

INAIA RHAVENE FREIRE FAGUNDES

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. ANTAGONISTAS A  
*Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

F156s  
2015 Fagundes, Inaia Rhavene Freire, 1989-  
Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a  
*Sclerotinia sclerotiorum* / Inaia Rhavene Freire Fagundes. –  
Viçosa, MG, 2015.  
x, 27f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 25-27.

1. *Trichoderma*. 2. *Sclerotinia sclerotiorum*. 3. Mofo  
branco - Controle biológico. 4. Antagonistas fúngicos.  
5. Manejo integrado. 6. Feijão - Doenças e pragas. 7. Soja -  
Doenças e pragas . I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em  
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.96

INAIA RHAVENE FREIRE FAGUNDES

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. ANTAGONISTAS A  
*Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de julho de 2015.

---

Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

---

José Eustáquio de Souza Carneiro

---

Gilcianny Pignata Cavalcante  
(Coorientadora)

---

Luiz Antonio Maffia  
(Orientador)

**À Deus,**

**por iluminar meus caminhos em todos os momentos.**

**À minha mãe Iromá,**

**pelo amor incondicional, carinho e confiança depositados para que mais um  
desafio fosse vencido,**

**Dedico**

Jesus, Tu és o Santíssimo Sacramento de minha alma, mesmo nos dias de provação, de sofrimento e de lágrimas. Perto de Tí Jesus, tudo é bom!

**Pe. Roberto Lettiere**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar com sua presença constante em minha vida.

À minha família, pelo carinho e incentivo. Em especial a minha mãe, maior incentivadora e apoiadora dos meus estudos. Meu pai que, desde a minha infância, em suas atividades a campo, despertou em mim preceitos de trabalho, coragem e interesse pela agricultura. E aos meus irmãos Inael, Ítalo, Luiz, Miguel e Maria Fernanda, pelo companheirismo, apoio e torcida.

Ao meu noivo Luciano Nacarath por andar de mãos dadas comigo, confiando, incentivando e participando de cada conquista.

À Universidade Federal de Viçosa, onde, com orgulho e imensa gratidão, concluo o meu mestrado.

Ao Departamento de Fitopatologia por todo apoio ao desenvolvimento da minha dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Luiz Antonio Maffia pela confiança, incentivo, paciência e pelos incontáveis momentos de compreensão e ensinamentos.

À minha co-orientadora Gilcianny Pignata Cavalcante pelo exemplo, conselhos, dedicação, amizade e contribuições para condução deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Epidemiologia e Controle Biológico: Renata, Álefe, Vinícius, Borel, Ozias, Larissa, Pablo, Ana Lúcia e Sandro, pela ótima convivência e contribuições na execução deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos, amizade e pela sabedoria que não encontramos nos livros. Em especial o professor José Rogério pelo exemplo. E aos funcionários pela ajuda dispensada nos momentos necessários.

Ao meu primeiro orientador, professor Edson Mizobutsi pela amizade, conselhos e pelos inesquecíveis ensinamentos de fitopatologia durante a iniciação científica.

Ao professor Eduardo Mizubuti e colegas do laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos, pelos conselhos e contribuições na realização deste trabalho.

Ao doutorando Paulo Mafra pelos ensinamentos e contribuições nas análises estatísticas.

Ao doutorando Alexandre pelas valiosas contribuições nas análises moleculares.

Às amigas Danielle, Maria Izabel, Sabrina e Vanessa pelo companheirismo, palavras de incentivo e pela amizade fundamental. Vocês são pessoas maravilhosas e muito especiais para minha vida!

À Iana Mara pela amizade, convivência e paciência durante os dois anos que moramos juntas.

Aos companheiros de disciplina, em especial: Daniela, Angélica, Sirlaine, César, Igor, Lílian, Álefe, Aline e Franklin pelos momentos de alegrias, preocupações e renúncias.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para que eu realizasse este sonho, obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Inaia Rhavene Freire Fagundes, filha de Nelson Freire de Alkimin e Maria Iromá Fagundes, nasceu em 21 de setembro de 1989, em Montes Claros, Estado de Minas Gerais.

Em 2008, ingressou no curso de agronomia da Universidade Estadual de Montes Claros (MG), onde graduou-se em julho de 2013.

Em agosto deste mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (MG).

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Mofo branco.....	3
2.2. Biocontrole do mofo branco .....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	7
3.1. Isolamento e preservação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	7
3.1.1. Amostragem.....	7
3.1.2. Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. dos restos culturais e da rizosfera.....	7
3.1.3. Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. epifíticos .....	7
3.1.4. Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. endofíticos .....	8
3.2. Identificação molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	8
3.3. Teste de patogenicidade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	10
3.4. Antagonismo dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> in vitro .	10
3.5. Crescimento micelial das colônias de <i>Trichoderma</i> spp.....	11
3.6. Micoparasitismo de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	11
3.7. Germinação miceliogênica de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na presença dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	12
3.8. Germinação carpogênica de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na presença dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	12
3.9. Biocontrole de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em folíolos destacados de feijoeiro .....	13
3.10. Biocontrole de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em hastes destacadas de feijoeiro .....	13
3.11. Análise de dados .....	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Origem e identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	15
4.2. Teste de patogenicidade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	16
4.3. Antagonismo dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> in vitro .	16
4.4. Crescimento micelial das colônias de <i>Trichoderma</i> spp.....	17

4.5. Micoparasitismo de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no solo por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	18
4.6. Germinação miceliogênica de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na presença dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	18
4.7. Germinação carpogênica dos escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na presença dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	19
4.8. Biocontrole de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em folíolos destacados de feijoeiro .....	19
4.9. Biocontrole de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em hastes destacadas de feijoeiro .....	19
4.10. Correlação entre as variáveis avaliadas.....	19
5. DISCUSSÃO .....	20
6. CONCLUSÕES .....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

## RESUMO

FAGUNDES, Inaia Rhavene Freire, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum*.** Orientador: Luiz Antonio Maffia. Coorientadora: Gilcianny Pignata Cavalcante.

*Trichoderma* spp., antagonistas a vários fitopatógenos, são comumente isoladas do solo, da rizosfera, e como endofíticas. Nosso objetivo foi selecionar isolados de *Trichoderma* spp. nas culturas do feijão e da soja em Minas Gerais e avaliar o antagonismo a *S. sclerotiorum*, agente causal do mofo-branco de ambas as culturas. Obtiveram-se 48 isolados, sendo 30 da rizosfera, 11 epifíticos, quatro endofíticos e três de restos culturais. Com base no sequenciamento das regiões ITS, TEF1- $\alpha$  e RPB2, incluíram-se os isolados em oito espécies de *Trichoderma*: 29 como *T. harzianum*; 5 como *T. koningiopsis*; 4 como *T. hamatum*; 4 como *T. atroviride*; 2 como *T. asperelloides*; 2 como *T. longibrachiatum*; 1 como *T. asperellum* e 1 como *T. neokoningii*. Oito isolados inibiram completamente o crescimento do patógeno em teste de pareamento. Oito isolados foram os mais eficientes no crescimento em meio de cultura. Vinte e quatro isolados foram os mais eficientes em parasitar escleródios no solo, com 79-99% de eficiência. Em ágar-água, 31 isolados inibiram a germinação miceliogênica entre 78-100%, e sete isolados inibiram a germinação carpogênica em mais de 85%. Sete isolados inibiram 100% a infecção em folíolos destacados e um isolado inibiu em 79% a infecção em hastes destacadas. Dois isolados de *T. harzianum*, UN34 e IM2, foram os mais promissores: UN34 por reduzir a sobrevivência e as germinações miceliogênica e carpogênica de escleródios; e IM2 por reduzir a infecção em folíolos e hastes destacados. De acordo com os resultados, existe um potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico de *S. sclerotiorum*.

## ABSTRACT

FAGUNDES, Inaia Rhavene Freire, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Selection of isolates of *Trichoderma* spp. antagonists to *Sclerotinia sclerotiorum*.** Adviser: Luiz Antonio Maffia. Co-adviser: Gilcianny Pignata Cavalcante.

*Trichoderma* spp., antagonists to plant pathogens, are commonly isolated from soil, rhizosphere, and as endophytic. We aimed to select *Trichoderma* spp. isolates from bean and soybean crops in Minas Gerais and to evaluate their antagonism to *S. sclerotiorum*, the causal agent of white mold on both crops. We got 48 isolates: 30 rhizospheric, 11 epiphytic, four endophytic, and three isolates from crop debris. Based on the sequencing of ITS, TEF1- $\alpha$ , and RPB2 regions, the isolates were classified in eight *Trichoderma* species: 29 as *T. harzianum*, 5 as *T. koningiopsis*, 4 as *T. hamatum*, 4 as *T. atroviride*, 2 as *T. asperelloides*; 2 as *T. longibrachiatum*, 1 as *T. asperellum*, and 1 as *T. neokoningii*. Eight isolates completely inhibited pathogen growth in dual culture test. Eight isolates were the most efficient in growing in culture medium. Twenty-four isolates were the best in parasitizing sclerotia in soil, with 79-99% of efficiency. In water-agar, 31 isolates inhibited miceliogenic germination from 78-100%, and seven isolates inhibited the carpogenic germination by more than 85%. Seven isolates inhibited 100% infection on detached leaflets and one isolate inhibited 79% infection on detached stems. Two isolates of *T. harzianum*, UN34 and IM2, were the most promising: UN34 for reducing the survival and both miceliogenic and carpogenic germination of sclerotia; and IM2 for reducing infection in both leaflets and stems. According to the results, there is a potential of the isolates of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *S. sclerotiorum*.

## 1. INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente etiológico do mofo branco, é considerado um dos fitopatógenos mais devastadores e cosmopolitas do mundo (Bolton et al., 2006) e um dos fungos mais ameaçadores à agricultura brasileira (Lehner et al., 2015). É um patógeno não específico, que infecta mais de 400 espécies de plantas em diferentes famílias botânicas, com destaque para culturas agronomicamente importantes como o feijoeiro (Boland and Hall, 1994). Segundo produtores do Alto Paranaíba, segunda maior região mineira produtora de feijão, o mofo branco chega a causar perdas de até 100% da produção.

Há várias medidas de controle do mofo branco, como práticas culturais, mas sua eficácia é limitada, em vista da agressividade do patógeno (Troian et al., 2014) e da ampla gama de hospedeiros. Há relatos de variedades resistentes, mas pouco efetivas em condições de campo (Chen and Wang, 2005). Atualmente, a aplicação de fungicidas é a medida de controle mais eficiente do mofo branco (Zhou et al., 2014). Entretanto, há vários impactos advindos do grande número de aplicações (Clarkson et al., 2004), como problemas de resistência do fungo, desequilíbrios ecológicos e efeitos tóxicos dos resíduos a seres humanos e animais (Johnson and Atallah, 2006).

Em vista dos problemas apontados, há necessidade de medidas alternativas de manejo do mofo branco, como o biocontrole. Há vários microrganismos potenciais agentes de biocontrole (ACBs) de *S. sclerotiorum*, como *Bacillus subtilis*, *Coniothyrium minitans*, *Streptomyces lydicus* (Zeng et al., 2012a), *Bacillus amyloliquefaciens* (Abdullah et al., 2008), *Clonostachys rosea* (Rodriguez et al., 2011) e várias espécies de *Trichoderma* (Abdullah et al., 2008; Bae and Knudsen, 2007; Castillo et al., 2011; Lopes et al., 2012; Smith et al., 2013; Tančić et al., 2013; Troian et al., 2014; Zeng et al., 2012a). O sucesso de *Trichoderma* spp. como ACBs deve-se à sua capacidade de reprodução e sobrevivência sob condições adversas, eficiência no uso de nutrientes, antagonismo a fungos fitopatogênicos e eficiência na promoção de crescimento das plantas (Hoyos-Carvajal et al., 2009; Hoyos-Carvajal et al., 2009b; Mukhtar et al., 2012; Tančić et al., 2013). Em vista dessa capacidade, *Trichoderma* spp., constituem a maior parte dos produtos usados no biocontrole de fitopatógenos.

Considerando a importância do mofo branco para o feijoeiro no Brasil, a necessidade de alternativas de manejo da doença, a carência de estudos de biocontrole do fungo no país e o potencial antagonista de *Trichoderma* spp.,

delineou-se este trabalho. Objetivou-se obter isolados de *Trichoderma* spp. de lavouras de feijão e soja de Minas Gerais e avaliar o potencial antagonista dos isolados a *S. sclerotiorum*. Avaliaram-se os isolados quanto ao/a: i. antagonismo a *S. sclerotiorum* em testes de pareamento de culturas ii. crescimento micelial em meio de cultura; iii. potencial de micoparasitismo do patógeno; iv. inibição das germinações miceliogênica e carpogênica de escleródios; e v. inibição da infecção de *S. sclerotiorum* em folíolos e hastes destacadas de feijoeiro.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Mofo branco**

A podridão de esclerotínia, também conhecida como mofo branco, causada por *S. sclerotiorum*, é ameaça a plantas monocotiledôneas, como cebola e tulipa, e a várias dicotiledôneas como feijão, soja, girassol, colza, grão de bico, amendoim, ervilha seca, lentilha, totalizando mais de 400 espécies hospedeiras em todo o mundo (Boland and Hall, 1994).

*Sclerotinia sclerotiorum* é patógeno homotálico e necrotrófico. Na cultura do feijão, logo no início do desenvolvimento do patógeno, as plantas podem não ter sintomas da doença, que se iniciam com a murcha de algumas plantas, resultado do apodrecimento do caule causado pelo fungo. Posteriormente, nas folhas, hastes e vagens ocorrem manchas encharcadas, de coloração parda e consistência mole, seguidas de crescimento de micélio branco de aspecto cotonoso, cobrindo porções dos tecidos (Purdy, 1979; Steadman, 1983). Com o progresso da doença, em poucos dias o micélio se converte em escleródios, tipicamente formados no interior ou na superfície dos tecidos infectados, sob condições de elevada umidade (Bolton et al., 2006).

Os escleródios são agregados melanizados de hifas, que podem permanecer viáveis no solo por até 8 anos (Adams and Ayers, 1979), e germinar miceliogênica ou carpogenicamente. Na germinação miceliogênica, há produção de micélio hialino e septado (Purdy, 1979). Embora possa causar infecções importantes, o micélio oriundo da germinação miceliogênica geralmente infecta plantas hospedeiras próximas aos escleródios (Bardin and Huang, 2001). Na germinação carpogênica, produzem-se os apotécios, contendo os ascos com os ascósporos (Bolton et al., 2006). Os apotécios são a maior fonte de inóculo do fungo, e a germinação carpogênica o principal componente para ocorrência de epidemias da doença. Os ascósporos, ejetados em grande quantidade, são facilmente transportados pelo vento e podem infectar plantas até 50 a 100 m da fonte de inóculo (Steadman, 1983). Um apotécio libera, em uma descarga, 10.000 a 30.000 ascósporos, e pode chegar a produzir em 5 a 10 dias de vida, mais de dois milhões de ascósporos (Steadman, 1983). Dos apotécios, os ascósporos são liberados continuamente por 2 a 17 dias, com média de 9 dias (Schwartz and Steadman, 1978).

As condições favoráveis à ocorrência do mofo branco são: alta densidade de plantio, períodos prolongados de precipitação, temperaturas amenas, abaixo de 20°C, e alta umidade relativa, acima de 70%, quando os apotécios liberam os ascósporos, que se depositam na parte aérea (Purdy, 1979). Os ascósporos podem germinar sobre a superfície do tecido sadio e, para infectar a planta, requerem uma fonte de nutrientes exógenos e um filme de água livre. Em geral, tecidos senescentes ou necróticos atuam como fontes de nutrientes para iniciar a germinação dos ascósporos, que infectarão a planta hospedeira (Abawi and Grogan, 1979).

A doença pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura, mas o período da floração é considerado como crítico para epidemias severas (Steadman, 1983). Nesta fase, o microclima é mais favorável ao patógeno, em vista do maior índice de área foliar. Assim, os ascósporos do patógeno caem nas pétalas, germinam, infectam, e a infecção progride com o avanço do micélio dentro dos tecidos, que são macerados pelo ácido oxálico produzido pelo fungo. Geralmente, há ampla produção de escleródios na superfície do micélio, após 7 a 10 dias da colonização (Abawi and Grogan, 1979). Os ascósporos podem ser liberados antes que a planta floresça e sobrevivem por cerca de duas semanas na superfície da planta ou do solo; nas flores, o micélio permanece viável por até um mês (Steadman, 1983).

A dispersão dos ascósporos ocorre pelo vento e insetos polinizadores. Os escleródios podem ser dispersos por solo infestado, água de irrigação e misturados às sementes e fezes de animais que se alimentaram de plantas doentes (Tu, 1988). Em áreas livres do patógeno, sementes contaminadas internamente pelo micélio dormente do fungo ou escleródios associados ao lote de sementes, podem iniciar epidemias do mofo branco (Tu, 1988).

## **2.2. Biocontrole do mofo branco**

Desde os primórdios da agricultura, microrganismos fitopatogênicos reduzem a produtividade das culturas. Com os avanços tecnológicos, adotaram-se várias medidas para reduzir os impactos causados pelos patógenos na agricultura, como o controle químico (Mueller et al., 2002; Vieira et al., 2012), controle genético (Lehner et al., 2015), práticas culturais e o controle biológico (Singh and Schwartz, 2010).

Controle biológico é definido pela “redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, por um ou mais

organismos, realizado naturalmente, ou através da manipulação do ambiente ou do hospedeiro, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas” (Cook and Baker, 1983). Atualmente, a integração do controle biológico a outros métodos vem revolucionando o manejo fitossanitário, pois várias estratégias de controle biológico são compatíveis a sistemas agrícolas sustentáveis, cujas práticas promovem a conservação dos recursos naturais.

Há vários relatos do controle biológico do mofo branco, e mais de 30 espécies de fungos e bactérias são descritos como antagonistas a *Sclerotinia* spp. (Tu, 1988), como *Bacillus subtilis*, *Coniothyrium minitans*, *Streptomyces lydicus* (Zeng et al., 2012a), *Bacillus amyloliquefaciens* (Abdullah et al., 2008), *Clonostachys rosea* (Rodriguez et al., 2011) e várias espécies de *Trichoderma* (Abdullah et al., 2008; Bae and Knudsen, 2007; Castillo et al., 2011; Lopes et al., 2012; Smith et al., 2013; Tančić et al., 2013; Troian et al., 2014; Zeng et al., 2012a). *Trichoderma* spp. representam aproximadamente 50% do mercado de ACBs (Héraux et al., 2005), são fungos cosmopolitas colonizadores de solo e frequentemente estão associados à madeira em decomposição. Há também espécies economicamente importantes para produção de enzimas industriais (Druzhinina and Kubicek, 2005).

Há vários relatos do antagonismo de *Trichoderma* spp. a *S. sclerotiorum*. Isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em 45-64%, e na presença de compostos voláteis de *T. longibrachiatum*, inibiram o crescimento do patógeno em 31,5% (Castillo et al., 2011). *Trichoderma harzianum* T-22 reduziu o número de escleródios de *S. sclerotiorum* no solo em 70,8% e a severidade da doença em campo de produção de soja em 38,5% (Zeng et al., 2012a). Em ambiente controlado, o isolado T-22 também reduziu a sobrevivência de escleródios em 80,5% e a produção de apotécios de *S. sclerotiorum* em 31,7% (Zeng et al., 2012b). Dezesesseis isolados de 11 espécies (*T. asperellum*, *T. ceramicum*, *T. andinensis*, *T. orientalis*, *T. atroviride*, *T. viridescens*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. koningii* e *T. koningiopsis*), reduziram a formação de escleródios e o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, bem como a podridão causada pelo fungo em batata (Ojaghian, 2011). Segundo o autor, em casa de vegetação, *T. koningii*, *T. virens*, *T. ceramicum* e *T. viridescens* foram os mais efetivos em reduzir a severidade da doença, enquanto no campo, obtiveram-se melhores resultados com *T. viridescens* e *T. ceramicum*. *Trichoderma asperellum* Th034, *T. atroviride* Th002 e *T. harzianum* Th203 foram eficientes em inibir a

germinação de mais de 70% dos escleródios de *S. sclerotiorum* em condições controladas (Smith et al., 2013). Em condições *in vitro* e *in vivo*, *T. harzianum* inibiu o crescimento, produção de micélio e de escleródios de *S. sclerotiorum* (Abdullah et al., 2008). Para os autores, houve proteção de mais de 80% das mudas de tomate, abóbora e berinjela inoculadas, com eficácia semelhante ou ligeiramente menor à de dois biofungicidas, dependendo da cultura. Rabeendran et al. (2006) testaram a eficiência de *T. hamatum* no biocontrole de *S. minor* em mudas de alface. Segundo os autores, o isolado, previamente selecionado como antagonista a *S. sclerotiorum*, também reduziu a doença causada por *S. minor* em mudas.

O sucesso de isolados de *Trichoderma* spp. como ACBs se deve à sua capacidade de reprodução e sobrevivência sob condições adversas, eficiência na utilização de nutrientes, antagonismo a fungos fitopatogênicos e eficiência na promoção de crescimento das plantas (Hoyos-Carvajal et al., 2009; Hoyos-Carvajal et al., 2009b; Mukhtar et al., 2012; Tančić et al., 2013).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Isolamento e preservação dos isolados de *Trichoderma* spp.**

##### **3.1.1. Amostragem**

Em propriedades comerciais em Minas Gerais, coletaram-se amostras de solo da rizosfera e de plantas de soja saudáveis em Iraí de Minas, em janeiro de 2014, e amostras de solo e de plantas de feijão em Unaí e Viçosa, em julho de 2014. Em cada propriedade efetuou-se o caminhamento em zigue-zague, coletando porções de solo de 15 pontos do terreno entre 0 e 30 cm de profundidade ao redor de cada planta. Coletaram-se 15 plantas em três estádios de desenvolvimento: vegetativo, florescimento e maturação, e foram armazenadas em sacos plásticos, acondicionadas em caixas de isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório, onde foram imediatamente processadas.

##### **3.1.2. Isolamento de *Trichoderma* spp. dos restos culturais e da rizosfera**

Realizou-se o isolamento direto, para obter *Trichoderma* spp. dos restos culturais. Para isolamento de *Trichoderma* spp. da rizosfera, transferiram-se 10 g de solo para 90 mL de água destilada esterilizada (ADE) em Erlenmeyers, agitou-se em agitador magnético a 150 rpm por 30 min, efetuaram-se diluições de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , previamente determinadas em ensaios testes entre as diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-10}$ . Semearam-se alíquotas de 400  $\mu$ L de cada diluição em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) em placas de Petri com 300 mg/L de cloranfenicol (Smith et al., 2013), incubando-se a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h. Inspeccionaram-se as placas diariamente, e se repicaram as culturas puras de *Trichoderma* spp. que surgiram para BDA em tubos de ensaio.

##### **3.1.3. Isolamento de *Trichoderma* spp. epifíticos**

Para isolamento de *Trichoderma* spp. epifíticos, cortaram-se raízes, caules, folhas, flores e vagens em pedaços de aproximadamente 2 cm. De cada material, adicionaram-se 4 g em 20 mL de ADE em Erlenmeyers, e agitou-se em agitador magnético a 150 rpm. Após 10 min, retiraram-se os fragmentos e centrifugou-se a  $1000 \times g$  por 30 s (Xia et al., 2011). Depositaram-se 400  $\mu$ L do sobrenadante em meio BDA com 300 mg/L de cloranfenicol em placas de Petri (Smith et al., 2013),

incubando-se a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h. Inspeccionaram-se as placas diariamente, e se repicaram as culturas puras de *Trichoderma* spp. que surgiram para BDA em tubos de ensaio.

#### **3.1.4. Isolamento de *Trichoderma* spp. endofíticos**

Lavaram-se raízes, caules, folhas, flores e vagens com água da torneira durante 10 min para remover resíduos de solo e poeira. Em seguida, foram sucessivamente imersos em etanol a 70% por 1 min, hipoclorito de sódio com 2-2,5% de cloro ativo, por 3,5 min (Santamaría and Bayman, 2005), e lavadas três vezes em ADE durante 2 min.

Para isolar o fungo a partir de raízes, usou-se o método descrito por Santamaría and Bayman (2005). Após a desinfestação, fragmentos de 1 cm das raízes foram secos sobre papel de filtro esterilizado; em seguida, depositaram-se cinco fragmentos em BDA com 300 mg/L de cloranfenicol em placas de Petri (Smith et al., 2013).

Moeram-se tecidos de caules, folhas, flores e vagens em cadinho esterilizados com 1 ml de ADE (Xie et al., 2013), efetuaram-se diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , e semearam-se alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  em BDA com 300 mg/L de cloranfenicol (Smith et al., 2013) em placas de Petri, que foram mantidas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h. Inspeccionaram-se as placas diariamente, e repicaram-se as culturas puras de *Trichoderma* spp. que surgiram para BDA em tubos de ensaio.

Semearam-se alíquotas da água final de enxágue dos fragmentos em BDA em placas de Petri como testemunha da desinfestação superficial das amostras.

Preservaram-se os isolados obtidos em glicerol 30% em tubos criogênicos, armazenados em ultrafreezer a  $-80^\circ\text{C}$ , e em tubos de ensaio a  $4^\circ\text{C}$ , em câmara fria.

#### **3.2. Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp.**

Cultivou-se micélio proveniente de isolamento de ponta de hifa de *Trichoderma* spp. em meio líquido de batata-dextrose (BD), a  $28^\circ\text{C}$  no escuro por 5 dias. O micélio foi filtrado, lavado com água destilada e macerado em nitrogênio líquido com pistilo e Gral de porcelana, e extraiu-se o DNA com o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega). Checaram-se a qualidade e a quantidade de DNA em espectrofotômetro NanoDrop<sup>™</sup> 1000, adotando-se 25 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA para prosseguir com as reações de PCR.

Usaram-se oligonucleotídeos iniciadores SR6R (5'AAGTAGAAGTCGTAACAAGG) / LR1 (5'GGTTGGTTTCTTTTCCT), EF-728M (5'CATYGAGAAGTTCGAGAAGG) / Ef2 (5'GGARGTACCAGTSATCATGTT) e rpb2F (5'GAAGCGTCTGGATYTS GC) / rpb2R (5'GGGGAAAGGRATGATACT) para amplificação por PCR de fragmentos correspondentes a sequências parciais dos genes da região transcrita interna (ITS) (ITS1-5,8S-ITS2), fator de alongação (TEF1- $\alpha$ ) e subunidade II da RNA polimerase (RPB2), comumente adotadas para taxonomia de *Trichoderma* spp. Preparou-se cada reação de amplificação com 12,5  $\mu$ L de TopTaq Master Mix (Qiagen); 2,5  $\mu$ L de BSA (50mg/mL, albumina sérica bovina, Sigma), 0,5  $\mu$ L de DMSO (Dimetil sulfóxido); 6  $\mu$ L de água destilada deionizada; 0,25  $\mu$ L de cada primer (100 mM); 3  $\mu$ L de DNA, totalizando 25  $\mu$ L. O DNA dos isolados foi amplificado em termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa de amplificação da região ITS consistiu de uma desnaturação inicial de 1 min a 94°C, seguido de 30 ciclos a 1 min a 94°C, 1 min de anelamento a 50°C, 90 s de extensão a 72°C e 7 min de extensão final a 72°C. Para TEF1- $\alpha$ , programaram-se o termociclador para executar 2 min a 94°C, seguido de 9 ciclos de 35 s a 94°C, 55 a 66°C, e 35 ciclos de 35 s a 94°C, 55 s a 55°C e 90 s de extensão final a 72°C. Para RPB2, o programa de amplificação foi 2 min a 94°C, seguido de 9 ciclos de 35 s a 94°C, 55 a 66°C, e 35 ciclos de 35 s a 94°C, 55 s a 53,5°C e 90 s de extensão final a 72°C.

Analizou-se o produto do PCR por eletroforese em gel de agarose a 2%, juntamente com o marcador de massa molecular DNA Ladder 1Kb (Invitrogen), e visualizou-se o gel em sistema de fotodocumentação (Loccus). O produto da reação foi purificado com Exo-SAP-IT (USB) e sequenciado pela Macrogen (Coreia do Sul) com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores usados na reação de PCR.

Analysaram-se os eletroferogramas resultantes do sequenciamento, e montaram-se as sequências contíguas com o programa DNA Sequence Assembly BASER Software 4,23 (<http://www.dnabaser.com/index.html>). Compararam-se as sequências no banco de “dados basic local alignment search tool” (BLAST) do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e na base de dados TrichoKEY, específica para taxonomia de *Trichoderma* sp. e seu teleomorfo *Hypocrea* (ISTH, <http://www.isth.info/>).

### **3.3 Teste de patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum***

Cultivaram-se feijoeiros ‘Madrepérola’ em vasos de 2L contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças<sup>®</sup> (Vida Verde, Mogi-Mirim, São Paulo- Brasil). Conduziram-se três plantas/vaso, mantendo-as irrigadas em casa de vegetação. Após 30 dias de cultivo, cortaram-se as hastes principais de feijoeiros 3 cm acima do quarto nó. Para inoculação, obteve-se micélio de cultura em BDA, por meio de uma ponteira eppendorf de 1000 µL de ápice cortado (Lehner, 2015), o qual foi depositada na extremidade cortada da haste. Mantiveram-se as plantas em câmara de crescimento a 23°C, fotoperíodo de 12h. Após 7 dias, avaliou-se a mortalidade das plantas.

### **3.4. Antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro**

O isolado SS1 de *S. sclerotiorum* foi obtido a partir de feijoeiros com sintomas do mofo branco em Unaí, Minas Gerais. Após obter cultura pura, fez-se isolamento monoascospórico, e confirmou-se a espécie por meio dos oligonucleotídeos iniciadores SSasprF (CATTGGAAGTCTCGTCGTCA)/ SSasprR (TCAAACGCCAAAGCTGTATG) usados para amplificação por PCR de fragmentos correspondentes a sequências parciais dos genes da aspartil protease, gene descrito para identificar *S. sclerotiorum* (Abd-Elmagid et al., 2013).

Sobre BDA, em placas de Petri, depositaram-se dois discos de 5 mm de diâmetro de BDA, um com crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e um com *Trichoderma* spp., espaçados 4 cm. As placas-testemunha continham um disco de *S. sclerotiorum* e outro com meio BDA apenas. Mantiveram-se as placas a 25°C, fotoperíodo de 12 h, e se avaliou quando o micélio do patógeno cobriu toda a superfície do meio nas placas-testemunha (Lopes et al., 2012). Adotou-se escala com cinco classes (Bell et al., 1982) quanto à colonização da superfície do meio de cultura: 1- *Trichoderma* colonizou todo o meio, e se sobrepôs ao crescimento do patógeno; 2- *Trichoderma* colonizou pelo menos 2/3 do meio, e se sobrepôs ao patógeno; 3- *Trichoderma* e o patógeno colonizaram mais que 1/3 e menos que 2/3 do meio; 4- o patógeno colonizou ao menos 2/3 da superfície do meio e não foi invadido por *Trichoderma*; 5- o patógeno colonizou todo o meio, e se sobrepôs ao crescimento de *Trichoderma*.

Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e com três repetições (uma placa= uma unidade experimental).

### **3.5. Crescimento micelial das colônias de *Trichoderma* spp.**

Depositou-se um disco de 5 mm de diâmetro de BDA com crescimento micelial de cada isolado de *Trichoderma* spp. em BDA no centro de cada placa de Petri. Mantiveram-se as placas a 23°C (Smith et al., 2013), fotoperíodo de 12 h. Após 3 dias, mediu-se o diâmetro da área de crescimento micelial dos isolados em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas). Converteu-se o crescimento de cada isolado em cada repetição (X) em eficiência de crescimento micelial (ECM) pela equação:  $ECM = (X/9) * 100$ , sendo que 9 correspondeu ao meio na placa totalmente coberto por crescimento.

Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em DIC e com três repetições (uma placa= uma unidade experimental).

### **3.6. Micoparasitismo de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma* spp.**

Para produção de escleródios, de cenouras lavadas e descascadas, cortaram-se cubos de aproximadamente 1x1x1cm, que foram colocados em Erlenmeyers e autoclavados a 121°C por 20 min (Bae and Knudsen, 2007). Transferiram-se dois discos de BDA com crescimento micelial de *S. sclerotiorum* para cada Erlenmeyer, e após 25-30 dias de crescimento a 21°C, fotoperíodo de 12 h, adicionou-se ADE aos Erlenmeyers, agitou-se e recuperaram-se os escleródios em peneiras com água de torneira. Efetuaram-se a desinfestação dos escleródios em etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio com 2-2,5% de cloro ativo por 3 min, lavagem três vezes em ADE e secagem em capela de fluxo laminar por 12 h.

Usou-se latossolo vermelho, pH 4,76 e teor de matéria orgânica de 6,08 dag/Kg, passado em peneiras de 2 mm, e seco a temperatura ambiente. Calculou-se a capacidade de campo (CC) considerando-se o valor equivalente de umidade (EU), determinado pelo Laboratório de Física do Solo do Departamento de Solos da UFV conforme a equação:  $CC = 0,081 + 0,888 EU$  (Ruiz et al., 2003).

Para testar a capacidade de cada isolado de *Trichoderma* spp. em micoparasitar escleródios de *S. sclerotiorum*, colocaram-se 60 g de solo na CC em

placas de Petri (9x1,5cm), e autoclavou-se três vezes a 121°C (0,1MPa) por 40min. Após 48 h adicionaram-se 15 escleródios ao solo em cada placa. De cada isolado de *Trichoderma* spp., com atomizador manual pulverizaram-se 2,5 mL de suspensão com  $1 \times 10^7$  conídios/mL na superfície do solo, contendo os escleródios, por oito vezes. As placas permaneceram a 21°C no escuro. Após 8 dias, contaram-se os escleródios que tinham coloração esverdeada, indicando micoparasitismo por *Trichoderma* (Smith et al., 2013). Converteu-se o total de escleródios micoparasitados por isolado e por repetição (X) em eficiência de micoparasitismo (EMP) pela equação:  $EMP = (X/15) \times 100$ , em que 15 corresponde ao número máximo de escleródios micoparasitados.

Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em DIC e com seis repetições (uma placa com 15 escleródios= uma unidade experimental).

### **3.7. Germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença dos isolados de *Trichoderma* spp.**

Dos escleródios avaliados quanto ao micoparasitismo no solo (item 3.5), separaram-se cinco por placa, os quais foram desinfestados em solução de etanol 70% por 1 min e de hipoclorito de sódio a 2-2,5% durante 3 min, lavada por três vezes em ADE e secos sobre papel filtro, em capela de fluxo laminar. Após 12 h, semearam-se os escleródios em ágar-água em placas de Petri (15x1,5cm), incubando-se a 21°C, no escuro. Após 3 dias, determinou-se o número de escleródios germinados (X) por isolado e por repetição, e se estimou a eficiência de inibição da germinação miceliogênica (EIGM) pela equação:  $EIGM = ((10-X)/10) \times 100$ , em que 10 corresponde ao número máximo de escleródios germinados.

Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em DIC e com três repetições (uma placa com 10 escleródios= uma unidade experimental).

### **3.8. Germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença dos isolados de *Trichoderma* spp.**

Dos escleródios avaliados quanto ao micoparasitismo no solo (item 3.5), separaram-se dez por placa, os quais foram desinfestados (item 3.6) e depositados em 140 g de areia autoclavada, em placas de Petri (15x1,5cm), incubaram-se a 19°C e fotoperíodo de 12 h. Pulverizou-se água da torneira sobre a areia, aproximadamente 30 mL por dia, para manter a umidade favorável à germinação carpogênica (Lehner

et al., 2015). Após 60 dias, determinou-se o número de escleródios germinados (X) por isolado e por repetição, e estimou-se a eficiência de inibição da germinação carpogênica (EIGC) pela equação:  $EIGC = ((20-X)/20)*100$ , em que 20 corresponde ao número máximo de escleródios germinados.

Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em DIC e com três repetições (uma placa com 20 escleródios= uma unidade experimental).

### **3.9. Biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma* spp. em folíolos destacados de feijoeiro**

Cultivaram-se feijoeiros BRSMG ‘Madrepérola’ em vasos de 2L contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças<sup>®</sup> (Vida Verde, Mogi-Mirim, São Paulo- Brasil), três plantas/vaso, em casa de vegetação.

Após 30 dias, destacaram-se folíolos dos dois trifólios mais jovens e totalmente expandidos de cada planta. Colocou-se um folíolo sobre papel filtro umedecido com 5 mL de ADE em placa de Petri (15x1,5cm). Para aplicar cada isolado de *Trichoderma* spp., imergiu-se o folíolo em suspensão com  $1 \times 10^7$  conídios/mL. Como testemunha, imergiram-se os folíolos em ADE. Após 24 h, colocou-se um disco de micélio de *S. sclerotiorum*, proveniente de cultura em BDA, entre a nervura principal e o bordo do folíolo. Mantiveram-se as placas em sala climatizada a 23°C no escuro, e 5 dias após a inoculação, avaliou-se o diâmetro da lesão utilizando um paquímetro (Steadman et al., 1997). Converteu-se o diâmetro médio das lesões por isolado e por repetição (X) em eficiência de inibição da infecção de folíolos (EIIF) pela equação:  $EIIF = ((4,2-X)/4,2)*100$ , em que 4,2 corresponde ao diâmetro médio máximo da lesão.

Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em DIC e com quatro repetições (uma placa com um folíolo= uma unidade experimental).

### **3.10. Biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma* spp. em hastes destacadas de feijoeiro**

Cortaram-se as hastes principais de feijoeiros, cultivados como no item 3.8, 3 cm acima do quarto nó. A partir do corte obtiveram-se dois fragmentos de 8 cm de comprimento. Colocaram-se dois fragmentos aleatórios de hastes sobre papel filtro umedecido com 5 mL de ADE por placa de Petri (15x1,5cm). Para se aplicar cada isolado de *Trichoderma* spp., imergiram-se os fragmentos de haste em suspensão

com  $1 \times 10^7$  conídios/mL. Como testemunha, imergiram-se as hastes em ADE. Após 24 h, micélio de *S. sclerotiorum*, obtido de cultura em BDA, perfurou-se cultura em BDA com uma ponteira eppendorf de 1000  $\mu$ L de ápice cortado (Lehner, 2015), e depositou-se o micélio obtido na extremidade superior dos fragmentos. Mantiveram-se as placas em sala climatizada a 23°C no escuro, e 5 dias após a inoculação, avaliou-se o comprimento da lesão utilizando-se um paquímetro (Petzoldt and Dickson, 1996). Converteu-se o comprimento médio das lesões por isolado e por repetição (X) em eficiência de inibição da infecção de hastes (EIIH) pela equação:  $EIIH = ((7,8 - X) / 7,8) * 100$ , em que 7,8 corresponde ao comprimento médio máximo de lesão.

Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em DIC e com três repetições (uma placa com dois fragmentos de haste = uma unidade experimental).

### **3.11. Análise de dados**

Quando se detectou homogeneidade de variâncias entre as duas execuções de um experimento, analisaram-se conjuntamente os dados das duas. Submeteram-se as variáveis à análise de variância individual e conjunta. Quando os efeitos de tratamento foram significativos, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott Knott ( $\alpha=0,05$ ) (não mostrado), e o isolado de maior eficiência em cada experimento (promissor) foi comparado com os demais pelo teste de Dunnet ( $\alpha=0,05$ ). Estimou-se também a correlação entre as variáveis avaliadas, por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Executaram-se todas as análises estatísticas com o Programa R (R Development Core Team).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Origem e identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

Obtiveram-se 48 isolados de *Trichoderma* spp.: 30 da rizosfera, 11 epifíticos, quatro endofíticos e três de restos culturais. Com base no sequenciamento, classificaram-se os isolados em oito espécies de *Trichoderma*: 29 de *T. harzianum*, cinco de *T. koningiopsis*, quatro de *T. hamatum*, quatro de *T. atroviride*, dois de *T. asperelloides*, dois de *T. longibrachiatum*, um de *T. asperellum* e um de *T. neokoningii* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Origem e identificação dos isolados de *Trichoderma* spp. coletados em lavouras de feijão e soja em Minas Gerais

Origem	Lavoura/Local	Isolado	Espécie	Acesso GenBank*
Iraí de Minas	Soja/Restos culturais	IM1	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Iraí de Minas	Soja/Restos culturais	IM2	<i>T. harzianum</i>	AY605788
Iraí de Minas	Soja/Restos culturais	IM4	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Iraí de Minas	Soja /Rizosfera	IM6	<i>T. harzianum</i>	FJ463314
Iraí de Minas	Soja /Raiz **	IM7	<i>T. hamatum</i>	FJ763154
Iraí de Minas	Soja /Rizosfera	IM8	<i>T. hamatum</i>	FJ763154
Iraí de Minas	Soja /Rizosfera	IM9	<i>T. hamatum</i>	FJ763154
Iraí de Minas	Soja /Rizosfera	IM10	<i>T. hamatum</i>	FJ763154
Iraí de Minas	Soja /Rizosfera	IM11	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Iraí de Minas	Soja /Caule ***	IM12	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Iraí de Minas	Soja /Raiz ***	IM13	<i>T. harzianum</i>	FJ463333
Iraí de Minas	Soja /Raiz ***	IM14	<i>T. harzianum</i>	FJ463333
Iraí de Minas	Soja /Raiz ***	IM15	<i>T. asperellum</i>	EU856323
Iraí de Minas	Soja /Caule **	IM17	<i>T. longibrachiatum</i>	JN175570
Iraí de Minas	Soja /Caule **	IM18	<i>T. longibrachiatum</i>	JN175570
Unai	Feijão/Rizosfera	UN1	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Rizosfera	UN2	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Rizosfera	UN3	<i>T. harzianum</i>	FJ463352
Unai	Feijão/Raiz ***	UN4	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Rizosfera	UN6	<i>T. harzianum</i>	FJ463352
Unai	Feijão/Rizosfera	UN7	<i>T. harzianum</i>	FJ463352
Unai	Feijão/Rizosfera	UN8	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Rizosfera	UN10	<i>T. harzianum</i>	FJ463352
Unai	Feijão/Rizosfera	UN11	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Rizosfera	UN12	<i>T. harzianum</i>	AY605788
Unai	Feijão/Rizosfera	UN14	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Raiz ***	UN16	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Raiz ***	UN17	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Rizosfera	UN18	<i>T. neokoningii</i>	DQ841718
Unai	Feijão/Rizosfera	UN22	<i>T. harzianum</i>	AF348104
Unai	Feijão/Rizosfera	UN25	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Rizosfera	UN26	<i>T. harzianum</i>	FJ463352
Unai	Feijão/Rizosfera	UN27	<i>T. harzianum</i>	FJ463324
Unai	Feijão/Rizosfera	UN28	<i>T. harzianum</i>	FJ463302

Unaí	Feijão/Rizosfera	UN30	T. asperelloides	JN133571
Unaí	Feijão/Raiz ***	UN31	T. harzianum	FJ463324
Unaí	Feijão/Raiz ***	UN32	T. harzianum	AY605788
Unaí	Feijão/Raiz ***	UN33	T. koningiopsis	FJ467647
Unaí	Feijão/Raiz ***	UN34	T. harzianum	AY605788
Viçosa	Feijão/Rizosfera	VI3	T. atroviride	AF456903
Viçosa	Feijão/Folha **	VI4	T. atroviride	AF456903
Viçosa	Feijão/Rizosfera	VI6	T. atroviride	AF456903
Viçosa	Feijão/Rizosfera	VI10	T. koningiopsis	FJ467647
Viçosa	Feijão/Rizosfera	VI11	T. koningiopsis	FJ463270
Viçosa	Feijão/Rizosfera	VI12	T. koningiopsis	FJ463270
Viçosa	Feijão/Rizosfera	VI14	T. asperelloides	JN133571
Viçosa	Feijão/Rizosfera	VI16	T. koningiopsis	FJ467647
Viçosa	Feijão/Rizosfera	VI18	T. atroviride	AF456903

\* Código de acesso no Genbank da espécie mais próxima para o gene TEF1- $\alpha$

\*\* Isolamento endofítico

\*\*\* Isolamento epifítico

#### 4.2. Teste de patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum*

Em todas as plantas de feijão inoculadas com o isolado SS1, ocorreram sintomas característicos do mofo branco e morte, 3 e 7 dias após a inoculação, respectivamente.

#### 4.3. Antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro

Os isolados mais eficientes foram IM11, IM14, VI10, VI14, UN8, UN30, UN33 e UN34, que inibiram 100% do crescimento de *S. sclerotiorum*, classe 1 (Tabela 2). Em nenhum caso, o patógeno colonizou todo o meio e sobrepôs ao crescimento dos isolados antagonistas, o que corresponderia à classe 5 da escala de Bell et al. (1982).

**Tabela 2.** Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo a *Sclerotinia sclerotiorum* no teste de pareamento de culturas

Classe <sup>a</sup>	Isolados <sup>b</sup>
1	IM11, IM14, VI10, VI14, UN8, UN30, UN33, UN34
2	IM2, IM4, IM6, IM7, IM8, IM9, IM15, IM17, VI3, VI4, VI6, VI11, VI12, VI16, VI18, UN3, UN6, UN10, UN17, UN28, UN32
3	IM1, IM10, IM12, IM13, IM18, UN1, UN2, UN4, UN7, UN11, UN12, UN14, UN16, UN18, UN22, UN26, UN31
4	UN25, UN27

<sup>a</sup> Classes definidas com a escala de Bell et al. (1982). <sup>b</sup> Isolados de *T. harzianum* (IM11, IM14, UN8, UN34, IM2, IM4, IM6, UN3, UN6, UN10, UN17, UN28, UN32, IM1, IM12, IM13, UN1, UN2, UN4, UN7, UN11, UN12, UN14, UN16, UN22, UN26, UN31, UN25, UN27), *T. koningiopsis* (VI10, UN33, VI11, VI12, VI16), *T. asperelloides* (VI14, UN30) *T. hamatum* (IM7, IM8, IM9, IM10) *T. asperellum* (IM15), *T. longibrachiatum* (IM17, IM18), *T. atroviride* (VI3, VI4, VI6, VI18) e *T. neokoningii* (UN18)

#### 4.4. Crescimento micelial das colônias de *Trichoderma* spp.

Detectou-se diferença estatística ( $P < 0,001$ ) entre os isolados de *Trichoderma* spp. Segundo o teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), os isolados IM9, IM14, IM17, IM18, UN6, UN8, UN27 e UN28, não diferiram entre si e cresceram rapidamente, com 100% de eficiência (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores médios das eficiências de: crescimento micelial (ECM), micoparasitismo (EMP), inibição da germinação miceliogênica (EIGM), inibição da germinação carpogênica (EIGC), inibição da infecção de folíolos (EIIF) e inibição da infecção de hastes (EIIH) dos 48 isolados de *Trichoderma* spp.

Isolado <sup>a</sup>	ECM	EMP	EIGM	EIGC	EIIF	EIIH
IM1	88.15*	90.00 <sup>b</sup>	100.00 <sup>c</sup>	72.50*	71.38*	66.29*
IM2	77.59*	83.33 <sup>b</sup>	96.67 <sup>b</sup>	26.67*	100.00 <sup>c</sup>	79.25 <sup>c</sup>
IM4	77.22*	80.00 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	54.17*	52.33*	71.69*
IM6	87.41*	64.44*	100.00 <sup>b</sup>	63.33*	30.35*	56.64*
IM7	87.78*	7.78*	55.00*	50.00*	31.73*	55.46*
IM8	87.97*	3.89*	86.67 <sup>b</sup>	29.17*	76.59*	55.29*
IM9	100.00 <sup>b</sup>	78.89*	98.33 <sup>b</sup>	35.83*	45.43*	46.54*
IM10	86.30*	18.89*	91.67 <sup>b</sup>	39.17*	44.92*	55.13*
IM11	68.52*	79.45 <sup>b</sup>	98.33 <sup>b</sup>	14.17*	23.00*	38.46*
IM12	25.74*	99.44 <sup>c</sup>	91.67 <sup>b</sup>	21.67*	46.76*	57.00*
IM13	87.97*	33.89*	55.00*	30.83*	40.31*	53.90*
IM14	100.00 <sup>c</sup>	45.55*	90.00 <sup>b</sup>	28.33*	72.03*	70.35*
IM15	83.71*	66.67*	48.33*	36.67*	36.47*	49.27*
IM17	100.00 <sup>b</sup>	41.67*	60.00*	45.83*	17.85*	54.20*
IM18	100.00 <sup>b</sup>	72.22*	100.00 <sup>b</sup>	50.00*	70.86*	55.82*
UN1	14.07*	96.11 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	37.50*	34.72*	53.33*
UN2	88.34*	98.33 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	25.00*	10.44*	38.88*
UN3	36.11*	89.44 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	42.50*	12.74*	30.33*
UN4	86.49*	90.56 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	65.00*	29.08*	51.93*
UN6	100.00 <sup>b</sup>	82.78 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	43.33*	100.00 <sup>b</sup>	55.86*
UN7	35.56*	81.11 <sup>b</sup>	36.67*	29.17*	45.02*	51.97*
UN8	100.00 <sup>b</sup>	70.00*	86.67 <sup>b</sup>	10.83*	100.00 <sup>b</sup>	70.83*
UN10	48.70*	66.11*	100.00 <sup>b</sup>	12.50*	45.99*	43.08*
UN11	49.63*	93.89 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	25.83*	13.36*	32.23*
UN12	38.52*	96.67 <sup>b</sup>	96.67 <sup>b</sup>	22.50*	69.95*	45.95*
UN14	59.07*	88.89 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	33.33*	62.67*	36.06*
UN16	23.33*	93.33 <sup>b</sup>	98.33 <sup>b</sup>	17.50*	33.80*	39.97*
UN17	31.67*	95.00 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	5.00*	23.10*	40.98*
UN18	63.33*	13.89*	5.00*	86.67 <sup>b</sup>	18.08*	41.27*
UN22	88.89*	73.33*	100.00 <sup>b</sup>	10.83*	15.24*	53.77*

UN25	62.41*	87.22 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	13.33*	69.85*	55.31*
UN26	54.63*	87.78 <sup>b</sup>	95.00 <sup>b</sup>	39.17*	100.00 <sup>b</sup>	38.02*
UN27	100.00 <sup>b</sup>	88.33 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	13.33*	14.68*	43.38*
UN28	100.00 <sup>b</sup>	90.00 <sup>b</sup>	95.00 <sup>b</sup>	65.83*	100.00 <sup>b</sup>	54.70*
UN30	73.70*	83.89 <sup>b</sup>	18.33*	44.17*	70.03*	39.06*
UN31	35.37*	80.56 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	48.33*	61.46*	70.61*
UN32	41.85*	83.89 <sup>b</sup>	98.33 <sup>b</sup>	5.00*	46.67*	65.01*
UN33	87.41*	1.11*	0.00*	95.83 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>	44.86*
UN34	62.41*	91.11 <sup>b</sup>	78.33 <sup>b</sup>	85.00 <sup>b</sup>	35.76*	40.89*
VI3	77.96*	52.78*	31.67*	20.00*	100.00 <sup>b</sup>	55.05*
VI4	76.48*	26.11*	18.33*	43.33*	34.95*	42.47*
VI6	75.56*	31.11*	18.33*	60.83*	63.20*	52.78*
VII0	88.34*	1.67*	0.00*	87.50 <sup>b</sup>	16.09*	40.51*
VII1	81.67*	1.67*	0.00*	87.50 <sup>b</sup>	81.23*	58.55*
VII2	85.00*	0.00*	3.33*	98.33 <sup>b</sup>	21.01*	39.57*
VII4	88.89*	38.34*	21.67*	58.33*	71.11*	38.13*
VII6	72.59*	0.00*	0.00*	99.17 <sup>c</sup>	46.19*	54.94*
VII8	86.48*	32.78*	16.67*	48.33*	34.73*	47.55*

<sup>a</sup> Isolados de *T. harzianum* (IM1, IM2, IM4, IM6, IM12, IM13, IM14, IM11, UN1, UN2, UN3, UN4, UN6, UN7, UN8, UN10, UN11, UN12, UN14, UN16, UN17, UN22, UN25, UN26, UN27, UN28, UN31, UN32, UN34), *T. hamatum* (IM7, IM8, IM9, IM10), *T. asperellum* (IM15), *T. longibrachiatum* (IM17, IM18), *T. atroviride* (VI3, VI4, VI6, VII8), *T. koningiopsis* (VII0, VII1, VII2, VII6, UN33) *T. asperelloides* (VII4, UN30) *T. neokoningii* (UN18).

<sup>b</sup> A eficiência não diferiu da do isolado comparador (teste de Dunnet (P<0,05)).

<sup>c</sup> Isolados comparadores: IM14 para ECM, IM12 para EMP, IM1 para EIGM, VII6 para EIGC, IM2 para EIIF e EIIH.

#### 4.5. Micoparasitismo de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo por isolados de *Trichoderma* spp.

Detectou-se diferença estatística (P<0,001) entre os isolados quanto à eficiência em micoparasitar escleródios de *S. sclerotiorum* no solo. Os isolados diferiram quanto à eficiência (P<0,001). Os isolados IM1, IM2, IM4, IM11, IM12, UN1, UN2, UN3, UN4, UN6, UN7, UN11, UN12, UN14, UN16, UN17, UN25, UN26, UN27, UN28, UN30, UN31, UN32 e UN34, que não diferiram entre si, e sua eficiência em micoparasitar os escleródios variou de 79 a 99% (Tabela 3).

#### 4.6. Germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença dos isolados de *Trichoderma* spp.

Detectou-se diferença estatística (P<0,001) entre os isolados quanto à eficiência em inibir a germinação miceliogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum* em ágar-água. Os isolados IM1, IM2, IM4, IM6, IM8, IM9, IM10, IM11, IM12, IM14, IM18, UN1, UN2, UN3, UN4, UN6, UN8, UN10, UN11, UN12, UN14,

UN16, UN17, UN22, UN25, UN26, UN27, UN28, UN31, UN32 e UN34 não diferiram entre si, e inibiram a germinação miceliogênica e de 78 a 100% (Tabela 3).

#### **4.7. Germinação carpogênica dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença dos isolados de *Trichoderma* spp.**

Detectou-se diferença estatística ( $P < 0,001$ ) entre os isolados quanto à eficiência em inibir a germinação carpogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum* em areia. Os isolados UN18, UN33, UN34, VI10, VI11, VI12 e VI16 não diferiram entre si, e inibiram a germinação carpogênica de 85 a 99% (Tabela 3).

#### **4.8. Biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma* spp. em folíolos destacados de feijoeiro**

Detectou-se diferença estatística ( $P < 0,001$ ) entre os isolados quanto à eficiência em inibir a infecção de folíolos por *S. sclerotiorum*. Os isolados IM2, VI3, UN6, UN8, UN26, UN28 e UN33 não diferiram entre si e inibiram em 100% a infecção (Tabela 3).

#### **4.9. Biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma* spp. em hastes destacadas de feijoeiro**

Detectou-se diferença estatística ( $P < 0,001$ ) entre os isolados quanto à eficiência em inibir infecção de hastes por *S. sclerotiorum*. A eficiência do isolado IM2 em inibir a infecção das hastes foi de 79% e diferiu dos demais isolados (Tabela 3).

#### **4.10. Correlação entre as variáveis avaliadas**

Segundo o teste de correlação de Pearson ( $P < 0,001$ ), ECM correlacionou-se negativamente a EMP ( $r = -0,42$ ); EMP correlacionou-se positivamente a EIGM ( $r = 0,77$ ) e negativamente a EIGC ( $r = -0,56$ ); EIGM correlacionou-se negativamente a EIGC ( $r = -0,62$ ); e EIIF correlacionou-se positivamente a EIIH ( $r = 0,45$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A análise da sequência do DNA é um dos primeiros passos na identificação a nível de espécie de *Trichoderma*. Considerando-se a região ITS, não houve semelhança com os resultados obtidos com os genes *TEF1- $\alpha$*  e *RPB2*. A identificação de *Trichoderma* spp. com base no ITS é inconsistente, pois espécies diferentes podem conter a mesma sequência (Hoyos-Carvajal et al., 2009). Com o gene *TEF1- $\alpha$* , identificou-se com maior precisão os isolados, com porcentagem de identidade acima de 98% com as sequências comparadas. Com sequências do gene *RPB2*, analisadas para confirmar a confiabilidade da identificação baseada no gene *TEF1- $\alpha$* , confirmou-se a identificação. Os genes *TEF1- $\alpha$*  e *RPB2* são os mais usados para identificar espécies de *Trichoderma* (Hoyos-Carvajal et al., 2009; Jaklitsch and Voglmayr, 2015; Smith et al., 2013). Assim, combinando-se estes dois genes, identificaram-se com maior confiabilidade os isolados. Considerando-se essa combinação, identificaram-se as espécies: *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. asperelloides*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* e *T. neokoningii*. Vale frisar que *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum* e *T. asperellum* são comumente relatadas como agentes de biocontrole de fitopatógenos, (Abdullah et al., 2008; Ojaghian, 2011; Rabeendran et al., 2006; Smith et al., 2013; Zeng et al., 2012a; Zeng et al., 2012b).

A capacidade de *Trichoderma* spp. em inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* em teste de pareamento variou entre espécies e entre isolados da mesma espécie; *T. harzianum* (IM11, IM14, UN8, UN34), *T. asperelloides* (VI14, UN30) e *T. koningiopsis* (VI10, UN33) cresceram e esporularam sobre toda a superfície do meio de cultura. Considerando-se o potencial antagônico de 41 isolados a *S. sclerotiorum*, *T. ghanense* e *T. longibrachiatum* foram mais inibitórios ao proteger (Castillo et al., 2011). Em teste de pareamento de culturas, entre 20 isolados, *T. asperellum*, *T. tomentosum* e *T. harzianum* foram os mais eficientes em inibir o patógeno (Lopes et al., 2012). Para os autores, nem todos os isolados de mesma espécie tiveram igual capacidade antagônica, demonstrando, como no presente trabalho, que essa capacidade não é característica da espécie, e sim de cada isolado. Assim, o teste de pareamento não deve ser a única forma de pré-selecionar antagonistas a *S. sclerotiorum*. Como não se deve embasar a seleção de ACB apenas no teste de inibição de crescimento micelial, avaliaram-se outras variáveis.

A capacidade reprodutiva é uma das características de sucesso de *Trichoderma* spp. como ACBs (Hoyos-Carvajal et al., 2009; Hoyos-Carvajal et al., 2009b; Mukhtar et al., 2012; Tančić et al., 2013). Nessa perspectiva, *T. harzianum* (IM14, UN6, UN8, UN27, UN28), *T. longibrachiatum* (IM17, IM18) e *T. hamatum* (IM9) foram os mais eficientes em crescer, já com esporulação ao terceiro dia de incubação. Considerando-se 21 isolados de *Trichoderma* spp., *T. harzianum* e *T. longibrachiatum* também cresceram mais rapidamente (Smith et al., 2013). O crescimento rápido e a capacidade de metabolizar uma diversidade de substratos tornam *Trichoderma* spp. componentes predominantes da microbiota do solo de diferentes ecossistemas, como em áreas agrícolas, (Klein and Eveleigh, 1998). No presente trabalho, 62% dos isolados provieram da rizosfera de soja e feijão. Apesar de se ter avaliado o crescimento micelial, acredita-se que não deve ser critério determinante na seleção de isolados. Definido(s) o(s) melhor(es) isolado(s) por outros critérios, a capacidade de crescimento e esporulação será resultado da seleção de formulações adequadas.

Neste trabalho, houve correlação entre a eficiência de micoparasitismo e a eficiência de inibição da germinação miceliogênica: quanto maior a eficiência em micoparasitar, maior a inibição da germinação miceliogênica dos escleródios. Adicionalmente, *T. longibrachiatum* (IM18), *T. harzianum* (IM2, IM4, IM6, IM11, IM14, UN6, UN8, UN10, UN22, UN31, UN32) e *T. hamatum* (IM8, IM9, IM10) também foram eficientes em inibir a germinação miceliogênica. Espera-se que, além do micoparasitismo, outros mecanismos de antagonismo estejam envolvidos, como antibiose e competição por nutrientes e espaço. Entre 21 isolados, quatro de *T. asperellum* e dois de *T. atroviride* foram os mais eficientes em micoparasitar os escleródios (Smith et al., 2013). No presente estudo, os isolados destas espécies não foram eficientes no micoparasitismo. O controle biológico por *Trichoderma* depende, entre outros fatores, do isolado do antagonista e do patógeno que se deseja controlar (Benítez et al., 2004). Portanto, isolados diferentes, de espécies diferentes, podem diferir em eficiência.

Os apotécios produzem grande quantidade de ascósporos, sendo a germinação carpogênica o principal componente para ocorrência de epidemias do mofo branco (Steadman, 1983). Assim, pode-se reduzir a germinação carpogênica, de extrema importância no manejo da doença, por meio do biocontrole. Neste trabalho, isolados de *T. koningiopsis* (UN33, VII0, VII1, VII2 e VII6), *T.*

neokoningii (UN18) e *T. harzianum* (UN34) inibiram a germinação carpogênica, com eficiência igual ou superior a 85%. Um isolado de *T. harzianum* inibiu a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* em 85% (Zeng et al., 2012b), resultados similares aos aqui obtidos. Vale frisar que este é o primeiro relato de *T. neokoningii* atuando no biocontrole de fitopatógenos.

Antagonistas que destroem escleródios no solo e previnem os sintomas em tecidos de plantas são considerados eficientes ACBs (Abdullah et al., 2008). *Trichoderma* spp. são eficientes em controlar *S. sclerotiorum* na parte aérea (Abdullah et al., 2008; Ojaghian, 2011; Rabeendran et al., 2006; Zeng et al., 2012a). A eficiência em reduzir infecções de folíolos correlacionou-se à eficiência em reduzir infecções de hastes destacadas de feijoeiro: *T. harzianum* (IM2, UN6, UN8, UN26, UN28), *T. koningiopsis* (UN33) e *T. atroviride* (VI3) inibiram em 100% a infecção dos folíolos destacados. O campo de infecção de *S. sclerotiorum* é a flor senescente, que serve como fonte exógena de nutrientes para que o ascósporo inicie a infecção e colonize órgãos como folhas, hastes e vagens em formação (Boland and Hall, 1994). Assim, isolados que possam proteger estes órgãos também teriam papel importante no manejo integrado do mofo branco.

O isolado IM2 de *T. harzianum* foi o mais eficiente em inibir a infecção de hastes destacadas, seguido dos isolados IM1, IM4, IM14, UN8, UN31 e UN32. Todos são isolados de *T. harzianum*, espécie de *Trichoderma* mais estudada no biocontrole de fitopatógenos. Com a metodologia adotada nas hastes destacadas, houve fermentos drásticos nos tecidos do hospedeiro, o que pode ter favorecido o maior desenvolvimento da doença. Por outro lado, no ensaio com folíolos destacados, a eficiência de controle foi maior e se selecionou maior número de isolados. *Trichoderma harzianum* tem potencial como ACB do mofo branco, pois cresceu rapidamente, foi um micoparásita eficiente, inibiu as germinações miceliogênica e carpogênica de escleródios e a infecção da parte aérea, o que já foi demonstrado: *T. harzianum* T-22 reduziu o número de escleródios de *S. sclerotiorum* no solo em 70,8% e a severidade da doença em lavoura de soja em 38,5% (Zeng et al., 2012a). Em casa de vegetação, *T. koningii*, *T. virens*, *T. ceramicum* e *T. viridescens* foram eficientes em reduzir a severidade da podridão da batata causada por *S. sclerotiorum*, e no campo, *T. viridescens* e *T. ceramicum* foram os mais eficientes (Ojaghian, 2011). *Trichoderma harzianum* inibiu o crescimento, produção de micélio e de escleródios de *S. sclerotiorum*, condições *in vitro* e *in vivo* (Abdullah

et al., 2008). Para os autores, houve proteção de mais de 80% das mudas de tomate, abóbora e berinjela inoculadas, com eficácia semelhante ou ligeiramente menor à de dois fungicidas, dependendo da cultura.

Atualmente, para aumentar a efetividade do biocontrole, há tendência de se aplicar mistura de microrganismos compatíveis (Jain et al., 2012). Formulações contendo vários organismos podem ser mais eficientes em controlar doenças de plantas que aquelas com apenas um (Stockwell et al., 2011). Considerando-se os isolados de *Trichoderma* spp. que foram mais eficientes no presente trabalho, seria interessante testá-los quanto à compatibilidade para uso em mistura. Escande et al. (2002) testaram uma mistura de seis isolados, incluindo *T. koningii*, *T. aureoviride* e *T. longibrachiatum*, e a formulação foi eficiente em reduzir a incidência da podridão de esclerotinia em girassol, reduzindo a incidência da doença até a maturação em ambientes altamente favoráveis ao desenvolvimento da doença. Portanto, há que se avaliar formulação(ões) contendo os isolados aqui selecionados.

Considerando-se a importância do mofo branco do feijoeiro e a eficiência dos isolados de *Trichoderma* spp., o uso destes antagonistas no manejo da doença pode possibilitar a redução do número de aplicações de fungicidas ou mesmo sua eliminação, dependendo das condições ambientais, severidade da doença na área e outras técnicas de manejo empregadas (Pomella and Ribeiro, 2009). No ciclo de vida de *S. sclerotiorum* há duas fases de maior importância: sobrevivência e infecção. Neste estudo, destacam-se os isolados UN34 e IM2 de *T. harzianum*, o primeiro por reduzir a sobrevivência, micoparasitando os escleródios e inibindo as germinações miceliogênica e carpogênica, e o segundo por reduzir as infecções de folíolos e hastes. Os resultados aqui obtidos são preliminares e, a partir desta seleção, os isolados mais eficientes devem ser testados em campo, separadamente e em misturas, para se explorar o seu potencial como ACBs de *S. sclerotiorum* em feijoeiro.

## 6. CONCLUSÕES

- I. Obtiveram-se 48 isolados de *Trichoderma* spp., classificados em oito espécies: 29 de *T. harzianum*; cinco de *T. koningiopsis*; quatro de *T. hamatum*; quatro de *T. atroviride*; dois de *T. asperelloides*; dois de *T. longibrachiatum*; um de *T. asperellum* e um de *T. neokoningii*.
- II. Oito isolados: cinco de *T. harzianum*, um de *T. koningiopsis*, e dois de *T. asperelloides*, inibiram 100% do crescimento de *S. sclerotiorum* em teste de pareamento de culturas.
- III. Vinte e quatro isolados: 23 de *T. harzianum* e um de *T. asperelloides* micoparasitaram os escleródios de *S. sclerotiorum* de 79 a 99%.
- IV. Trinta e um isolados: 27 de *T. harzianum*, três de *T. hamatum* e um de *T. longibrachiatum* inibiram a germinação miceliogênica dos escleródios de 78 a 100%.
- V. Sete isolados: cinco de *T. koningiopsis*, um de *T. neokoningii* e um de *T. harzianum* inibiram a germinação carpogênica dos escleródios de 85 a 99%.
- VI. Sete isolados: cinco de *T. harzianum*, um de *T. koningiopsis* e um de *T. atroviride* inibiram a infecção de folíolos de feijoeiro em 100%.
- VII. O isolado IM2 de *T. harzianum* inibiu a infecção de haste destacadas de feijoeiro em 79%.
- VIII. *Trichoderma* spp. são potenciais agentes de biocontrole de *S. sclerotiorum* em feijoeiro, principalmente os isolados UN34 e IM2 de *T. harzianum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abawi, G.S., Grogan, R.G., 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69, 899-904.
- Abd-Elmagid, A., Garrido, P.A., Hunger, R., Lyles, J.L., Mansfield, M.A., Gugino, B.K., Smith, D.L., Melouk, H.A., Garzon, C.D., 2013. Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus *Sclerotinia*. *Journal of Microbiological Methods* 92, 293-300.
- Abdullah, M.T., Ali, N.Y., Suleman, P., 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 27, 1354-1359.
- Adams, P., Ayers, W., 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69, 896-899.
- Bae, Y.S., Knudsen, G.R., 2007. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Applied Soil Ecology* 35, 21-24.
- Bardin, S.D., Huang, H.C., 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, pp. 88-98.
- Bell, D., Wells, H., Markham, C., 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72, 379-382.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7, 249-260.
- Boland, G., Hall, R., 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16, 93-108.
- Bolton, M.D., Thomma, B.P., Nelson, B.D., 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7, 1-16.
- Castillo, F.D., Padilla, A.M., Morales, G.G., Siller, M.C., Herrera, R.R., Gonzales, C.N., Reyes, F.C., 2011. In vitro antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Science* 6, 410-417.
- Chen, Y., Wang, D., 2005. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 89, 1268-1272.
- Clarkson, J.P., Phelps, K., Whipps, J.M., Young, C.S., Smith, J.A., Watling, M., 2004. Forecasting sclerotinia disease on lettuce: Toward developing a prediction model for carpogenic germination of sclerotia. *Phytopathology* 94, 268-279.
- Cook, R.J., Baker, K.F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society. 539 pp.
- Druzhinina, I., Kubicek, C.P., 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science B* 6, 100-112.
- Escande, A., Laich, F., Pedraza, M., 2002. Field testing of honeybee-dispersed *Trichoderma* spp. to manage sunflower head rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Plant Pathology* 51, 346-351.
- Héreau, F.M., Hallett, S.G., Weller, S.C., 2005. Combining *Trichoderma virens*-inoculated compost and a rye cover crop for weed control in transplanted vegetables. *Biological Control* 34, 21-26.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., Bissett, J., 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropical regions. *Fungal Genetics and Biology* 46, 615-631.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., Bissett, J., 2009b. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control* 51, 409-416.

- Jain, A., Singh, S., Kumar Sarma, B., Bahadur Singh, H., 2012. Microbial consortium-mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology* 112, 537-550.
- Jaklitsch, W., Voglmayr, H., 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80, 1-87.
- Johnson, D.A., Atallah, Z.K., 2006. Timing fungicide applications for managing *Sclerotinia* stem rot of potato. *Plant disease* 90, 755-758.
- Klein, D., Eveleigh, D., 1998. Ecology of *Trichoderma*. *Trichoderma and Gliocladium. Basic biology, taxonomy and genetics*, 300 pp.
- Lehner, M.S., 2015. Analysis of the population of *Sclerotinia sclerotiorum* causing white mold on common bean in Brazil. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, pp. 87.
- Lehner, M.S., Paula Júnior, T.J., Hora Júnior, B.T., Teixeira, H., Vieira, R.F., Carneiro, J.E.S., Mizubuti, E.S.G., 2015. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. *Plant Pathology* 64, 921-931.
- Lopes, F.A.C., Steindorff, A.S., Geraldine, A.M., Brandao, R.S., Monteiro, V.N., Lobo, M., Coelho, A.S.G., Ulhoa, C.J., Silva, R.N., 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* 116, 815-824.
- Mueller, D., Dorrance, A., Derksen, R., Ozkan, E., Kurle, J., Grau, C., Gaska, J., Hartman, G., Bradley, C., Pedersen, W., 2002. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. *Plant disease* 86, 26-31.
- Mukhtar, I., Hannan, A., Atiq, M., Nawaz, A., 2012. Impact of *Trichoderma* species on seed germination in soybean. *Pakistan Journal of Phytopathology* 24, 159-162.
- Ojaghian, M.R., 2011. Potential of *Trichoderma* spp. and *Talaromyces flavus* for biological control of potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytoparasitica* 39, 185-193.
- Petzoldt, R., Dickson, M.H., 1996. Straw test for resistance to white mold. *Annual Report of Bean Improvement Cooperative* 39, 142-143.
- Pomella, A.W.V., Ribeiro, R.T.S., 2009. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas- Uma visão empresarial. In: Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 341 pp.
- Purdy, L.H., 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host ranges, geographic distribution and impact. *Phytopathology* 69, 875-880.
- Rabeendran, N., Jones, E.E., Moot, D.J., Stewart, A., 2006. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. *Biological Control* 39, 352-362.
- Rodriguez, M.A., Cabrera, G., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N., Godeas, A., 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1177-1186.
- Ruiz, H.A., Ferreira, G.B., Pereira, J.B.M., 2003. Estimativa da capacidade de campo de Latossolos e Neossolos Quartzarênicos pela determinação do equivalente de umidade. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 27, 389-393.
- Santamaría, J., Bayman, P., 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* 50, 1-8.
- Schwartz, H., Steadman, J., 1978. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 68, 383-388.
- Singh, S.P., Schwartz, H.F., 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: A review. *Crop Science* 50, 2199-2223.

- Smith, A., Beltrán, C., Kusunoki, M., Cotes, A., Motohashi, K., Kondo, T., Deguchi, M., 2013. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of General Plant Pathology* 79, 74-85.
- Steadman, J.R., 1983. White mold - a serious yield - limiting disease of bean. *Plant disease* 67, 346-350.
- Steadman, J.R., Powers, K., Higgins, B., 1997. Screening common bean for white mold resistance using detached leaves. *Annual Report of Bean Improvement Cooperative* 40, 140-141.
- Stockwell, V., Johnson, K., Sugar, D., Loper, J., 2011. Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. *Phytopathology* 101, 113-123.
- Tančić, S., Skrobonja, J., Lalošević, M., Jevtić, R., Vidić, M., 2013. Impact of *Trichoderma* spp. on soybean seed germination and potential antagonistic effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesticidi i Fitomedicina* 28, 181-185.
- Troian, R.F., Steindorff, A.S., Ramada, M.H.S., Arruda, W., Ulhoa, C.J., 2014. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters* 36, 2095-2101.
- Tu, J.C., 1988. The role of white mold - infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of Phytopathology* 121, 40-50.
- Vieira, R.F., Paula Júnior, T.J., Carneiro, J.E.S., Teixeira, H., Queiroz, T.F.N., 2012. Management of white mold in type III common bean with plant spacing and fungicide. *Tropical Plant Pathology* 37, 91-101.
- Xia, X.M., Lie, T.K., Qian, X.M., Zheng, Z.H., Huang, Y.J., Shen, Y.M., 2011. Species Diversity, Distribution, and Genetic Structure of Endophytic and Epiphytic *Trichoderma* Associated with Banana Roots. *Microbial Ecology* 61, 619-625.
- Xie, J., Song, L., Li, X., Wu, Q., Wang, C., Xu, H., Cao, Y., Qiao, D., 2013. Isolation and identification of oleaginous endophytic fungi. *African Journal of Microbiology Research* 7, 2014-2019.
- Zeng, W., Kirk, W., Hao, J., 2012a. Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control* 60, 141-147.
- Zeng, W., Wang, D., Kirk, W., Hao, J., 2012b. Use of *Coniothyrium minitans* and other microorganisms for reducing *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 60, 225-232.
- Zhou, F., Liang, H.-J., Di, Y.-L., You, H., Zhu, F.-X., 2014. Stimulatory effects of sublethal doses of dimethachlon on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant disease* 98, 1364-1370.