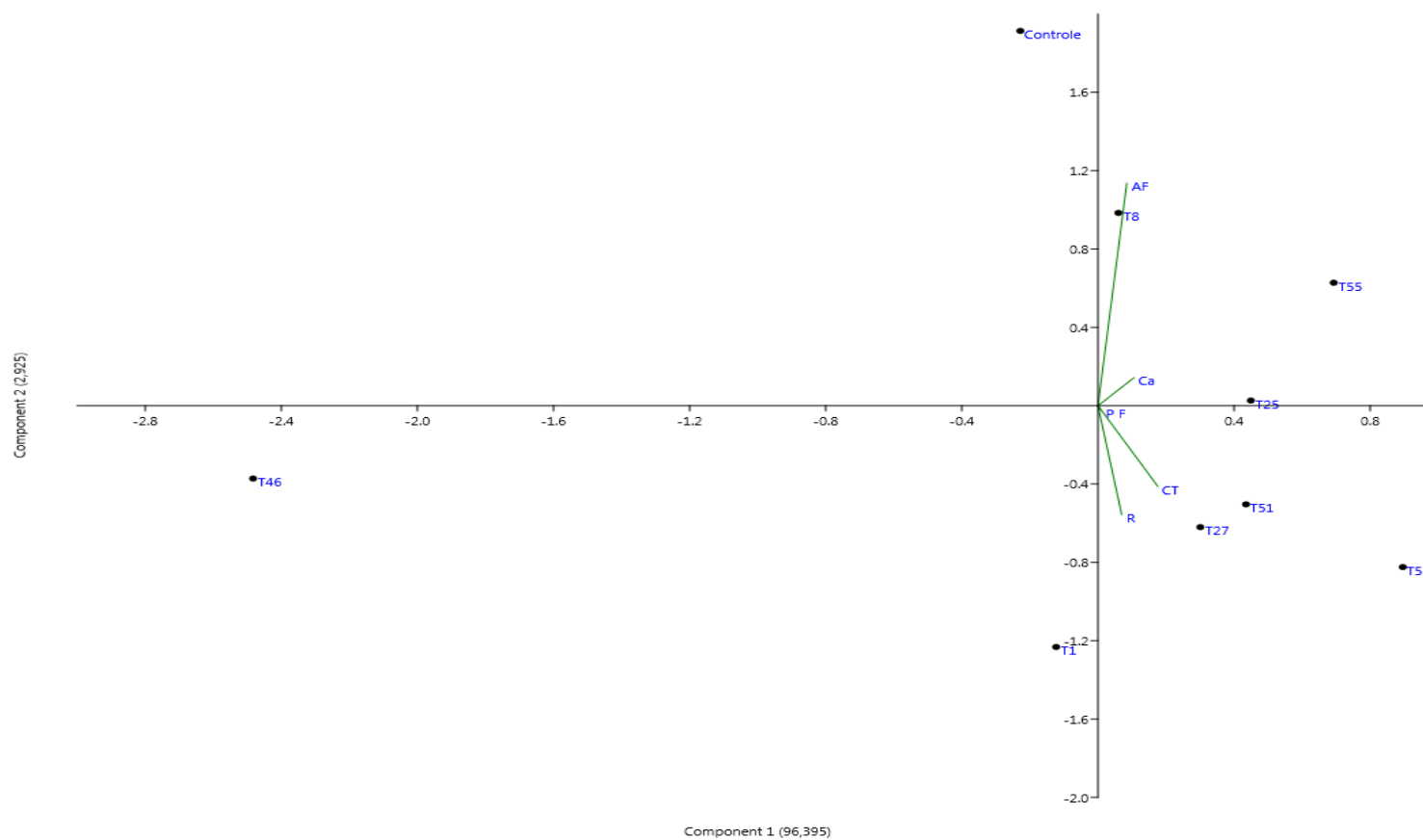


Figura 34: Análise de componentes principais (PCA) para os parâmetros avaliados em plantas de feijão - peso fresco (g), peso seco (g), comprimento do caule (cm), comprimento da raiz (cm), comprimento total (cm) e área foliar (cm²) nos ensaios de promoção de crescimento com substrato inoculado com oito cepas de *Trichoderma* sp (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇), após 15 dias do plantio.



Figura 35a: A foto mostra um vaso com plantas de feijão por tratamento com as cepas T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇, no último dia do experimento e o controle (sem *Trichoderma* sp).



Figura 35b: A foto mostra os cinco vasos com plantas de feijão tratadas com as cepas T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇, no último dia do experimento e C (controle - sem adição de *Trichoderma* sp).



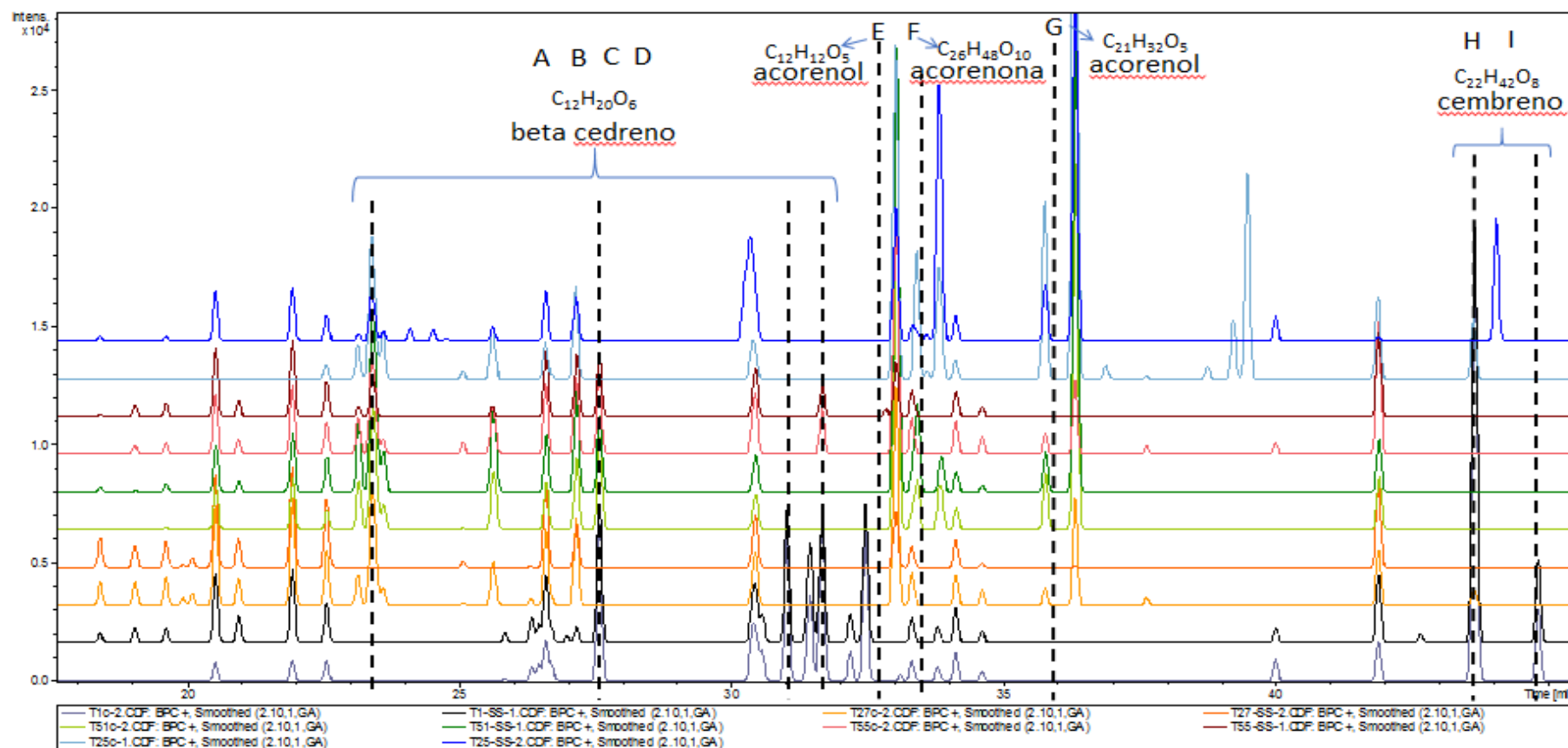
Figura 36: Fotos ao final do experimento com plantas de feijão em cinco vasos do tratamento com a cepa T₂₇ (A), detalhes das raízes (B, C e D).

Análise de metabólitos secundários de cepas de *Trichoderma* sp por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

As análises de T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ por CG/EM, exibiram distintos perfis de metabólitos voláteis entre as diferentes cepas e entre o controle e o tratamento (confronto indireto). Uma análise foi realizada e alguns compostos foram detectados como acorenona, acorenol e cembreno (Fig 37). Tais resultados mostram que as cepas analisadas produzem metabólitos secundários voláteis comuns e diferenciados, na presença de *S. sclerotiorum*. A tabela 13, lista alguns metabólitos detectados das cepas de *Trichoderma* spp.

Tabela 13: , lista alguns metabólitos detectados das cepas de *Trichoderma* spp.

Compostos	T₁	T₂₅	T₂₇	T₅₁	T₅₅
β-cedrene		x	x	x	x
Sequiphellandrene	x			x	x
Sesquisabinene	x				
α-Cedrol	x				x
Acorenol		x	x	x	
Acorenone		x			x
Epicubenol		x	x	x	x
Cembrene	x	x	x		
Verticellol	x				
Cadina-1,4-diene					x
7-Methanoazulene		x	x	x	
Naphthalene			x		



CG-EM/CLAE-EM

Figura 37: Análise de metabólitos voláteis das cepas T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆ por CG/EM nos testes de inibição de crescimento de *S. sclerotiorum* pelo método de placas pareadas.

DISCUSSÃO

Potencial das cepas de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos

Algumas espécies vegetais da região do Pantanal de Mato Grosso do Sul foram investigadas quanto às suas comunidades de fungos endofíticos, em trabalhos realizados por diferentes autores (Gos et al. 2017, Parpinelli et al. 2017, Pietro-Souza et al. 2017, Noriler et al. 2018, Savi et al. 2018). Neste trabalho, foram realizados estudos com cepas de *Trichoderma* coletados em diferentes localidades em solo e plantas do cerrado e pantanal, conforme descrito na Tabela 1 da seção de Materiais e Métodos.

Em um estudo recente, amostras de raízes e folhas de *Aspilia grazielae* permitiram o isolamento de 600 cepas endofíticas, sendo 47 cepas de *Trichoderma* spp. Neste trabalho, pela primeira vez, foi descrita a diversidade das comunidades de fungos endofíticos de raízes e folhas desta espécie vegetal (Weirich et al. 2020). Trabalhos desta natureza em Mato Grosso do Sul com cepas endofíticas, são escassos (Noriler et al. 2018) e os grupos consistem principalmente de endófitos oportunistas como *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Diaporthe*, *Pestalotiopsis* e *Xylaria* (Galvão et al. 2014, Gos et al. 2017, Parpinelli et al. 2017, Pietro-Souza et al. 2017, Noriler et al. 2018, Savi et al. 2018). O ineditismo do presente trabalho está no fato de terem sido testadas cepas de *Trichoderma* sp isoladas, em sua maioria endofíticas, de espécies vegetais nativas do Pantanal e do Cerrado desse estado (Tabela 1).

Vale ressaltar que foi feita a extração do DNA total de todas as cepas de *Trichoderma* utilizadas neste trabalho e encaminhadas para identificação molecular no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da UFG. No entanto, com o advento da pandemia, as atividades do referido laboratório foram paralisadas e estamos aguardando o retorno destas atividades para que a identificação, à nível de espécie, das cepas de *Trichoderma* seja realizada.

Nosso trabalho adiciona evidências que *Trichoderma* spp tem papel na promoção de crescimento, na produtividade das plantas, na proteção de plantas contra fitopatógenos por competição (Chet 1989, Silva et al. 2012, González-Estrada et al. 2018), micoparasitismo (Verma et al. 2007, Vinale et al. 2008, Geraldine et al. 2013, Medeiros et al. 2017) e antibiose (Lorito et al. 2010, Druzhinina et al. 2011, Kubicek et al. 2011,

Hermosa et al. 2014), na indução de mecanismos de resistência ((Shoresh et al. 2010, Hermosa et al. 2012) e produção de compostos voláteis (Harman, 2000 , Verma et al. 2007 , Vinale et al. 2008, Daguerre et al. 2016). Particularmente cepas endofíticas têm sido usados para controlar doenças em plantas (Bonanomi et al. 2018).

A competência endofítica e rizosférica, em muitos casos, persiste durante uma safra anual e fungos endofíticos podem ser potencialmente usados para o tratamento de sementes (Harman et al. 2004b). *Trichoderma* sp adicionado como um tratamento cresce rapidamente a partir da semente e da raiz da planta e então se estabelece. Fungos do gênero *Trichoderma* atuam no controle de doenças acima do solo e são considerados responsáveis por respostas sistêmicas que ocorrem em toda a planta, mesmo se a colonização estiver nas raízes (Harman 2011, Woo et al. 2014, Doni et al. 2017). *Trichoderma* spp é sensível a pequenas modificações nas características do solo como disponibilidade de nutrientes, temperatura, proporção de O₂ e CO₂ e pH definindo seu potencial supressor (Danielson & Davey, 1973), interferindo nos mecanismos de ação como o hiperparasitismo, competição, antibiose e indução de resistência (Hoitink et al. 2006, Barbosa et al. 2021). Segundo Druzhinina et al. 2011, boa parte deles pode ter sua distribuição restrita ao tipo de ambiente. Dessa maneira, a maioria dos *Trichoderma* sp isolados, testados e selecionados para o controle biológico de doenças e promoção de crescimento, podem pertencer a um grupo delimitado de espécies (Woo et al. 2014).

A seleção de novas espécies e estudos envolvendo *Trichoderma* sp nativas do Cerrado e Pantanal são de grande importância, pois os produtos comerciais disponíveis são oriundos de *Trichoderma* sp de outros biomas e de outras regiões, deste modo os resultados podem ser menos eficientes do que das espécies nativa. Está é uma condição bastante relevante, pois, o estado está em expansão agrícola acelerada e necessita de estratégias eficientes. Neste contexto, nossos resultados são relevantes para o controle biológico de fitopatógenos visando a conservação da biodiversidade, pois, o uso de cepas provenientes da região do Cerrado e Pantanal, nos quais as espécies de *Trichoderma* estão adaptadas, desempenham um papel importante no equilíbrio dinâmico destes ecossistemas (Guzmán-Guzmán et al. 2019).

Os efeitos nocivos causados por fungos em plantas, assim como o controle por pesticidas químicos, associados ao alto custo do seu uso representam um problema global. Assim, a investigação da atividade antifúngica e a capacidade de várias cepas de *Trichoderma* em inibir o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* e outros três fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium* sp) foram

avaliados conforme sumarizado na Tab 4 para *S. sclerotiorum* e na Fig 12, respectivamente. Os ensaios de antagonismo entre as cepas de *Trichoderma* spp. e fungos fitopatogênicos mostraram que este gênero apresenta grande capacidade de inibição de crescimento dos fitopatógenos testados (Fig 8 a 14 e Tab 4). As cepas de *Trichoderma* sp apresentaram variações na capacidade de limitar o crescimento do fitopatógeno, assim como relatado por Lopes et al. (2012), no qual a maioria das cepas mostrou antagonismo moderadamente eficiente ou bastante eficiente contra *S. sclerotiorum*. Harman (2006) e Santoyo et al. (2021), afirmaram que diferentes cepas podem exibir diferentes padrões de micoparasitismo. Dentre as cepas avaliadas, 38 das 57 cepas foram ativas no processo de inibição de *S. sclerotiorum*, correspondendo a 67% das amostras testadas, sendo que 19 cepas (33%) causaram em torno de 80% de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* (Tab 4). Muitos autores têm encontrado resultados semelhantes em testes de antagonismo com diferentes espécies e cepas de *Trichoderma* spp. e a ação deste gênero já é bastante reconhecida (Monteiro et al. 2010, Hermosa et al. 2012, Lopes et al. 2012, Qualhato et al. 2013, Andrade-Hoyos et al. 2020, Ferreira et al. 2021). A intensidade do contato físico durante o micoparasitismo pode diferir de um isolado para outro acarretando mudanças e variações nos processos metabólicos. As enzimas envolvidas na degradação da parede celular exibem mudanças semelhantes durante as interações micoparasitárias com os fungos fitopatogênicos distintos, assim diferentes padrões de micoparasitismo podem ser expressos. As enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da parede celular são relatadas como sendo reguladas positivamente durante o confronto com fungos patogênicos de plantas. Segundo Ramada et al. (2016), as proteases secretadas durante o hiperparasitismo são fatores importantes na degradação das paredes celulares dos fungos.

A produção de escleródios por *S. sclerotiorum* foi observada nas placas de pareamento de confrontação direta, como nos experimentos realizados com as cepas T₁, T₂₅ e T₅₅ (Fig 9). Os escleródios são estruturas de reprodução assexuada, melanizadas de diferentes tamanhos, que servem como estruturas de sobrevivência, com uma medula central de hifas de paredes finas, rica em reservas de lipídios e glicogênio (Kohn 1979, Bolton et al. 2006), que lhes permite sobreviver no solo por até cinco anos (Adams e Ayers, 1979, Steadman, 1983, Grabicoski et al. 2014). Além do aumento da secreção enzimática durante as interações com fungos hospedeiros, ocorrem processos de diferenciação, levando a alterações morfológicas e à formação de estruturas de penetração em *Trichoderma* spp. (Nogueira –Lopez et al, 2018) e estruturas de resistência. Portanto,

os escleródios são produzidos em resposta ao antagonista e para se proteger do efeito fungicida de *Trichoderma* spp.

O cultivo em lâmina mostrou que a cepa T₅₇ reconhece o hospedeiro fúngico pela formação de estruturas de adesão (apressórios) em torno das hifas de *S. sclerotiorum*. O micoparasita crescendo e se enrolando sobre as hifas de *S. sclerotiorum* com a formação de apressórios pode ser observado na Fig 10. Tais estruturas fazem parte dos processos de micoparasitismo desenvolvidos por várias espécies de *Trichoderma*. Em ensaios de confronto duplo realizado por Druzhinina et al. (2018) e Chaverri & Samuels (2013), todas as cepas de *Trichoderma* spp. foram capazes de parasitar o fitopatógeno. Esta capacidade é provavelmente uma força dominante que impulsionou a sua diversificação (Druzhinina et al. 2018). Os apressórios são formados por extremidades de hifas diferenciadas em forma de gancho e têm a função de fixar o micoparasita ao hospedeiro, permitindo a penetração no tecido pelas hifas de *Trichoderma* spp. (Yedidia et al. 1999, Hermosa et al. 2012), inibindo o avanço do fitopatógeno. Segundo Rajesh et al. (2016) e Sood et al. (2020) esta é uma característica desejável no controle de fungos fitopatogênicos. Basicamente ocorrem dois tipos de interação física entre *Trichoderma* sp e o fitopatógeno, o micoparasita produz apressórios e/ou se enrola nas hifas do hospedeiro (Dennis & Webster 1971, Elad et al. 1983, Silva et al. 2019, Mukhopadhyay & Kumar, 2020). Foi observado no perfil de inibição de crescimento de *S. sclerotiorum*, que 32 cepas retardaram o início do crescimento do fitopatógeno, em 48 horas, enquanto que a cepa T₃₆ exibiu um retardo de crescimento de 72 horas. A cepa T₅₇ apresentou a maior porcentagem de inibição (84 %), que ocorreu a partir de 48 horas (Fig 11). Deste modo, o micoparasitismo não é apenas o resultado do contato físico, mas pode ser seguido de um processo de reconhecimento precoce, que leva à indução da expressão gênica de enzimas hidrolíticas, produção de apressórios, escleródios e por antibiose.

Na Fig 12 podemos notar que as cepas T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇ inibiram o crescimento de *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* sp e *Rhizoctonia solani* nos ensaios de antagonismo por confrontação direta, que variou de 56 a 72%, 54 a 86% e 58 a 78% respectivamente. Khaledi & Taheri (2016) avaliou o controle *in vitro* de *M. phaseolina* utilizando onze cepas de *Trichoderma*, que apresentaram entre 57,3 e 58,7% de inibição. Qualhato et al. (2013), mostraram antagonismo eficiente contra *S. sclerotiorum* e *R. solani* e moderado antagonismo contra *Fusarium* sp e afirmaram que o antagonismo do gênero *Trichoderma* contra vários patógenos varia entre espécies de *Trichoderma* e até mesmo entre cepas da mesma espécie. Diferente dos resultados

encontrados, Mendoza et al. (2015), observaram uma forte diminuição no crescimento de uma cepa de *Trichoderma* sp, em vez de repressão de crescimento de colônias de *M. phaseolina*. Espécies de *Trichoderma* têm a capacidade de suprimir o crescimento de vários fitopatógenos, principalmente em substratos sólidos, como visualizado na Fig 13. Houve a produção de pigmentos em algumas placas como pode ser observado na Fig 14. Isto possivelmente está relacionado à ação de antibiose, hiperparasitismo e competição (Harnan et al. 2004, Karuppiyah et al. 2019). Estudos sobre o modo de ação de antagonistas mostram que geralmente não se baseia em uma única ação de um determinado modo de ação, mas em uma sequência de eventos com o uso de diferentes modos de ação ao longo do tempo (Karlsson et al. 2017). Agentes de controle biológico podem interagir diretamente com o patógeno por hiperparasitismo ou antibiose, sendo os principais mecanismos envolvidos a excreção de CWDEs combinada com a excreção de metabólitos secundários antimicrobianos, que causam aberturas na parede celular e subsequente desorganização do citoplasma, essenciais para o patógeno durante a infecção do hospedeiro (Jeffries 1995, Ghorbanpour et al. 2018). A captura rápida e eficiente de recursos pelo antagonista o define como bom competidor, cuja ação determinará o nível de nutrientes e espaço disponíveis para o fitopatógeno. Uma vez que o rápido crescimento e a colonização do substrato são de importância fundamental durante a competição, os antagonistas são de competência ecológica superior (Köhl et al. 2011).

Hermosa et al. (2013) afirmaram que as espécies de *Trichoderma* são adaptadas a diferentes nichos ecológicos sendo capazes de catabolizar uma grande variedade de substratos, bem como produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, como a produção de compostos orgânicos que volatilizam facilmente, enquanto que os metabólitos não voláteis ficam retidos no meio de cultura com atividade citotóxica, tais como enzimas degradadoras de parede celular, conferindo a capacidade em parasitar fungos (hiperparasitismo) e competição por espaço e nutrientes (Meena et al. 2017, Druzhinina et al. 2018, Hyde et al. 2019). Nossos achados fornecem indicações adicionais de que espécies de fungos endofíticos de *Trichoderma* exibem atividade competitiva, citotóxica e antimicrobiana.

Dentre as 57 cepas avaliadas para a produção de compostos voláteis nos ensaios de confronto indireto (Fig 15) 51 delas foram bastante ativas no processo de inibição de *S. sclerotiorum*, correspondendo a 89% das amostras testadas, sendo que 11% inibiram em média 70% do crescimento de *S. sclerotiorum*. No ensaio com placas pareadas, as cepas de *Trichoderma* inibiram o crescimento de *S. sclerotiorum* em até 93% (Tabela 5), sendo

que a cepa T₂₅ apresentou o melhor resultado. Além da redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, este, quando exposto aos compostos voláteis de *Trichoderma* spp. apresentou colônias com micélio menos denso (Fig 16). As porcentagens de inibição foram maiores que as obtidas por Amin et al. (2010), Chet et al. (1981) e Castillo et al. (2011) que avaliaram o efeito inibitório de 41 cepas de *Trichoderma* sp em fungos fitopatogênicos e os resultados variaram de 0 a 28,0% de inibição. Além destes trabalhos, Mesquita et al. (2017) avaliaram 13 cepas de *Trichoderma* sp contra *S. sclerotiorum* e a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* observada foi de 13 a 40%. Por outro lado, Lopes et al. (2012), encontraram valores de inibição entre 40,7 até 60% para o mesmo fitopatógeno, quando avaliados na ação dos constituintes voláteis. Assim, nossos resultados mostraram que as cepas de *Trichoderma* avaliadas foram extremamente eficientes, quando comparadas aos resultados de outros autores. As espécies de *Trichoderma* são consideradas eficientes antagonistas contra fungos fitopatogênicos e seu modo de ação inclui a produção de metabólitos voláteis e não voláteis (Claydon et al. 1987, Camporota 1985, Rai et al. 1980, Dennis & Webster 1971ab) através do hiperparasitismo (Papavizas 1985, Barak et al. 1985, Vajna 1985 ab, Chet & Elad 1983, Dennis & Webster 1971c, Barnett 2003) e pela competição por nutrientes, espaço e oxigênio (Chet & Elad, 1983), levando a níveis mais elevados de antagonismo (Lorito et al. 1994).

Corroborando com os trabalhos de Lopes et al. (2012), a antibiose e o antagonismo por confrontação direta contra *S. sclerotiorum* não foram espécie-dependentes. Neste trabalho, diferentes cepas de *Trichoderma* apresentaram resultados diferentes, sugerindo um sinergismo entre antibiose e competição. Estes diferentes tipos de resultado, podem estar presentes entre microrganismos da mesma espécie ou entre diferentes espécies e os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente ao longo do processo de vida do antagonista e se sobrepor, levando a maior eficiência para o controle biológico (Lorito et al. 1994). Os padrões interativos podem ser positivos (mutualismo, sinergismo ou comensalismo), negativos (amensalismo, incluindo predação, parasitismo, antagonismo ou competição) ou neutros nas capacidades funcionais ou como aptidão estratégica de vida microbiana (Contreras e Cornejo, 2016). Atualmente, estas diferentes interações podem ser racionalmente exploradas e culminar em aplicações úteis, como na saúde, indústria de alimentos e agricultura, onde as comunidades microbianas determinam a sustentabilidade do ecossistema (Vogel et al. 2020).

Atividade de enzimas degradadoras de parede celular produzidas por cepas de *Trichoderma* spp.

Espécies do gênero *Trichoderma* são detentoras de um dos maiores conjuntos de proteínas entre os fungos, sendo estas capazes de inativar enzimas secretadas por fitopatógenos durante o processo de infecção em plantas (Ramada et al. 2016). A expressão dessas enzimas, muitas das quais degradam parede celular de fungos, tem sido frequentemente relatada como induzidas por componentes da própria parede celular (Peberdy et al. 1990, Ulhoa & Peberdy, 1993, Lopes et al. 2012, Rao et al. 2016). Este estudo investigou a produção de enzimas degradadoras de parede celular por 57 cepas de *Trichoderma* (Fig 17) e todas mostraram atividades específicas para enzimas-chave como β -1,3 glucanase, NAGase, protease, fosfatase e quitinase. As cepas T₈ e T₅₇ apresentaram as maiores atividades de β -1,3 glucanase, enquanto que T₂₃ e T₅₇ de protease, quando comparadas com as outras cepas. Um total de 42 e 20 cepas apresentaram atividades específicas de β -1,3 glucanase e protease maior que 2 U.mg⁻¹ de proteína, respectivamente. Todas as outras cepas de *Trichoderma* apresentaram atividades de β -1,3-glucanase entre 1,1 e 1,8 U.mg⁻¹, e apenas T₄, T₃₂ e T₃₉ apresentaram atividade em torno de 0,4 U.mg⁻¹. A cepa T₈ apresentou atividades de β - (1–3) glucanase igual a 5,30 U.mg⁻¹ e 13% maior que T₅₇ e foi de 4,60 U.mg⁻¹. A cepa T₅₇ apresentou atividade proteásica de 5,41 U.mg⁻¹, sendo esta 22% maior do que a observada para T₂₃ (4,20 U.mg⁻¹). Lopes et al. (2012) avaliaram cepas de *Trichoderma* e encontrou a maior atividade com valor de 3,156 U.mg⁻¹ para β -1,3-glucanase e para protease vários valores foram similares aos encontrados neste trabalho.

Uma baixa atividade de fosfatase pode ser registrada para todas as cepas, o que por sua vez provou a necessidade de uma fonte de fosfato insolúvel para a secreção desta enzima. Morandi e Bettioli (2009) relatam o uso deste microrganismo com sucesso no Brasil, para o controle de patógenos de solo. Estes microrganismos estão na maioria associados com as raízes e rizosfera das plantas, podendo atuar solubilizando compostos que estimulam o crescimento e o mecanismo de defesa das plantas contra fitopatógenos (Benítez et. al. 2004).

A variabilidade observada nos sistemas enzimáticos de *Trichoderma* pode ser atribuída, principalmente às diferenças nas capacidades constitutivas de acionar um padrão específico (Horta et al. 2018). As quitinases são constitutivas e a sua produção contínua em níveis residuais, pode ser suficiente para iniciar a degradação da quitina e a

subsequente liberação de oligômeros solúveis (Schickler et al. 1998, Peter 2002, Gortari & Hours, 2008). Suriani et al. (2019) sugeriram que esta enzima em níveis basais pode estar relacionada com o crescimento fúngico. A quitina é um polímero constituído por polissacarídeo e assim como β -1,3-glucana e proteínas são os principais componentes estruturais das paredes celulares de fungos (Peberdy et al. 1990). Estes componentes suportam a afirmação de que enzimas hidrolíticas produzidas por *Trichoderma* spp. desempenham um papel importante na destruição de patógenos vegetais (Chet et al. 1981). A enzima β -1,3 glucanase é secretada durante os processos de infecção (Challacombe et al. 2019) e elas agem sinergicamente com as proteases, ambas envolvidas na degradação das cutículas dos insetos e das paredes celulares dos fungos, durante processos de controle biológico (Lopes et al. 2012, Qualhato et al. 2013, Ramada et al. 2016, Javeria et al. 2020). A *N*-acetil- β -D-glicosaminidase atua na hidrólise de quitina de forma coordenada com as quitinases e é considerada essencial para o processo de micoparasitismo (Kubicek et al. 2001, López-Mondéjar et al. 2011, Geraldine et al. 2013).

Nosso estudo revelou várias cepas com atividades específicas altas e médias para enzimas-chave no processo micoparasítico e para o controle biológico de *S. Sclerotiorum*, como por exemplo a β -1,3 glucanase e proteases. As cepas de *Trichoderma* aqui estudadas são únicas e exibiram uma capacidade potencial de secretar CWDEs, como β -1,3 glucanases, NAGases proteases, fosfatases e quitinases, que hidrolisam as paredes celulares de patógenos (Fig 18) e estão relacionadas às habilidades parasitárias inibindo o desenvolvimento de outros microrganismos (Verma et al. 2007, Seidl, 2009b, López-Mondéjar et al. 2011). Os resultados encontrados podem ser explicados pela alta complexidade dos processos regulatórios de produção de CWDEs em associação com as adaptações causadas por diferentes pressões ambientais (Naranjo-Ortiz e Gabaldón, 2019), que por sua vez atuam sobre os componentes do holobionte moldando o microrganismo (Hassani et al. 2018).

Promoção do crescimento e severidade da doença em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) tratadas com micélios de *Sclerotinia sclerotiorum*

- Plantas de feijão nebulizadas com solução de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*

Vários fungos causam apodrecimento e afetando os diferentes tecidos das plantas como raízes, caules e folhas prejudicando consideravelmente o rendimento da agricultura. Um exemplo é o mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que é uma das principais e mais destrutivas doenças do feijoeiro (Pomella & Ribeiro 2009, Lobo Junior et al. 2009, Viteri et al. 2015, Smolińska et al. 2018, Ribeiro 2021).

O gênero *Trichoderma* spp. tem sido utilizado em aplicações agrícolas devido ao seu conhecido mecanismo de controle biológico reduzindo a severidade de doenças causadas por patógenos foliares (Sriram et al. 2009, Fontenelle et al. 2011, Silva et al. 2011, Pedro et al. 2012). Esses microrganismos podem formar associações endofíticas influenciando assim a proteção contra doenças, crescimento e rendimento da planta (Hermosa et al. 2012). *Trichoderma* spp. colonizam a epiderme e as células do córtex de raízes e, conseqüentemente, ativam vias de sinalização, o que desencadeiam respostas de defesa nas plantas, através da ativação de mecanismos de resistência latente (Bailey et al. 2006, Brotman et al. 2010, Rocha et al. 2014, Silva et al. 2019). As defesas induzidas são ativadas apenas após o ataque do patógeno, sendo considerada uma vantagem seletiva sobre a resistência constitutiva (Walters & Heil, 2007). Ela é de amplo espectro contra microrganismos e os resultados são variados (Morelli et al. 2020). A percepção do secretoma de *Trichoderma* pelas raízes das plantas é a primeira etapa nas reações em cadeia que interferem diretamente no antagonismo, no crescimento (Callens et al. 2018, Saxena et al. 2020) e nas redes de sinalização em suas plantas hospedeiras conferindo resistência à doenças e/ou tolerância ao estresse (Alfiky & Weisskopf, 2021).

Pesquisadores de todo o mundo têm relacionado o sucesso de *Trichoderma* spp. como sendo uma técnica de controle biológico, que garante a colonização da raiz para fornecer benefícios à planta (Hermosa et al. 2012, Contreras-Cornejo 2016, Zin & Badaluddin, 2020).

Para avaliar a capacidade de promoção do crescimento e a redução da severidade da doença em plantas de feijão tratadas com micélios de *Sclerotinia sclerotiorum* foram selecionadas oito cepas (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇) considerando os resultados obtidos nos ensaios de inibição do crescimento (confronto direto e indireto), as atividades enzimáticas, locais de origem e características culturais em diferentes meios de cultura.

Em um trabalho realizado por Kandel et al. (2018), foi sugerido que o método de spray de micélio pode prever a resistência de campo, sendo mais eficiente e severo. Além disso, este é um método de inoculação *in vivo* que não requer ferimento das plantas para teste. Os mecanismos envolvidos no biocontrole de patógenos foliares por espécies de

Trichoderma são os mesmos envolvidos no controle de patógenos de raiz, ou seja, micoparasitismo, antibiose e competição por espaço e nutrientes, indução de resistência sistêmica e mais de um mecanismo pode estar envolvido na interação patógeno-hospedeiro (Sawant, 2014).

Considerando que não há relatos de estudos de biocontrole do mofo branco em plantas de feijão com cepas endofíticas de *Trichoderma* e isoladas do cenário ambiental de Mato Grosso do Sul, aqui foram testadas oito cepas endofíticas (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇), quanto ao crescimento das plantas. As plantas foram avaliadas individualmente, quanto à suscetibilidade ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*, após aspersão de solução de micélio na parte aérea. Três cepas (T₂₅, T₅₅ e T₅₇) apresentaram avaliações do crescimento, que proporcionaram aumentos na massa de matéria seca de 20%, T₂₇ aumentou em 10%, T₅₁ não apresentou resultados significativos quando comparados ao controle. Por outro lado T₁ e T₈ apresentaram uma redução de 10%. (Fig 18). Houve uma relação direta entre o comprimento da raiz, a área foliar e o comprimento do caule em todos os tratamentos. Quanto menor a área foliar menor a raiz e menor o comprimento do caule, conseqüentemente menor peso fresco e seco (Fig 19 e Tabela 6).

As percentagens de redução na severidade da doença variaram entre 67% e 100%, cujas notas correspondem a 2,0 e 1,0 (Bell et al. 1982). Apenas a cepa T₄₆ não conferiu proteção ao mofo branco recebendo nota 5,2 (Fig 20). Foram observados resultados diferentes entre os tratamentos e extensão das lesões sofridas nas folhas (Fig 21). Pedro et al. (2012), testaram cepas de *Trichoderma* aspergindo solução contendo o fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas de feijão e obtiveram proteção entre 77 e 100% com relação ao mofo-cinzento em todas as plantas. De Meyer et al. (1998) aplicaram *T. harzianum* no solo, sete dias antes da inoculação de *Botrytis cinerea* em feijão e observaram reduções de 35% na severidade da doença do mofo-cinzento nas plantas, atribuindo a redução dos sintomas da doença à indução de resistência ativada pelo antagonista. As diferenças significativas dos resultados entre os tratamentos é um indicativo de que a ativação das defesas da planta está ocorrendo em resposta à aplicação de diferentes cepas de *Trichoderma* (Hermosa et al. 2013, Rivera-Méndez et al., 2019).

- Plantas de feijão cultivadas em solo contendo micélio de *S. sclerotiorum* e cepas de *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* apresenta uma maquinaria poderosa para o controle biológico e esta tem sido a principal motivação para explorar a eficácia de diferentes

espécies e/ou cepas, seja na prevenção ou no tratamento contra patógenos de plantas (Alfiky & Weisskopf 2021). O uso de biocontrole como coadjuvante, se torna especial, principalmente quando os tratamentos químicos como os fungicidas são ineficazes ou economicamente inviáveis (Hyde et al. 2019). Além disso, a redução no uso de produtos químicos nos campos é um dos objetivos da agricultura moderna e isto envolve práticas sustentáveis e ecologicamente corretas que podem reduzir danos ambientais, na saúde humana e animal (Ons et al. 2020). Nesse sentido, os agentes biológicos constituem uma excelente alternativa para substituir produtos químicos para o controle de pragas ou melhoria do crescimento (Herrera-Téllez et al. 2019).

Nestes experimentos, o fitopatógeno foi aplicado no solo, e não nebulizado nas folhas, como no experimento anterior. Três cepas apresentaram as maiores porcentagens de ganho de massa de matéria fresca e seca: T₁ apresentou aumento de 10 e 38%, T₂₅ de 28 e 47%, e T₅₅ de 38 e 53%, respectivamente, em relação ao controle. O tratamento Ss (somente com *S. sclerotiorum*), causou uma redução de 90% na matéria seca das plantas de feijão (Fig 23). Neste experimento também houve uma relação direta entre o comprimento da raiz, a área foliar e comprimento do caule em todos os tratamentos. (Fig 24). Apesar das plantas tratadas com a cepa T₅₇ terem apresentado maior altura, o resultado não foi estatisticamente diferente de T₁, T₈, T₅₁ nos parâmetros avaliados e os tratamentos T₄₆ e Ss também apresentaram resultados semelhantes entre si (Fig 24 e Tabela 7). As porcentagens de redução na severidade da doença variaram entre 31% e 100%, cujas notas correspondem a 3,2 e 1,0. As cepas T₁, T₈, T₄₆, T₅₁ e T₅₇, conferiram baixa proteção ao mofo branco recebendo notas 2,0, 3,2, 2,9, 2,7 e 2,6, respectivamente (Fig 25), enquanto que os tratamentos C, T₂₅ e T₅₅ apresentaram plantas sem sinais da doença e receberam nota 1,0. Nos tratamentos com a cepa T₂₇, apenas uma planta apresentou as folhas do primeiro nó murchas e foi considerado como sintoma do mofo branco, recebendo nota 1,3 (Fig 26). O aspecto geral das plantas tratadas com T₂₅ e do controle (C) pode ser observado na Fig 27 e podemos inferir que tanto a cepa T₂₅ como a T₅₅ não apenas protegeram as plantas contra o mofo branco, como também promoveram o crescimento das mesmas (Tabela 8).

As plantas hospedam microrganismos endofíticos, que promovem o seu bom desempenho, em particular sob estresse (Tseng et al. 2020). Na ausência do agente do biocontrole, *S. sclerotiorum* infectou as plantas e causou podridão do caule, as folhas de várias plantas ficaram retorcidas, as lesões eram na forma de manchas irregulares, marrons, espalhadas nas folhas e no caule, entumecidas de líquido, e ocorreu a formação

de escleródios (Fig 28). Como descrito por Heffer Link & Johnson (2007), observou-se hifas cotonosas do patógeno, que quase aglomeraram e amadureceram, formando escleródios duros e escuros. Segundo Geraldine et al. (2013), o ciclo da doença deve ter sido acelerado onde não houve a proteção de *Trichoderma* sp, com ataque precoce às plantas, maior severidade da doença e formação rápida de escleródios.

Reisolamento das cepas de *Trichoderma* sp utilizadas nos tratamentos de plantas de feijão após o teste do inóculo de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo

As habilidades já descritas para o gênero *Trichoderma*, bem como seu hábito cosmopolita, sustentam os resultados obtidos neste trabalho, onde evidenciou-se a capacidade de cepas de *Trichoderma* no biocontrole do mofo branco e/ou como agentes promotores de crescimento em plantas de feijão. Para corroborar a hipótese de que este gênero tem o potencial de realizar interações simbióticas com seus hospedeiros, foram realizados procedimentos de re-isolamento das cepas introduzidas no solo, a partir das raízes das plantas tratadas. O resultado foi o isolamento de quatro cepas das plantas de feijão tratadas com T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁ e T₅₇ (Fig 29). Quando comparamos as características culturais de tais cepas, observamos que T₂₅ e T₂₇ apresentaram aspectos semelhantes quanto ao crescimento micelial em placa contendo meio de cultura MEA e BDA (Fig 30), assim como a velocidade de crescimento ao longo de 48 e 72 horas, a presença ou ausência de odor e produção de pigmento no meio de cultura (Tab. 9). Também foram analisadas as características microscópicas das estruturas de reprodução (conidióforo). Além disso, as cepas T₂₅ e T₂₇ foram muito parecidas com as isoladas das plantas de feijão, quanto ao número de ramificação do conidióforo e apresentação da haste conidial (Fig 31). Atualmente a obtenção das características fenotípicas ainda é amplamente aplicada na delimitação de espécies de *Trichoderma*. Porém, a filogenia molecular, baseada em sequência das regiões do espaçador transcrito interno (ITS), subunidade da RNA polimerase II (RPB2) e o gene do fator de alongamento da tradução 1- α (TEF1- α), nos permitirá a identificação precisa das espécies de *Trichoderma* sp (Druzhinina et al. 2005, Chaverri et al. 2015). Segundo Zin et al. (2020), as dificuldades encontradas durante a identificação de cepas de *Trichoderma* em nível de espécie tornam-se mais significativas devido às diferenças morfológicas serem raras e difíceis de observar, mas podem ser identificadas algumas características morfológicas comuns. A identificação

molecular está sendo realizada, cujos resultados serão utilizados para publicação de artigo.

Teste de hiperparasitismo e viabilidade dos escleródios

Estudos ecofisiológicos revelaram que todas as espécies de *Trichoderma* são eficazes parasitas de fungos fitopatogênicos e de oomicetos (Druzhinina et al. 2018), sendo esta uma estratégia de nutrição biotrófica (Kubicek et al. 2011, Ramada et al. 2016, Monte et al. 2019). Apesar da diversidade do gênero, a maior parte dos estudos de micoparasitismo por *Trichoderma* foi realizada com poucas espécies, como *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. atroviride* e *T. asperellum* (Meyer et al. 2019).

Neste trabalho foram avaliadas oito cepas de *Trichoderma* spp. quanto a capacidade de hiperparasitar e inativar escleródios de *S. sclerotiorum*. Todas as cepas foram cultivadas sobre escleródios de *S. sclerotiorum*. O resultado deste micoparasitismo é a podridão mole e na maioria dos casos, o hiperparasitismo varia significativamente entre cepas (Santos e Dhingra 1982, Monte et al. 2019). As cepas (T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇) inativaram 100% dos escleródios, enquanto que T₁ e T₈ apresentaram um escleródio em germinação, em cada tratamento, sobre discos de cenoura (Fig 32). A redução destas estruturas de resistência ficou entre 20 e 40%, sendo que vários escleródios perderam sua integridade no solo ou se desintegraram sob a mais leve pressão durante o manuseio (Tab. 10). Segundo Willets (1971), apesar do tecido pseudoparenquimatoso ser mantido relativamente intacto, isto ocorre devido à presença de melanina nas paredes celulares, que sustenta a forma do escleródio. Os diferentes resultados, podem ser atribuídos à variação na agressividade de cada cepa de *Trichoderma* utilizada (Santos & Dhingra, 1982), A podridão mole causada nos escleródios pode ser devido ao aparato enzimático exibido por *Trichoderma* spp. na quebra de tecidos pseudoparenquimatosos. Especialmente as proteases e β -1,3 glucanases e o sinergismo de NAGases e quitinases, são considerados essenciais para o processo de micoparasitismo (Kubicek et al. 2001, López-Mondéjar et al. 2011, Ramada et al. 2016). As cepas T₂₅, T₂₇, T₄₆, T₅₁, T₅₅ e T₅₇ provaram ser micoparasitas eficazes contra escleródios de *S. sclerotiorum* e causaram grandes perdas de viabilidade após 15 dias de incubação (Tabela 10).

Promoção de crescimento em plantas de feijão utilizando cepas de *Trichoderma* sp na ausência de fungos fitopatogênicos

Com o intuito de testar a capacidade das cepas de *Trichoderma* em promover o crescimento e desenvolvimento de plantas de feijão, foi feita a inoculação de grãos de arroz colonizados por *Trichoderma* spp. no solo. Todos os tratamentos apresentaram ganho de massa fresca em relação ao controle, exceto no tratamento com a cepa T₄₆ (Fig 33). Os resultados revelaram que algumas das cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas neste trabalho podem melhorar os parâmetros de crescimento de plantas como por exemplo o aumento do peso seco em até 54%. As plantas tratadas com a cepa T₅₇ apresentaram os maiores valores para todos os parâmetros avaliados. O comprimento do caule, não diferiu entre o controle e os tratamentos, mas os comprimentos das raízes variaram entre os tratamentos, e de modo geral foram maiores que o controle, contribuindo para o crescimento das plantas, com exceção da cepa T₄₆ (Fig 34).

As raízes em associação com esses fungos frequentemente são maiores e mais robustas (Harman 2000). A raiz é responsável pela absorção de nutrientes disponíveis no solo e pelo desenvolvimento da planta, o que a torna uma variável importante (Hermosa et al. 2012, Brotman et al. 2013, Olanrewaju et al. 2017). Os melhores resultados para o comprimento da planta e a área foliar foram apresentados por T₅₅ e T₅₇ (Tab. 12). É na rizosfera que estes microrganismos poderão desempenhar diversas funções para a promoção do desenvolvimento vegetal, como solubilização de fosfato, síntese de sideróforos e fitormônios (Gouda et al. 2018). Quando adicionado ao solo, *Trichoderma* pode acarretar grandes mudanças no proteoma das plantas, alterando os processos metabólicos de carboidratos e melhorando a maquinaria fotossintética, fornecendo à planta em crescimento mais energia e uma fonte de carbono (Harman et al. 2004a, Shores & Harman 2008). Hoyos-Carvajal e Bisset (2009) avaliaram plantas de feijão em casa de vegetação e encontraram como resultados a promoção, inibição ou atraso no desenvolvimento das plantas para as diferentes espécies de *Trichoderma* e eles consideraram o comprimento de raiz e altura da planta bons indicadores para a promoção de crescimento.

Apesar das características morfológicas e fisiológicas da própria semente estarem relacionadas à taxa de germinação (Popinigs 1985), a promoção da germinação é um mecanismo específico de cepas de *Trichoderma* spp. podendo promover, inibir ou não alterar este processo (Machado et al. 2015). As divergências nos resultados podem ser explicadas pela trajetória evolutiva e pelo ambiente do holobionte do qual originou a cepa de *Trichoderma* (Harman & Uphoff 2019).

Os parâmetros avaliados foram considerados em combinação, mas independentes entre si (PCA) e indicam que todos os tratamentos influenciaram positivamente no desenvolvimento das plantas de feijão, com exceção da cepa T₄₆ (Fig35).

É sugerido que a maquinaria genética desta cepa não é capaz de proteger as plantas avaliadas nem promover o crescimento e desenvolvimento vegetal, por fatores que são desconhecidos e precisam ser ainda melhor estudados. Tais resultados devem ser considerados como recursos valiosos para aplicações na agricultura (Rivera-Méndez et al. 2020), o que torna este estudo uma contribuição significativa para este campo. As pesquisas revelam que o uso de *Trichoderma* spp. causa impacto direto na produtividade das colheitas e são excelentes promotores de crescimento de plantas (Harman et al. 2004, Vinale et al, 2008 e 2009, Viterbo et al. 2010, Steindorff et al. 2014, Ramada et al. 2016, Lopes et al. 2021).

As plantas existem em associação com seus colonizadores microbianos formando uma assembléia de diferentes espécies que, juntas, formam uma unidade ecológica funcional – o holobionte. As plantas cultivadas podem apresentar associações preferenciais a fim de melhorar o seu rendimento (Pang et al. 2021). Neste contexto, o uso de microrganismos promotores de crescimento tem se mostrado uma técnica vantajosa para melhorar a produtividade de culturas, bem como a qualidade e a segurança dos alimentos em sistemas agrícolas mais sustentáveis e ecológicos (Etesani 2020). Quando o componente microbiano do holobionte é alterado por intervenção proposital, esta associação pode ser preditiva para a seleção de cepas como bioinoculantes, a fim de melhorar a produtividade da cultura (Harman et al. 2004, Woo et al. 2006, Hoyos-Carvajal 2009, Hermosa et al. 2012, Harman & Uphoff 2019). Há um interesse crescente pelos bioestimulantes naturais e diversos estudos documentam seus efeitos benéficos na produtividade e na qualidade das culturas. A capacidade de *Trichoderma* spp. em colonizar plantas é um fator importante em sua eficácia na germinação de sementes e na promoção do crescimento de mudas (Howell 2003, Benítez et al. 2004, Contreras-Cornejo et al. 2016, Tseng et al. 2020). Isto porque muitas cepas são capazes de colonizar as raízes das plantas por meio da penetração direta nas paredes das células vegetais e algumas se tornam endófitas altamente eficientes que persistem por toda a vida do indivíduo (Harman & Uphoff 2019).

Análise de metabólitos secundários de cepas de *Trichoderma sp* por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Métodos analíticos para a identificação de voláteis são amplamente utilizados para estudar sua função nas interações biológicas. Neste experimento, foram identificados alguns compostos produzidos pelas cepas de *Trichoderma* das culturas vivas pareadas com *S. sclerotiorum*. Uma vez que a detecção desses metabólitos voláteis pode ser realizada por GC-EM, oferece uma ferramenta interessante e poderosa para o estudo dos voláteis bem como interações biológicas entre fungos antagônicos ou entre fungos e plantas (Guo et al. 2020).

As espécies de *Trichoderma* são produtoras prolíficas de metabólitos com impacto no crescimento das plantas (Lee et al. 2016). Estudos afirmam que derivados de *T. viride* aumentaram tamanho, peso fresco e crescimento da raiz em *Arabidopsis thaliana* e podem ser capazes de aumentar o vigor das plantas por emitir misturas voláteis (Lee et al. 2016, Drobek et al. 2019). Estes metabólitos são considerados protagonistas importantes e dependem da cepa, da duração da interação, do estado de desenvolvimento e do órgão da planta (Pieterse et al. 2009).

Estes experimentos foram realizados no início da fase experimental, quando ainda não haviam sido concluídos os estudos de casa de vegetação com as cepas posteriormente selecionadas. Novas análises serão realizadas, com as mesmas cepas utilizadas nos experimentos com as plantas de feijão, para que seja possível a realização de estudos comparativos.

Tabela 13: , lista alguns metabólitos detectados das cepas de *Trichoderma spp*.

Compostos	T ₁	T ₂₅	T ₂₇	T ₅₁	T ₅₅
β-cedrene		x	x	x	x
Sequifelandreno	x			x	x
Sesquisabineno	x				
α-Cedrol	x				x
Acorenol		x	x	x	
Acorenone		x			x
Epicubenol		x	x	x	x
Cembreno	x	x	x		
Verticelol	x				
Cadina-1,4-diene					x
7-Metanoazuleno		x	x	x	
Naphthalene			x		

Em geral, os perfis de compostos voláteis das cepas avaliadas revelaram algumas diferenças qualitativas. Dentre os vários compostos encontrados temos o acorenol, β -cedreno, sesquifelandreno, cembreno sesquisabineno, 7- metanoazuleno, α -cedrol, acorenona, epicubenol, verticelol, cadina-1,4-dieno e naftaleno (Fig 30) A natureza dos secretomas de *Trichoderma* é uma propriedade que depende do espectro ecológico das espécies de fungos e está intimamente relacionada aos fatores ambientais bióticos e abióticos (Ramada et al. 2016). Assim, a produção de compostos voláteis é uma característica específica e deve ser considerada como um efeito sinérgico (Lombardi et al. 2018, Guo et al. 2020), sendo conhecidos por sua ação contra fungos fitopatogênicos, como *S. sclerotiorum* (Salwan et al. 2019). Da mesma maneira, os compostos encontrados aqui são uma pista de que estas cepas têm potencial para biocontrole.

Os fungos emitem um grande número de compostos voláteis, cujo perfil muda à medida que os fungos crescem e amadurecem (Lee et al. 2016, Guo et al. 2019). Assim, os compostos voláteis produzidos e o tempo no desenvolvimento da cultura, juntos, podem influenciar na interação entre o biocontrole e o fitopatógeno (Bailly 2012) e a produção diversificada desses compostos pode estar relacionada a um estágio limitado do ciclo celular ou a um estágio específico de diferenciação morfológica, conferindo ao *Trichoderma* uma melhor interação com o hospedeiro e a sobrevivência competitiva em relação ao fitopatógeno (Zeilinger et al. 2016). Assim como, nossas análises contemplaram apenas um momento do pareamento das placas e pode não ter capturado todos os compostos voláteis, produzidos durante o crescimento de *Trichoderma* spp. (Fig 37), igualmente descrito por Lee e colaboradores (2016).

Alguns compostos são igualmente produzidos por plantas (Arruda et al. 2019), um atrativo de *Trichoderma* é que estes muitas vezes eles mimetizam os metabólitos das plantas (Monte et al. 2019), sendo assim capazes de promover o crescimento do hospedeiro. Ao longo dos experimentos de confrontação direta e indireta, em várias placas foram observados um odor frutado. Neste tratatlo, plantas de feijão na presença de diferentes cepas de *Trichoderma* sp, exibiram de modo geral, aumento no tamanho da planta, onde apenas o tratamento com a cepa (T₄₆) apresentou efeito inibitório do crescimento. Além do tamanho, as plantas apresentaram aumento da área foliar e cor verde mais escuro,, indicando um aumento na produção de clorofila. Apesar não ter sido quantificado este pigmento esta característica também foi observada por Lee et al. (2016) em *Arabidopsi*. Também foi possível sentir um leve odor de cera e aromas adocicados, características envolvidas no fenômeno de antagonismo por competição e antibiose,

podendo ser enzimas e/ou substâncias antibióticas voláteis e não voláteis (Mendoza et al. 2015). A promoção de crescimento de plantas por isolados de *Trichoderma* spp. foi descrita em culturas de feijão comum por Pedro et al. (2012), Nieto-Jacobo et al. (2017), Lobo Júnior et al. (2019) e foi facilmente observada como resultado do tratamento de sementes ou outras formas de aplicação.

As mudanças mediadas por compostos voláteis de *Trichoderma harzianum* no crescimento de feijão foram específicas e variou entre 68 e 83% (Lobo Junior et al. 2019). Resultados bastante promissores também foram encontrados por Marra et al. (2019, 2020), quando combinaram esporos de *Trichoderma* sp e 6PP (um metabólito bioativo) e obtiveram um aumento no peso seco entre 22 e 56%. Estes compostos produzidos por *Trichoderma* spp. desempenham papéis essenciais na defesa e comunicação química e alguns deles têm demonstrado importantes habilidades antibióticas em aplicações de biocontrole e efeitos benéficos às plantas, que contribuem para a aptidão do hospedeiro aumentando o crescimento e juntos com o holobionte (hospedeiro e simbiontes microbianos) atuam nos processos evolutivos que estão envolvidos (Partida-Martínez, 2017), induzindo respostas de defesa em plantas a estresses abióticos e patógenos (Contreras-Cornejo et al. 2016).

CONCLUSÕES

- As cepas de *Trichoderma* spp testadas neste trabalho apresentam capacidade de colonizar substratos variados sob condições ambientais muito diversas;
- Elas apresentaram uma diversidade de resposta que podem estar relacionadas aos ambientes de coletas;
- Estas cepas de *Trichoderma* são capazes de produzir várias enzimas hidrolíticas, de hiperparasitar fungos fitopatogênicos e reduzir a integridade dos escleródios de *S. sclerotiorum*;
- Elas podem atuar no controle do mofo branco de modo indireto (antagonismo e hiperparasitismo do fungo fitopatogênico) e direto (proteção da planta e resistência à doença);
- Também são capazes de produzir metabólitos voláteis e não voláteis, com diversas atividades, compreendendo a capacidade de promover o crescimento de plantas, assim como a capacidade de inibir o crescimento de fitopatógenos;

- São cepas promissoras para a geração de novos produtos devido a sua fácil produção, permitindo aplicação de acordo com a cultura de interesse;
- A partir do exposto, fica evidente a riqueza de possibilidades para o uso de diferentes cepas de *Trichoderma* para diversos patossistemas, o que deverá contribuir para o uso racional dos defensivos agrícolas tradicionais;
- Três cepas de *Trichoderma* (T₅₇, T₅₅ e T₂₅) mostraram capacidade significativa de controle de *S. sclerotiorum* e de promoção de crescimento em plantas de feijão, sendo promissoras para testes de campo como biofungicidas e bioestimulantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfiky A & Weisskopf L. 2021. Deciphering Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. *J. Fungi*, 7, 61.

Alignier A, Solé-Senan XO, Robleño I. 2020. Configurational crop heterogeneity increases within-field plant diversity. *J. Appl. Ecol.* 57, 654-663.

Alho CJR & Silva JSV. 2012. Effects of Severe Floods and Droughts on Wildlife of the Pantanal Wetland (Brazil) - Review. *Animals* 2(4): 591- 610.

Andrade-Hoyos P, Silva-Rojas HV, Romero-Arenas O. 2020. Endophytic *Trichoderma* Species Isolated from *Persea americana* and *Cinnamomum verum* Roots Reduce Symptoms Caused by *Phytophthora cinnamomi* in avocado. *Plants*, 9(9), 1220.

Arieira J & Nunes da Cunha C. 2006. Fitossociologia de uma floresta inundável monodominante de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), no Pantanal Norte, MT, Brasil. *Acta Bot. Bras.* v. 20, n. 3, p. 569-580.

Arruda RCO, Victório CP, Boaretto AG, Carollo CA, Farias CS, Marchett, CR, Santos RJ, Giannesi GC, Brentan DS. 2019. Essential oil composition, antifungal activity and leaf anatomy of *Lippia alba* (Verbenaceae) from Brazilian Chaco. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 13(4), pp. 79-88.

Assine ML, Macedo HA, Stevaux JC, Bergier I, Padovani CR, Silva A. 2015. Avulsive Rivers in the Hydrology of the Pantanal Wetland. *Dynamics of the Pantanal Wetland in South America*, 83-110.

Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM. 2021. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 20, 200-216.

Azevedo JL, Maccheroni JrW, Pereira JO, de Araújo WL. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1), 15-16.

Batáry P, Báldi A, Ekroos J. 2020. *Biologia Futura*: landscape perspectives on farmland biodiversity conservation. *Biologia Futura* 71, 9-18.

Bauhinia unguolata in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). <https://www.sibbr.gov.br/>

Bailey BA, Bae H, Strem MD, Roberts DP, Thomas SE, Crozier J. 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, 224, 1449-1464.

Bailly A. & Weisskopf L. 2012. The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth. *Plant Signal Behav.* 7:79-85.

Barbosa GG, Costa FA, da Costa AN, Ulhoa JC. 2021. Evaluation of the potential of *Trichoderma* spp. native to the state of Mato Grosso do Sul against the fungus *Colletotrichum musae*. *Brazilian Journal of Development*, v.7, n.3, p. 29484-29502.

Barratt BIP, Moran VC, Bigler F. 2018. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. *Bio Control*, 63, 15–167.

Barroso GM. 1991. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: Imprensa Universitária.

Begum N, Qin C, Ahange, MA, Raza S, Khan MI, Ashraf M, Zhang L. 2019. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1068.

Belkaid Y & Hand TW. 2014. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*, 157(1), 121-141.

Bell DK, Wells HD, Markhan CR. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. *Phytopathology*, v.72, p.379-382.

Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7(4):249-260.

Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17: 478-486.

Bettiol W. 2011. Biopesticide use and research in Brazil. *Outlooks on Pest Management*, v. 22, n. 6, p. 280-284.

Bettiol W & Morandi MAB. 2009. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 187-208.

- Bharat R, Singh VN, Singh DB. 1980. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. Plant and Soil, Varanasi, v.57, p.131-135.
- Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany, 69(11), 2373-2417.
- Bissett J, Gams W, Jaklitsch W, Samuels GJ. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. IMA Fungus, 6(2), 263-295.
- Bonanomi G, Lorito M, Vinale F, Woo SL. 2018 Organic amendments, beneficial microbes, and soil microbiota: toward a unified framework for disease suppression. Annu Rev Phytopathol 56:1-20
- Bonfante P & Genre A. 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. Trends in Plant Science, 13(9), 492-498.
- Brader G, Compant S, Vescio K, Mitter B, Trognitz F, Ma LJ, Sessitsch A. 2017. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. Annual Review of Phytopathology, 55(1), 61-83.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brito JPC, Ramada MHS, Magalhães MTQ, Silva LP, Ulhoa JC. 2014. Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. Springer Plus, 3:600.
- Brotman Y, Gupta KJ, Viterbo A. 2010. *Trichoderma* Current Biology, v.20, p.R390-R391,
- Cai F & Druzhinina IS. 2021. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. Fungal Diversity 107, 1-69.
- Callens M, Watanabe H, Kato Y, Miura J, Decaestecker E. 2018. Microbiota inoculum composition affects holobiont assembly and host growth in *Daphnia*. Microbiome. 6(1):56.
- Carthey AJR, BlumsteinDT, Gallagher RV, Tetu SG, Gillings MR. 2020. Conserving the holobiont. Functional Ecology. 34:764-776
- Castillo FD, Padilla AM, Morales GG, Siller MC, Herrera R, Gonzales CN, Reyes FC. 2011. In vitro antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Science 6, 410-417.
- Challacombe JF, Hess, CN, Brame, LM . 2019. Genomes and secretomes of Ascomycota fungi reveal diverse functions in plant biomass decomposition and pathogenesis. BMC Genomics 20, 976.

- Chaud M, Souto EB, Zielinska A, Severino P, Batain F, Oliveira-Junior J, Alves T. 2021. Nanopesticides in Agriculture: Benefits and Challenge in Agricultural Productivity, Toxicological Risks to Human Health and Environment. *Toxics*, 9, 131.
- Chaverri P, Branco-Rocha F, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T, Samuels GJ. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107: 558-590.
- Chaverri P & Samuels GJ. 2013. Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution*, 67(10): 2823-2837.
- Chaverri P, Castlebury LA, Overton BE, Samuels GJ. 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: Species with Conidiophore Elongations and Green Conidia. *Mycologia*, 95(6), 1100.
- Chet I, Harman GE, Baker R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*, 7(1), 29-38.
- CNCFLORA 2015.
<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Peixotoa%20irwinii>
- CONAB 2021.
<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del-Val JL. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* V 92, 4, 36p.
- Daguerre Y., Edel-Hermann V., Steinberg C. 2016. Fungal genes and metabolites associated with the biocontrol of soil-borne plant pathogenic fungi. In: MÉRILLON, J.M., Ramawat, K. (Ed.). *Fungal Metabolites*. Cham: Springer International Publishing, 33-104.
- Dalmau LM. 1929. Observations on mycological technique with particular reference to pathogenic fungi. *Porto Rico Journal of Public and Health and Tropical Medicine*, 5:302-311.
- Damasceno-Junior GA, Semir J, Antonio Maës Dos Santos FF, Leitão-Filho H. 2005. Structure, distribution of species and inundation in a riparian forest of Rio Paraguai, Pantanal, Brazil *Funct. Ecol. Plants*. 200(2):119-135
- Dangl J & Holub E. 1997. La Dolce Vita: A Molecular Feast in Plant-Pathogen Interactions. *Cell*, 91(1), 17-24.
- Danielson RM & Davey CB. 1973. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 5(5), 485-494.
- Da Silva P O, de Alencar Guimarães NC, Serpa JDM, Masui DC, Marchetti CR, Verbisck NV, Giannesi GC. 2019. Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in

the fruit juice clarification and fruit peel waste hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21(129).

Davies CR, Wohlgemuth F, Young T, Violet J, Dickinson M, Sanders J-W, Vallieres C, Avery SV. 2021. Evolving challenges and strategies for fungal control in the food supply chain. *Fungal Biology Reviews*. V. 36, pp. 15-26.

De França SKS, Cardoso AF, Lustosa DC, Ramos EMLS, de Filippi MCC, da Silva GB. 2014. Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 317-324.

De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y, Hofte, M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 279-286.

De Vos A, Cumming GS, Cumming DHM, Ament JM, Baum J, Clements HS, Moore C. 2016. Pathogens, disease, and the social-ecological resilience of protected areas. *Ecology and Society*, 21(1).

De Vries, FT & Wallenstein, MD. 2017. Below-ground connections underlying above-ground food production: a framework for optimising ecological connections in the rhizosphere. *Journal of Ecology*, 105(4), 913-920.

Dennis L & Webster J. 1971. Antagonism properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 57, 363-369.

Drobek M, Frąc M, Cybulska J. 2019. Plant Biostimulants: Importance of the Quality and Yield of Horticultural Crops and the Improvement of Plant Tolerance to Abiotic Stress- A Review. *Agronomy*, 9(6), 335.

Druzhinina I S, Chenthamara K, Zhang J, Atanasova L, Yang D, Miao Y, Kubicek CP. 2018. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *Plos Genetics*, 14(4).

Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Natural Reviews. Microbiology*, v. 9, n. 10, p. 749-759.

Druzhinina I & Kubicek, CP. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B (2), 100-112.

Elad Y, Barak R, Chet I, Henis Y. 1983. Ultrastructural Studies of the Interaction Between *Trichoderma* spp. and Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Phytopathology*, 107(2), 168–175.

- Etesami H & Adl SM. 2020. Can interaction between silicon and non-rhizobial bacteria help in improving nodulation and nitrogen fixation in salinity-stressed legumes? A review. *Rhizosphere* 1, p 1-20.
- FAO. 2019. Perdas e desperdícios de alimentos na América Latina e no Caribe.
- FAO e INRAE. 2021. Facilitando sistemas alimentarios sostenibles: Manual para innovadores. Roma.
- Ferreira FV & Musumeci MA. 2021. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. *World J Microbiol Biotechnol.* 26,37(5):90.
- Fisher MC, Gurr SJ, Cuomo CA, Blehert DS, Jin H, Stukenbrock EH, Cowen LE. 2020. Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. *mBio*, 11(3).
- Flora do Brasil. 2020. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>
- Fontana DC, de Paula S, Torres AG, de Souza VHM, Pascholati SF, Schmidt D, Dourado Neto, D. 2021. Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. *Pathogens*, 10,570.
- Fontenelle ADB, Guzzo SD, Lucon CMM, Harakava R. 2011. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection*, 30(11), 1492-1500.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. 2011. The state of the world's land and water resources for food and agriculture: managing systems at risk. Rome.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. 2016. State of the World's Forests. Rome.
- Gajera HP & Vakharia DN. 2012. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 43-52
- Garcia RÁ, Juliatti FC, Cassemiro TA. 2012. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em meio de cultura. *Biosci. J. (Online)*. 28, 1-7.
- García-Núñez HG. 2012. Isolation of native strains of *Trichoderma* spp. from horticultural soils of the Valley of Toluca, for potential biocontrol of *Sclerotinia*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, v. 15, n. 2, p.357-365.
- Genre A, Lanfranco L, Perotto S. 2020. Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 649–660.

- Gerage JM, Meira APG, da Silva MV. 2017. Food and nutrition security: pesticide residues in food. *Nutrire*, 42, 3.
- Geraldine AM, Lopes FAC, Carvalho DDC, Barbosa ET, Rodrigues AR, Brandão RS, Ulhoa CJ, Junior ML. 2013. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control* 67: 308-316.
- Ghorbanpour M, Omidvari M, Abbaszadeh-Dahaji P, Omidvar R, Kariman K. 2018. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biol. Control* 117, 147-157.
- Gortari MC & Hours RA. 2008. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycol Progress* 7, 221-238.
- Gos FMWR, Savi DC, Shaaban KA, Thorson JS, Aluizio R, Possiede YM, Glienke C. 2017. Antibacterial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from the Medicinal Plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Frontiers in Microbiology*, 6,8:1642.
- Gouda S, Das G, Sen SK, Shi, H-S, Patra JK. 2016. Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Frontiers in Microbiology*, 7:1538.
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206, 131-140.
- Grabicoski EMG, Jaccoud Filho DS, Pileggi M, Henneberg L, Pierre MLC, Vrisman CM, Dabul ANG. 2014. Rapid PCR-based assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detection on soybean seeds. *Sci. Agric.* v.72, n.1, p.69-74.
- Groos, M. 2019. The success story of plants and fungi. *Current Biology*, v. 28 (6), R183 - R199.
- Gruber, S & Seidl-Seiboth, V. 2011. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, 158(1), 26-34.
- Guo, Y, Jud, W, Ghirardo, A, Anritter, F, Benz, JP, Schnitzler, J, Rosenkranz, M. 2020. Sniffing fungi – phenotyping of volatile chemical diversity in *Trichoderma* species. *New Phytologist*. 227(1):244-259.
- Guzmán-Guzmán, P, Porrás-Troncoso, MD, Olmedo-Monfil, V, Herrera-Estrella, A. 2018. *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*. 109(1):6-16.
- Haddad, PE, Leite, LG, Lucon, CMM & Harakava, R. 2017. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52(12), 1140-1148.
- Hardoim, PR, van Overbeek, LS, Berg, G, Pirttilä, AM, Compant, S, Campisano, A.... Sessitsch, A. 2015. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary

Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320.

Harman, GE. 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84(4), 377-393.

Harman, GE, Howell, CR, Viterbo, A, Chet, I, Lorito, M. 2004a. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev. Microbiol.* 2:43-56.

Harman, GE, Petzoldt, R, Comis, A, Chen, J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94:147-153.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(1):43-56.

Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 120:190-194.

Harman GE. 2011. *Trichoderma*-not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39(2), 103-108.

Harman GE & Uphoff N. 2019. Symbiotic Root-Endophytic Soil Microbes Improve Crop Productivity and Provide Environmental Benefits. *Scientifica*, 1-25.

Harman GE, Doni F, Khadka RB, Uphoff N. 2019. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *J Appl Microbiol.* 130(2), 529-546.

Hassan, MA, Durán P, Hacquard S. 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6(58): 2-17.

Hawksworth DL. 2014. Possible house-keeping and other draft proposals to clarify or enhance the naming of fungi within the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). *IMA Fungus* 5, 31-37.

Heffer, LV & Johnson, KB. 2007. White Mold. *The Plant Health Instructor*.

Hermosa MR, Keck E, Chamorro I, Rubio B, Sanz L, Vizcaíno JA, Monte E. 2004. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research*, 108(8), 897-906.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, New York, v. 158, p. 17-25.

Hermosa R, Rubio MB, Cardoza RE, Nicolás C, Monte E, Gutiérrez S. 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int. Microbiol.* 16, 69-80.

- Herrera-Téllez VI, Cruz-Olmedo AK, Plasencia J, Gavilanes-Ruíz M, Arce-Cervantes O, Hernández-León S, Saucedo-García M. 2019. The Protective Effect of *Trichoderma asperellum* on Tomato Plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* Diseases Involves Inhibition of Reactive Oxygen Species Production. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 2007.
- Hess SC & Monache FD. 1999. Divergioic Acid, a Triterpene from *Vochysia divergens*. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 10, n. 2, p. 104-106.
- Ho A, Lonardo DPD, Bodelier PLE. 2017. Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 93(3).
- Hoes JA & Huang HC. 1975. *Sclerotinia sclerotiorum*: viability and separation of sclerotia from soil. *Phytopathology* 65, 1431-1432.
- Honda NK, Cruz AB, Messana, I. 1995. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 47, p. 97-100.
- Horta MAC, Filho JAF, Murad NF. 2018. Network of proteins, enzymes and genes linked to biomass degradation shared by *Trichoderma* species. *Sci Rep* 8, 1341.
- Hosonuma N, Herold M, De Sy V, De Fries RS, Brockhaus M, Verchot L, Romijn E. 2012. An assessment of deforestation and forest degradation drivers in developing countries. *Environmental Research Letters*, 7(4), 044009.
- Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, 51(3), 409-416.
- Hyde, KD, Xu, J, Rapior, S. 2019. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97, 1-136.
- Ivory S, McGlue M, Spera S, Silva A, Bergier I. 2019. Vegetation, rainfall, and pulsing hydrology in the Pantanal, the world's largest tropical wetland. *Environmental Research Letters*. 14: 124017p.
- Jacoby R, Peukert M, Succurro A, Koprivova A, Kopriva S. 2017. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition - Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 8:1617p.
- Janda M, Matouskova J, Burketova L, Valentova O. 2014 Interconnection between actin cytoskeleton and plant defense signaling. *Plant Signal Behav* 9: (11).
- Javeria S, Kumar A, Kharkwal AC, Varma A, Srinivasa N Sharma P. 2020. Evaluation of rhizospheric *Trichoderma* species strains for producing cell wall degrading and defense related enzymes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis. *Indian Phytopathology*. 73,461-467.
- Jeffries P. (1995). Biology and ecology of mycoparasitism. *Can. J. Bot.* 73, 1284-1290.

- Junk WJ, Barley PB, Sparks RE. 1989. The Flood Pulse Concept in RiverFloodplain Systems. Proceedings of the International Large River Symposium. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. v. 106.
- Kalra R, Conlan XA, Goel M. 2020. Fungi as a potential source of pigments: Harnessing filamentous fungi. *Front. Chem.* 8,369.
- Kandel R, Chen CY, Grau CR, Dorrance AE, Liu JQ, Wang Y, Wang D. 2018. Soybean Resistance to White Mold: Evaluation of Soybean Germplasm Under Different Conditions and Validation of QTL. *Frontiers in Plant Science*, 9:505.
- Karlsson M, Atanasova L, Jensen DF, Zeilinger S. 2017. Necrotrophic mycoparasites and their genomes. *Microbiol. Spectrum* 5(2).
- Karuppiyah V, Sun J, Li T, Vallikkannu M, Chen J. 2019. Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 Causes Differential Gene Expression and Improvement in the Wheat Growth and Biocontrol Activity. *Frontiers in Microbiology*, 10:1068.
- Kaul S, Gupta S, Sharma S, Dhar MK. 2017. The Fungal Endobiome of Medicinal Plants: A Prospective Source of Bioactive Metabolites. In: Agrawal D, Tsay HS, Shyur LF, Wu YC, Wang SY (eds.) *Medicinal Plants and Fungi: Recent Advances in Research and Development. Medicinal and Aromatic Plants of the World*, Springer. vol 4: 167-252.
- Kembel SW & Mueller RC. 2014. Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities 1. *Botany*. 92(4):303-311.
- Keswani C, Singh HB, Hermosa R, García-Estrada C, Caradus J, He, Y, Mezaache-Aichour S, Glare TR, Borriss R, Vinale F, Sansinenea E. 2019. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 9287-9303.
- Khaledi N, Taheri P. 2016. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of plant protection research*, v. 56, n. 1, p. 21-31.
- Khalid AS. 2017. *Trichoderma* as biological control weapon against soil borne plant pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 16(50), 2299-2306.
- Khan AL, Shahzad R, Al-Harrasi A, Lee IJ. 2017. Endophytic Microbes: A Resource for Producing Extracellular Enzymes. In: Maheshwari D. & Annapurna K. (eds) *Endophytes: Crop Productivity and Protection. Sustainable Development and Biodiversity*, vol 16: 95-110. Springer, Cham.
- Khare, E Mishra S, Arora NK. 2018. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2732.

Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. 2019. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10: 845.

Kohn LM. 1979. A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon* 1979 Vol.9 No.2 pp.365-444.

Kong Q. 2017. Marine microorganisms as biocontrol agents against fungal phytopathogens and mycotoxins. *Biocontrol Science and Technology*, 28(1), 77-93.

Kredics L, Chen L, Kedves O, Büchner R, Hatvani L, Allaga H, Vágvölgyi C. 2018. Molecular Tools for Monitoring *Trichoderma* in Agricultural Environments. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1599.

Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CK, Lorito M. 2001. *Trichoderma*: From Genes To Biocontrol. *Journal of Plant Pathology*. v. 83, 11-23.

Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol* 12(4): R40.

Kumar S, Nehra M, Dilbaghi N, Marrazza G, Hassan A A, Ki, KH. 2018. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*. v. 294, 131-153.

Kurokawa M, Nakano M, Kitahata N. (2021). An efficient direct screening system for microorganisms that activate plant immune responses based on plant-microbe interactions using cultured plant cells. *Sci Rep* 11, 7396.

Laurance W, Clements G, Sloan S. 2014. A global strategy for road building. *Nature* 513, 229-232.

Lee S, Yap M, Behringer G, Hung R, Bennett JW. 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3(1):7.

Lloyd EA, Wade MJ. 2019. Criteria for holobionts from community genetics. *Biol. Theory*, 14, 151-170.

Lobo Junior M, Geraldine AM, Carvalho DDC, Cobucci T. 2009. Uso de cultivares de feijão comum com arquitetura ereta e ciclo precoce para escape do mofo branco. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 4p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico, 182.

Lobo Junior M, Machado-Rosa TA, Geraldine AM. 2019. Uso de *Trichoderma* na cultura de feijão comum. 17, 393- 406. In: Meyer, MC. 2019. *Trichoderma*: uso na agricultura. editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa. 538 p.

Lombardi N, Vitale S, Turrà D, Reverberi M, Fanelli C, Vinale F, Lorito M. 2018. Root exudates of stressed plants stimulate and attract *Trichoderma* soil fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 982-994.

Lopes FAC, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandão RS, Monteiro VN, Lobo Junior M, Coelho ASG, Ulhoa CJ, Silva RN. 2012. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, v.116, 815-824.

Lopes FC, Tichota DM, Pereira JQ, Segalin J, De Oliveira Rios A, Brandelli A. 2013. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 616-625.

Lopes MJS, Dias-Filho MB, Gurgel ESC. 2021. Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Front. Sustain. Food Syst.* vol.5. 1-13.

López-Mondéjar R, Ros M & Pascual JA. 2011. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*, 56(1), 59-66.

Lorito, M, Peterbauer, C, Hayes, CK & Harman, GE. 1994. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140(3), 623-629.

Lorito M, Woo SL, Harman GE & Monte E. 2010. Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 395-417.

Lutzoni F, Nowak MD, Alfaro, ME. 2018. Contemporaneous radiations of fungi and plants linked to symbiosis. *Nat. Commun.* 9, 5451.

Lyu D, Zajonc J, Pagé A, Tanney CAS, Shah A, Monjezi N, Msimbira LA, Antar M, Nazari M, Backer R, Smith DL. 2021. Plant Holobiont Theory: The Phytomicrobiome Plays a Central Role in Evolution and Success. *Microorganisms*, 9-675.

Machado DFM, Tavares AP, Lopes SJ, Silva ACF. 2015. *Trichoderma* spp. na emergência e crescimento de mudas de cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). *Revista Árvore* 39, 167-176.

Marra R, Lombardi N, d'Errico G, Troisi J, Scala G, Vinale F, Lorito M. 2019. Application of *Trichoderma* Strains and Metabolites Enhances Soybean Productivity and Nutrient Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 1814-1822.

Marra R, Coppola M, Pironti A, Grasso F, Lombardi N, d'Errico G, Sicari A, Censi SB, Woo SL, Rao R. 2020. The Application of *Trichoderma* Strains or Metabolites Alters the Olive Leaf Metabolome and the Expression of Defense-Related Genes. *J. Fungi*, 6, 369.

- Marraschi R, Ferreira ABM, da Silva Bueno RN. 2019. A protocol for selection of *Trichoderma* spp. to protect grapevine pruning wounds against *Lasiodiplodia theobromae*. Braz. J. Microbiol. 50, 213-221.
- Martel G, Aviron S, A. Joannon A, Lalechère E, Roche B, Boussard H. 2017. Impact of farming systems on agricultural landscapes and biodiversity: From plot to farm and landscape scales. Eur. J. Agron. 107, 53-62.
- Martin EA. 2019. The interplay of landscape composition and configuration: new pathways to manage functional biodiversity and agroecosystem services across Europe. Ecol. Lett. 22, 1083-1094.
- Martins-Corder MP & Melo IS de. 1998. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. Scientia Agricola, 55(1), 1-7.
- Martinez J, Dabert P, Barrington S, Burton C. 2009. Livestock waste treatment systems for environmental quality, food safety, and sustainability. Bioresource Technology, 100(22), 5527-5536.
- Mastouri F, Björkman T, Harman GE. 2010. Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* Alleviates Biotic, Abiotic, and Physiological Stresses in Germinating Seeds and Seedlings. Phytopathology, 100(11), 1213-1221.
- May TW, Redhead SA, Bensch K. 2019. Chapter F of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants as approved by the 11th International Mycological Congress, San Juan, Puerto Rico, July 2018. IMA Fungus 10, 21.
- Mccalley D & Torres-Grifol JF. 1992. Analysis of volatiles in good and bad conditions by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. Analyst. Washington, v. 117, 721-725.
- Meena RK & Mishra P. 2020. Bio-pesticides for Agriculture and Environment Sustainability. In: Kumar S., Meena R.S., Jhariya M.K. (eds) Resources Use Efficiency in Agriculture. 85-107. Springer, Singapore.
- Meena V S, Meena SK, Verma JP, Kumar A, Aeron A, Mishra PK, Dotaniya ML. 2017. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. Ecological Engineering, 107, 8-32.
- Mendoza JLH, Pérez MIS, Prieto, JMG, Velásquez, JDCQ, Olivares, JGG, Langarica, HRG. 2015. Antibiosis of *Trichoderma* spp. strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. Brazilian Journal of Microbiology 46, 4, 1093-1101.
- Menezes BS, Solidade LS, Conceição AA. 2020. Pigment production by *Fusarium solani* BRM054066 and determination of antioxidant and anti-inflammatory properties. AMB Expr ,10(1):117.

- Meyer MC. 2019. *Trichoderma*: uso na agricultura. editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa. 538 p.
- Miorini TJJ, Raetano CG, Negrisoni MM. 2021. Determination of the protection period of fungicides used for control of *Sclerotinia* stem rot in soybean through bioassay and chromatography. *Eur J Plant Pathol* 159, 877-889.
- Montaño López, J, Duran, L & Avalos, JL. 2021. Physiological limitations and opportunities in microbial metabolic engineering. *Nat.Rev Microbiol.*1-14.
- Monte E, Bettioli W, Hermosa R. 2019. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In *Trichoderma – Uso na Agricultura*, Meyer, MC, Mazaro, SM, Silva, JC, Eds., Embrapa: Brasília, Brazil - 538p.
- Monteiro VN, do Nascimento Silva R, Steindorff AS, Ulhoa CJ. 2010. New Insights in *Trichoderma harzianum* -Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. *Curr Microbiol* 61, 298-305.
- Monteiro VN, Steindorff AS, Almeida FBR, Lopes FAC, Ulhoa CJ, Félix CR, Silva RN. 2015. *Trichoderma reesei* - Mycoparasitism against *Pythium ultimum* is coordinated by G-alpha Protein GNA1 Signaling. *Journal Microb Biochemistry Technology* 7:15.
- Morales-Oyervides L, Ruiz-Sánchez JP, Oliveira JC, Sousa-Gallagher MJ, Méndez-Zavala A, Giuffrida D, Montañez J. 2020. Biotechnological approaches for the production of natural colorants by *Talaromyces/Penicillium*: A review. *Biotechnology Advances*, 1,43:107601.
- Morandi MAB, Bettioli W. 2009. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: Bettioli W & Morandi M.A.B. (Eds.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, p.7-14.
- Morath SU, Hung R, Bennett JW. 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), 73-83.
- Morelli M, Bahar O, Papadopoulou, KK, Hopkins, DL & Obradović, A. 2020. Editorial: Role of Endophytes in Plant Health and Defense Against Pathogens. *Frontiers in plant science*, 11, 1312.
- Mukhopadhyay R & Kumar D. 2020. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egypt J Biol Pest Control* 30, 133.
- Naher L, Yusuf UK, Ismail A, Hossain K. 2014. *Trichoderma* spp.: A Biocontrol Agent for Sustainable Management of Plant Diseases. *Pak. J. Bot.* 46(4): 1489-1493.
- Nair DN & Padmavathy S. 2014. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-11.

- Napoleão R, Café-Filho AC, Nasser LCB, Lopes CA, Silva HR. 2005. Intensidade do mofo-branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. *Fitopatol. Bras.* 30: 374-379.
- Naranjo-Ortiz MA & Gabaldón T. 2019. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. *Biological Reviews*. V. 94:(4), pp 1443-1476.
- Nedjimi B. 2021. Phytoremediation: a sustainable environmental technology for heavy metals decontamination. *SN Appl. Sci.* 3, 286.
- Nelson EB. 2018. The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant Soil* 422, 7-34.
- Nelson R. 2020. International plant pathology: past and future contributions to global food security. *Phytopathology*.110:245-253.
- Noriler SA, Savi DC, Aluizio R, Palácio-Cortes AM, Possiede Y M, Glienke C. 2018. Bioprospecting and Structure of Fungal Endophyte Communities Found in the Brazilian Biomes, Pantanal, and Cerrado. *Frontiers in microbiology*, 9, 1526.
- Noronh, EF & Ulhoa CJ. 2000. Characterization of a 29-KDa β -1,3 glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Lett* 183:119-123.
- Ökmen B & Doehlemann G. 2014. Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 19-25.
- Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11).
- Olowe OM, Olawuyi OJ, Sobowale AA, Odebode AC. 2018. Role of arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* causing ear rot of *Zea mays* L. (Maize). *Current Plant Biology*, 15, 30- 37.
- Omacini M, Chaneton E, Ghera C. 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* 409, 78–81.
- Ons L, Bylemans D, Thevissen K, Cammue BPA. 2020. Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. *Microorganisms*, 8(12), 1930.
- Oszako T, Voitka D, Stocki M. 2021. *Trichoderma asperellum* efficiently protects *Quercus robur* leaves against *Erysiphe alphitoides*. *Eur J Plant Pathol* 159, 295-308.
- Pal KK & Gardener BMC-S. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. p1-25.
- Pang Z, Chen J, Wang T, Gao C, Li Z, Guo L, Xu J, Cheng Y. 2021. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 1-22.

- Parnell JJ, Berka R, Young HA, Sturino JM, Kang Y, Barnhart DM, DiLeo MV. 2016. From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 7:1110.
- Parpinelli B, Siqueira K, Kellner Filho L, Pimenta L, da Costa R, Parreira R, Januario A. 2017. Effect of Endophytic Fungal Associations on the Chemical Profile of in vitro *Vochysia divergens* Seedlings. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol. 28, No. 12, 2375-2381.
- Parratt SR & Laine AL. 2016. The role of hyperparasitism in microbial pathogen ecology and evolution. *The ISME journal*, 10(8), 1815-1822.
- Partida-Martínez LP. 2017. The fungal holobiont: Evidence from early diverging fungi. *Environmental Microbiology*, 19(8), 2919-2923.
- Paterniani E. 2001. Agricultura sustentável nos trópicos. *Estudos Avançados*, n. 15, v. 43, p. 303-326.
- Paula CS, Cantelli VCD, Hirota BCK, Campos R, Oliveira V B, Kalegari M, Silva CB, Silva GM, Miguel OG, Miguel MD. 2014. Potencial antioxidante in vitro das folhas da *Bauhinia unguolata* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, p. 217-222.
- Peberdy JF. 1990. Fungal Cell Walls — A Review. In: Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ Goosey MW. Copping L.G. (eds) *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*. Springer, Berlin, Heidelberg. 5-30, 327p.
- Pedro EAS, Harakava R, Lucon CMM, Guzzo SD. 2012. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. *Pesq. agropec. bras.* Brasília, v.47, n.11, p.1589-1595.
- Peršoh D. 2015. Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics. *Fungal Diversity*, 75(1), 1-25.
- Peter MG. 2002. Chitin and chitosan in fungi. In: Steinbüchel A (ed) *Biopolymers*. Vol 6: Polysaccharides II. Wiley, Weinheim, pp 123-157.
- Petrini O. 1991. Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (eds) *Microbial Ecology of Leaves*. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY. 179-197, 501p.
- Phoka N, Suwannarach N, Lumyong S, Ito S, Matsui K, Arikkit S, Sunpapao A. 2020. Role of Volatiles from the Endophytic Fungus *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 in Biocontrol Potential and in Promoting the Plant Growth of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Fungi*, 6(4), 341.
- Pietro-Souza W, Mello I S, Vendruscullo S J, Silva G F, Cunha CN da, White JF, Soares MA. 2017. Endophytic fungal communities of *Polygonum acuminatum* and

Aeschynomene fluminensis are influenced by soil mercury contamination. Plos One, 12(7), 1-24.

Pomella AWV & Ribeiro RTS. 2009. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas - uma visão empresarial. In: Bettiol W & Morand, MAB. Ed(s). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente 1:239-244.

Poorter H, Niklas KJ, Reich PB, Oleksyn J, Poot P, Mommer L. 2012. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. New Phytol. 193, 30-50.

Popinigs F. 1985. Fisiologia de Sementes, 2nd ed., AGIPLAN: Brasília, Brazil.

Pott A. 2011. Plant diversity of the Pantanal wetland. Brazilian Journal of Biology. São Carlos. vol. 71, nº. 1, supl. 1.

Puri A, Padda KP, Chanway CP. 2016. Seedling growth promotion and nitrogen fixation by a bacterial endophyte *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R and its GFP derivative in corn in a long-term trial. Symbiosis, 69(2), 123-129.

Qualhato TF, Lopes FAC, Steindorff AS, Brandão RS, Jesuino RSA, Ulhoa CJ. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: valuation of antagonism and hydrolytic enzyme production. Biotechnol Lett 35:1461-1468.

Rahman S, Rahman L, Khalil AT. 2019. Endophyte-mediated synthesis of silver nanoparticles and their biological applications. Appl Microbiol Biotechnol 103, 2551-2569.

Rajesh RW, Rahul MS, Ambalal NS. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. African Journal of Agricultural Research, 11(22), 1952-11205.

Ramada MHS, Steindorff AS, Bloch C, Ulhoa CJ. 2016. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. Proteomics, 16(3), 477-490.

Rao, KLN, Raju KS, Ravisankar H. (2016). Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. Brazilian Journal of Microbiology, Volume 47, Issue 1, 25-32.

Ribeiro IDA, Bach E, Da Silva FM, Muller AR, Rangel CP, Wilhelm CM, Barth AL, Passaglia LMP. 2021. Antifungal potential against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and plant growth promoting abilities of *Bacillus* isolates from canola (*Brassica napus* L.) roots. Microbiological Research v. 248, p. 126754.

Ricketts TH. 2001. The Matrix Matters: Effective Isolation in Fragmented Landscapes. Am. Nat. 158, 87.

- Riddell RW. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia* 42:265-270.
- Rifai MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*, *Mycol. Papers*. 116: 1-56.
- Rivera-Méndez W, Obregón M, Morán-Diez ME, Hermosa R, Monte E. 2019. *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions. *Biological Control*, v. 141, 104145.
- Roblin G, Luini E, Fleurat-Lessard P, Larignon P, Berjeaud J-M. 2019. Towards a preventive and/or curative treatment of esca in grapevine trunk disease: General basis in the elaboration of treatments to control plant pathogen attacks. *Crop Protection*, 116, 156-169.
- Rocha JRASC, Pimentel AJB, Ribeiro G, Souza MA. 2014 Eficiência de fungicidas no controle da brusone em trigo. *Summa Phytopathol* 40: 347–352
- Rodrigues FÁ, Rios JA, Debona D. 2017. *Pyricularia oryzae*-wheat interaction: physiological changes and disease management using mineral nutrition and fungicides. *Trop. Plant Pathol.* 42, 223-229.
- Rosenberg E & Zilber-Rosenberg I. 2011. Symbiosis and development: The hologenome concept. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(1), 56-66.
- Roughgarden J, Gilbert, SF, Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I, Lloyd EA. 2017. Holobionts as Units of Selection and a Model of Their Population Dynamics and Evolution. *Biological Theory*, v.13(1), 44-65.
- Rubio MB, Hermosa R, Vicente R, Gómez-Acosta FA, Morcuende R, Monte E Bettiol W. 2017. The Combination of *Trichoderma harzianum* and Chemical Fertilization Leads to the Deregulation of Phytohormone Networking, Preventing the Adaptive Responses of Tomato Plants to Salt Stress. *Frontiers in Plant Science*, 8: 294.
- Russell J R, Huang J, Pria Anand KK, Sandoval AG, Dantzler KW, Hickman DS, Jee, J, Kimovec FM, Koppstein D, Marks DH, Mittermiller PA, Nune, SJ, Santiago M, Townes MA, Vishnevetsky M, Williams NE, Nunez Vargas MP, Boulanger L A, Slack CB, Strobel AS. 2011. Biodegradation of Polyester Polyurethane by Endophytic Fungi. *Appl Environ Microbiol* 77(17): 6076-6084.
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res.* 23, 3984-3999
- Salwan R, Rialch N, Sharma V. 2019. Bioactive Volatile Metabolites of *Trichoderma*: An overview. In: Singh H, Keswani C, Reddy M, Sansinenea E, García-Estrada C. (eds) *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*. Springer, Singapore. 8(6):817.

Samuels GJ & Hebbard PK. 2015. *Trichoderma*: Identification and Agricultural Applications . American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, USA. Plant Disease. 196 pp.

Santos AFD & Dhingra OD. 1982. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Botany, 60(4), 472-475.

Santos JS, Dodonov P, Martello F, Jesus AS, Ferreira ME, Silva-Neto CM, Ribeiro RG. 2021. Landscape ecology in the Anthropocene: an overview for integrating agroecosystems and biodiversity conservation. Perspectives in Ecology and Conservation. v 19, 21-32.

Santos KM, Gonçalves PS, Paiva MJ, Lacerda GA. 2011. Acetylcholinesterase inhibition starting from extracts of *Bauhinia variegata* L. *Bauhinia* var. *candida* (Aiton) Buch.-Ham. and *Bauhinia unguolata* L. Rev. Soc. Bras. Med Trop.,44(6):781-3.

Santoyo G, Guzmán-Guzmán P, Parra-Cota FI, Santos-Villalobos SdL, Orozco-Mosqueda MdC, Glick BR (2021). Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. Agronomy, 11,219.

Saravanakumar S, Yu, C, Dou K, Wang M, Li Y, Chen J. 2016. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*. Biological Control. V 94, 37- 46.

Savi DC, Shaaban KA, Gos FMWR. 2018. *Phaeophleospora vochysiae* Savi & Glienke sp. nov. Isolated from *Vochysia divergens* Found in the Pantanal, Brazil, Produces Bioactive Secondary Metabolites. Sci Rep 8, 3122.

Sawant IS. (2014). *Trichoderma* - Foliar Pathogen Interactions. The Open Mycology Journal, 8, (Suppl-1, M3) 58-70

Saxena A, Mishra S, Ray S, Raghuwanshi R, Singh HB. 2020. Differential Reprogramming of Defense Network in *Capsicum annum* L. Plants Against *Colletotrichum truncatum* Infection by Phyllospheric and Rhizospheric *Trichoderma* Strains. J. Plant Growth Regul, 39, 751-763.

Schickler H, Haran S, Oppenheim A, Chet I. 1998. Induction of the *Trichoderma harzianum* chitinolytic system is triggered by the chitin monomer, N-acetylglucosamine. Mycol Res 102:1224-1226.

Schulz B & Boyle C. 2005. The endophytic continuum. Mycological Research, 109(6), 661-686.

Segata N. 2018. On the Road to Strain-Resolved Comparative Metagenomics. Systems, 3(2).

Seidl V, Song L, Lindquist E, Gruber S, Koptchinskiy A, Zeilinger S, Schmoll M, Martínez P, Sun J, Grigoriev I, Herrera-Estrella A, Baker SE, Kubicek CP. 2009b. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics*. 10: 567.

Selosse M-A, Strullu-Derrien C, Martin, FM, Kamoun, S, Kenrick P. 2015. Plants, fungi and oomycetes: a 400-million years affair that shapes the biosphere. *New Phytologist*, 206(2), 501-506.

Shang Y, Hasan MK, Ahammed GJ, Li M, Yin H, Zhou J. 2019. Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review. *Molecules*, 24(14), 2558.

Sharma S & Gupta N. 2020. Defense signaling in plants against micro-creatures: do or die. *Indian Phytopathology* 73, 605-613

Sharma P & Kumar S. 2021. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: Recent advances, *Bioresource Technology*, Volume 339:125589.

Sharp R. 2013. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy*, 3(4), 757-793.

Shoresh M & Harman GE. 2008. The relationship between increased growth and resistance induced in plants by root colonizing microbes. *Plant Signal. Behav.* 3, 737-739.

Siao Ye S, Liu Z, Siemann E. 2020. An agent-based model of adaptation of holobionts with different microbial symbiont transmission modes. *bioRxiv*.10.08.330902

Silva JSV da, Abdon MM, Booc, A, Silva MP. 1998. Fitofisionomias dominantes em parte das sub-regiões do Nabileque e Miranda, sul do Pantanal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 33, p. 1713-1719. Número Especial.

Silva LR. 2019. Efeitos de compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 17 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 346.

Silva FF, Castro EM, Moreira SI, Ferreira TC, Lima AE, Alves E. 2017. Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. *Summa Phytopathol.* 43, 41-45.

Silva RN, Monteiro VN, Steindorf AS, Gome, EV, Noronha EF, Ulhoa CJ. 2019. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biology*. 123, 565-583.

- Simon JC, Marchesi JR, Mougel C. 2019. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* 7, 5.
- Smith ME, Henkel TW, Rollins JA. 2015. How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecology*, 13, 211-220.
- Smolińska U & Kowalska B. 2018. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* - a review. *J. Plant Pathol* 100, 1-12.
- Soares D, Rosa LH, da Silva J, Pimenta R. 2018. A Uma revisão de compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos associados a plantas medicinais. *Boletim Do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais*, 12(3), 331-352.
- Sood M, Kapoor D, Kumar V, Sheteiwiy M., Ramakrishnan M, Landi M, Sharma A. (2020). *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants*, 9(6), 762.
- Stegen JC, Bottos EM, Jansson JK. 2018. A unified conceptual framework for prediction and control of microbiomes. *Current Opinion in Microbiology*, 44, 20-27.
- Steindorff AS, Ramada MHS, Coelho ASG. 2014. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics* 15, 204.
- Stoppacher N, Kluger B, Zeilinger S, Krska R, Schuhmache, R. 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 187-193.
- Strobel G & Daisy B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491-502.
- Suárez J & Triviño V. 2020. What Is a Hologenomic Adaptation? Emergent Individuality and Inter-Identity in Multispecies Systems. *Frontiers in Psychology*, 11.
- Sudha V, Govindaraj R, Baskar K, Al-Dhabi NA, Duraipandiyan V. 2016. Biological properties of Endophytic Fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.
- Suriani Ribeiro, M, de Paula, R, Raquel Voltan, A, de Castro, RG, Carraro, CB, de Assis, Stecca Steindor, A, Goldman, GH, Silva, RN, Ulhoa, CJ. 2019. Endo β 1, 3 -glucanase (GH16 Family) from *Trichoderma harzianum* Participates in Cell Wall Biogenesis but Is Not Essential for Antagonism Against Plant Pathogens. *Biomolecules*, 9, 781.
- Tavares PD, Camardelli M, Uzêda ASP. 2019. Conservation of Nature. *Floresta Ambient.* 26(4).
- Tomas WM, de Oliveira Roque F, Morato RG, Medici PE, Chiaravalloti RM, Tortato FR, Lourival RFF. 2019. Sustainability Agenda for the Pantanal Wetland: Perspectives on a Collaborative Interface for Science, Policy, and Decision-Making. *Tropical Conservation Science* 12(2).

- Trivedi P, Mattupalli C, Eversole K, Leach JE. 2021. Enabling sustainable agriculture through understanding and enhancement of microbiomes. *New Phytologist*, 230:2129-2147.
- Troian RF, Steindorff AS, Ramada MHS. 2014. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnol Lett* 36, 2095-2101.
- Tseng YH, Rouina H, Groten K, Rajani,P, Furch A, Reichelt M, Baldwin IT, Nataraja KN, Uma Shaanker R, Oelmüller R. 2020. An Endophytic *Trichoderma* Strain Promotes Growth of Its Hosts and Defends Against Pathogen Attack. *Frontiers in plant science*, 11, 1-16.
- Ulhoa CJ & Peberdy JF. 1993. Effect of carbon sources on chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research*, 97(1), 45-48.
- Van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423.
- Van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A. 2017. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 63(1), 39-59.
- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. 2008. *Trichoderma*-plant pathogens interactions. *Soil Biol Biochem*. 40:1-10.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti SL, Woo M, Nigro R, Marra N, Lombardi A, Pascale M, Cuocco S, Lanzuise G, Manganiello M, Lorito M. 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 8 pp. 127-139.
- Vinale F & Sivasithamparam K. 2020. Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. *Phytotherapy Research*. 34: (11), 2836-2842.
- Vishwakarma K, Kumar N, Shandilya C, Mohapatra S, Bhayana S, Varma A. 2020. Revisiting Plant–Microbe Interactions and Microbial Consortia Application for Enhancing Sustainable Agriculture: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 11: 560406.
- Viterbo A, Landau U, Kim S, Chernin L, Chet I. 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiology Letters*, 305(1), 42-48.

- Viteri DM, Otto K, Terán H. 2015. Use of four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different aggressiveness, three inoculations per plant, and delayed multiple evaluations to select common beans with high levels of white mold resistance. *Euphytica* 204, 457-472.
- Voge MA, Mason OU, Miller TE. 2020. Host and environmental determinants of microbial community structure in the marine phyllosphere. *Plos One*, 15(7), e0235441.
- Waghunde RR, Shelake RM, Sabalpara NA. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, 11(22), 1952-11205.
- Walters D & Heil M. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1-3), 3-17.
- Webster J. 1964. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* I. Comparison of perfect and imperfect states of *H. gelatinosa*, *H. rufa* and *Hypocrea* sp. 1. *Transactions of the British Mycological Society*, 47(1), 75-96, IN3.
- Weirich CE, Castro A, Roque FO, Marchetti CR, Marques MR. 2021. Endophytic Fungal communities in the *Aspilia grazielae*: a rare endemic plant species from the Brazilian Pantanal wetland used to recover degraded areas. *Plos One*. No prelo.
- Willetts HJ. 1972. The Morphogenesis and Possible Evolutionary Origins a Fungal Sclerotia. *Biological Reviews*, 47(4), 515-536.
- Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M. 2006. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp. Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*, 120(2), 181-185.
- Woo SL & Pepe O. 2018. Microbial consortia: promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* 9:1801.
- Yedidia I, Benhamou N, Chet I. 1999. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1061-1070.
- Zeilinger S, Gupta VK, Dahms TES, Silva RN, Singh HB, Upadhyay RS, Nayak SC (2015). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 182–207.
- Zhang F, Yang X, Ran W, Shen Q. 2014. *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum*T-E5. *FEMS Microbiology Letters*, 359(1), 116-123.
- Zheng YK, Qiao XG, Miao CP. 2016. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol* 66, 529-542.

Zilber-Rosenberg I & Rosenberg E. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 723-735.

Zin NA & Badaluddin NA. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178.