

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Marisa Ana Strahl

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA O BIOCONTROLE DE
Machophomina phaseolina (Tassi) Goid. EM FEIJOEIRO**

Santa Maria, RS

2022

Marisa Ana Strahl

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA O BIOCONTROLE DE
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. EM FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria /RS (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau em Mestre em Agronomia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS

2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Strahl , Marisa Ana
MICROENCAPSULAÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA O
BIOCONTROLE DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. EM
FEIJOEIRO / Marisa Ana Strahl .- 2022.
51 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fatima Brião Muniz
Coorientadora: Alessandro Dal'col Lucio
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2022

1. Controle biológico. Liofilização. Antagonistas.
Microencapsulamento. I. Brião Muniz, Marlove Fatima II.
Dal'col Lucio, Alessandro III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

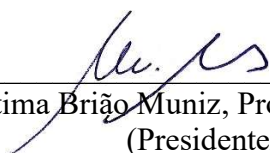
Declaro, MARISA ANA STRAHL , para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Marisa Ana Strahl

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA O BIOCONTROLE DE
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. EM FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
Universidade Federal de Santa Maria /RS
(UFSM), como requisito parcial para obtenção do
grau em **Mestre em Agronomia**


Aprovada em 26 de abril de 2022:



Marlove Fatima Brião Muniz, Prof^a Dr^a (UFSM) (Videoconferência)
(Presidente/Orientadora)



Júlio Carlos Pereira da Silva, Prof Dr (UFSM) (Videoconferência)



Leonardo Fernandes Fraceto, Prof Dr (UNESP) (Videoconferência)

Santa Maria, RS

2022

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força para superar todos os desafios.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelo acolhimento e oportunidades oferecidas, bem como a todos professores que fizeram parte da minha formação e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dr^a Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação e confiança em meu trabalho, pelos aprendizados e contribuições para o meu crescimento profissional e pessoal, o meu muito obrigada.

Aos professores membros da banca, Dr. Júlio Carlos Pereira da Silva e Dr. Leonardo Fernandes Fraceto por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À professora Dr^a Emanuele Junges, por aceitar participar como membro suplente desta banca, bem como pelo seu apoio durante toda minha formação e amizade.

Aos meus pais, Nelvia Nair Strahl e Aimbart Strahl, minha irmã Marcia N. S. Löbler e meu cunhado Marcos A. Löbler, por serem a minha inspiração de todos os dias, meus exemplos de caráter, dedicação e perseverança. Obrigada pelo amor, pelo carinho, pela confiança. Pelo apoio e por estarem juntos comigo nesta caminhada. Amo vocês!

Ao meu namorado e companheiro Fabrício Carvalho, que sempre me acolheu em todos os momentos difíceis, por toda sua compreensão, amor, carinho, por ser meu amigo, por não me deixar desistir de mim e dos meus sonhos e por participar na realização desse trabalho, meu muito obrigada!

À equipe de trabalho do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, agradeço pela disponibilidade e auxílio no desenvolvimento dos experimentos, pela troca de conhecimentos, pela parceria e amizade, vocês foram fundamentais para a conclusão deste projeto.

Muito obrigada!

RESUMO

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA O BIOCONTROLE DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. EM FEIJOEIRO.

AUTORA: Marisa Ana Strahl

ORIENTADORA: Marlove Fátima Brião Muniz

A demanda pelo uso de produtos para uma agricultura sustentável, com um menor impacto no ambiente tem sido cada vez maior. Desta forma, o controle biológico de doenças é uma alternativa para reduzir o uso dos agrotóxicos. Os fungos do gênero *Trichoderma* spp. são um exemplo de controle biológico eficaz contra o patógeno *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão cinzenta da haste, a qual atinge diversas culturas, entre elas o feijoeiro. Este patógeno habitante de solo é de difícil controle por produzir estruturas de resistência que lhes permite sobreviver no solo por um longo período de tempo. Porém, a utilização de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico pode encontrar alguns problemas como, por exemplo, estresse por fatores bióticos e abióticos. Uma possível solução para esse tipo de problema é a utilização de técnicas de microencapsulação dos agentes de biocontrole. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação dos isolados de *Trichoderma* spp. através da utilização da suspensão e formulações microencapsuladas a partir da técnica de liofilização no biocontrole *in vitro* e *in vivo* de *Macrophomina phaseolina* e promoção de crescimento em plantas de feijoeiro. Para tanto, foram utilizados quatro isolados de *Trichoderma* spp., dois provenientes de formulação comercial à base de *Trichoderma harzianum*, *T. virens* isolado de solo rizosférico de feijoeiro e *T. asperellum* isolado de solo rizosférico de pomares de citrus, e um isolado fitopatogênico de *M. phaseolina*. Analisou-se a ação antagonica de *Trichoderma* spp. na forma de suspensão e formulação microencapsulada sobre *M. phaseolina* através do pareamento de culturas e metabólitos voláteis *in vitro*. Após, selecionou-se os isolados com menores índices de crescimento micelial para seguimento dos estudos *in vivo*. Os isolados, com e sem formulação microencapsulada foram utilizados no tratamento de sementes para avaliação a promoção de crescimento de plantas. Para avaliar o controle da doença, foi realizada a aplicação da formulação microencapsulada, bem como a suspensão dos antagonistas no tratamento de sementes, e a inoculação do patógeno foi realizada via substrato. Os isolados de *Trichoderma* spp. tanto na forma de suspensão, bem como a formulação microencapsulada foram eficientes em controlar o crescimento micelial de *M. phaseolina* tanto no pareamento de culturas como por metabólitos voláteis. A aplicação de *Trichoderma* spp., *in vivo* ou formulação microencapsulada via tratamento de sementes, foi capaz de controlar o patógeno responsável pela podridão cinzenta da haste. Os isolados microencapsulados apresentaram efeito positivo sob o crescimento de raízes e área foliar. A técnica de microencapsulamento não interferiu na ação do antagonista no biocontrole de *M. phaseolina* nos testes *in vitro*, bem como também nos testes *in vivo*.

Palavras chave: Controle biológico. Liofilização. Antagonistas. Microencapsulamento.

ABSTRACT

MICROENCAPSULATION OF *Trichoderma* spp. FOR THE BIOCONTROL OF *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. IN BEAN PLANT.

AUTHOR: Marisa Ana Strahl

ADVISOR: Marlove Fátima Brião Muniz

The demand for the use of products for sustainable agriculture, with a lower impact on the environment has been increasing. In this way, the biological control of diseases is an alternative to reduce the use of pesticides. Fungi of the genus *Trichoderma* spp. are an example of effective biological control against the pathogen *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of gray stem rot, which affects several crops, including common bean. This soil-dwelling pathogen is difficult to control because it produces resistance structures that allow them to survive in the soil for a long period of time. However, the use of *Trichoderma* spp. as a biological control agent, it may encounter some problems, such as stress caused by biotic and abiotic factors. A possible solution to this type of problem is the use of microencapsulation techniques for biocontrol agents. Given the above, the objective of this work was to evaluate the action of *Trichoderma* spp. through the use of suspension and microencapsulated formulations from the lyophilization technique in the *in vitro* and *in vivo* biocontrol of *Macrophomina phaseolina* and growth promotion in bean plants. For this purpose, four isolates of *Trichoderma* spp. were used, two from a commercial formulation based on *Trichoderma harzianum*, *T. virens* isolated from rhizospheric soil of common bean and *T. asperellum* isolated from rhizospheric soil of citrus orchards, and a phytopathogenic isolate from *M. phaseolina*. The antagonistic action of *Trichoderma* spp. in the form of suspension and microencapsulated formulation on *M. phaseolina* through the pairing of cultures and volatile metabolites *in vitro*. Afterwards, the isolates with lower mycelial growth rates were selected for follow-up of the *in vivo* studies. The isolates, with and without microencapsulated formulation, were used in seed treatment to evaluate plant growth promotion. To evaluate the control of the disease, the application of the microencapsulated formulation was carried out, as well as the suspension of the antagonists in the seed treatment, and the inoculation of the pathogen was carried out via substrate. *Trichoderma* spp. both in the form of suspension, as well as the microencapsulated formulation, were efficient in controlling the mycelial growth of *M. phaseolina* both in the pairing of cultures and by volatile metabolites. The application of *Trichoderma* spp., *in vivo* or microencapsulated formulation via seed treatment, was able to control the pathogen responsible for gray stem rot. The microencapsulated isolates showed a positive effect on root growth and leaf area. The microencapsulation technique did not interfere in the action of the antagonist in the biocontrol of *M. phaseolina* in the *in vitro* tests, as well as in the *in vivo* tests.

Keywords: Biological control. Lyophilization. Antagonists. Microencapsulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Sintomas de podridão-cinzenta-da-haste em plantas de feijoeiro sem e com o tratamento de sementes com <i>Trichoderma</i> spp.	33
FIGURA 2 - Plantas de feijoeiro sadias tratadas com <i>Trichoderma</i> spp. na presença e ausência do patógeno.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição dos tratamentos de acordo com a aplicação do antagonista nas sementes e inoculação do patógeno via substrato.	26
TABELA 2 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e percentual de inibição de crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> confrontada com <i>Trichoderma</i> spp. no teste de pareamento de culturas.	29
TABELA 3 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e percentual de inibição de crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> confrontada com <i>Trichoderma</i> spp. no teste de metabólitos voláteis.	30
TABELA 4 - Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) em plantas de feijoeiro, cultivar IAC Veloz, tratadas com suspensão e formulação liofilizada de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste causada por <i>M. phaseolina</i>	32
TABELA 5 - Índice de doença (ID) aos 10 dias após a semeadura de plantas de feijoeiro, cultivar IAC Veloz, tratadas com suspensão e formulação liofilizada de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste causada por <i>M. phaseolina</i>	35
TABELA 6 - Índice de doença (ID) aos 20 dias após a semeadura de plantas de feijoeiro, cultivar IAC Veloz, tratada com suspensão e formulação liofilizada de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste causada por <i>M. phaseolina</i>	36
TABELA 7 - Atividade biológica do suspensão e formulação liofilizada de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste causada por <i>M. phaseolina</i> sobre plantas de feijoeiro da cultivar IAC Veloz quanto ao comprimento de raiz.	36
TABELA 8 - Promoção de crescimento do suspensão e formulação liofilizada de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste por <i>M. phaseolina</i> sobre plantas de feijoeiro, cultivar IAC Veloz, quanto a massa seca de raiz.	38
TABELA 9 - Promoção de crescimento do suspensão e formulação liofilizada de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste por <i>M. phaseolina</i> sobre plantas de feijão-comum, cultivar IAC Veloz, quanto a área foliar.	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO	13
2.2 DOENÇAS NA CULTURA DO FEIJOEIRO	14
2.3 PODRIDÃO-CINZENTA-DA-HASTE	15
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PLANTAS	16
2.5 GÊNERO <i>Trichoderma</i> spp.....	17
2.6 MICROENCAPSULAÇÃO DE AGENTES BIOLÓGICOS.....	19
2.6.1 Microencapsulação por Liofilização (<i>Freeze drying</i>).....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	21
3.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	21
3.2.1 Origem e caracterização dos microrganismos	21
3.2.2 Suspensão de esporos de <i>Trichoderma</i> spp.....	22
3.2.3 Microencapsulação de <i>Trichoderma</i> spp. pelo método de liofilização.....	22
3.2.4 Avaliação do pareamento de culturas	23
3.2.5 Avaliação de metabólitos voláteis	25
3.3 ENSAIO <i>IN VIVO</i>	25
3.3.1 <i>Trichoderma</i> spp. na redução da severidade de <i>M. phaseolina</i> e no crescimento de plantas de feijoeiro	26
3.3.2 Aplicação dos antagonistas via tratamento de sementes.....	26
3.3.3 Inoculação do patógeno via substrato	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	29
4.1.1 Pareamento de culturas e metabólitos voláteis	29
4.2 ENSAIO <i>IN VIVO</i>	31
4.2.1 <i>Trichoderma</i> spp. na redução da severidade de <i>M. phaseolina</i> e promoção de crescimento em feijoeiro.....	31
5. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) se caracteriza por ser um dos principais alimentos presente na mesa dos brasileiros, com grande relevância social e econômica (SOUZA e ALCANTRA, 2020). Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2021), o Brasil ocupa o terceiro lugar como maior produtor mundial de feijão-comum, sua produção ocorre em pequena e grande escala, os sistemas de cultivo diferem entre as regiões, porém a maior parte da produção é realizada por pequenos agricultores familiares que possuem baixa aplicação de tecnologias de nutrição e controle de pragas e patógenos (PEREIRA et al., 2014; AGUIAR, 2018).

As doenças estão entre os principais fatores que interferem na produtividade da cultura, com destaque para aquelas causadas por patógenos habitantes de solo. O complexo de patógenos radiculares reduz a eficiência do uso de nutrientes e eleva os custos de produção, reduzindo a rentabilidade (JUNIOR et al., 2004). Dentre os patógenos de importância epidemiológica que podem comprometer a produção e a qualidade das sementes de feijão, está o fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., causador da podridão cinzenta da haste (WENDLAND et al., 2016).

Macrophomina phaseolina é considerado um dos fungos mais importantes e destrutivos patógenos necrotróficos habitantes de solos, podendo infectar mais de 500 espécies de plantas (GUPTA et al., 2012), causando redução da produtividade e do rendimento do feijoeiro (WENDLAND et al., 2016). Além disso, patógenos como *M. phaseolina* apresentam produção de microescleródios que podem sobreviver no solo por um longo período de tempo, estas estruturas de resistência podem permanecer na superfície ou sob o solo, tornando-se assim uma doença de difícil controle com uso de produtos químicos, como fungicidas. Dessa forma, o controle desse fitopatógeno se torna uma prática imprescindível para a produção de sementes de boa qualidade, para o bom estabelecimento das plantas no campo e para manter altas produtividades da cultura.

Nesse contexto, o controle biológico surge como excelente aliado no controle de algumas doenças, em que diversas espécies de *Trichoderma* têm sido utilizadas como agentes ativos em formulações de biocontrole e biofertilizantes (YASSIN et al., 2021; ESLAHI et al., 2021; JI et al., 2021). Esses fungos agem por diferentes mecanismos de ação, como o micoparasitismo, competição, antibiose (VINALE et al., 2008), por indução de mecanismos de

defesa, como vias de resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) (MAYO et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Com o aumento da demanda por produtos biológicos, surgem alguns obstáculos na comercialização dos mesmos, como o desenvolvimento de produtos formulados que sejam estáveis ao armazenamento e que retenham eficiência similar àquela das células frescas do agente de biocontrole. Alguns métodos de preservação de culturas são baseados na redução da taxa metabólica dos organismos pela remoção da água disponível. A desidratação do produto permite a preservação do inóculo por longo período de tempo com alta viabilidade (LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2003).

Produtos à base *Trichoderma* spp. são formulados a partir de esporos vivos. Por este motivo as condições de armazenamento são de extrema importância, como refrigeração a temperaturas inferiores à 28 °C e as aplicações realizadas à campo em condições de alta umidade relativa (MACHADO et al., 2012). Portanto, há a necessidade de protegê-lo das adversidades causadas por fatores bióticos e abióticos, garantindo assim seu manuseio e permanência no campo, bem como utilizar tecnologias que permitam o aumento da eficiência, tempo de prateleira e maior garantia de sua aplicabilidade, além de garantir uma maior eficiência no controle de doenças. Sendo assim, uma possível solução é a utilização de microencapsulação destes materiais. A microencapsulação consiste na criação de uma barreira física que protege os ingredientes ativos de fatores externos (PAULO e SANTOS, 2017), como a proteção contra a radiação ultravioleta, oxidação e altas temperaturas (SRI.S et al., 2012).

As formulações podem ser realizadas por diferentes métodos, incluindo preparações líquidas e secas. Em comparação com as formas líquidas, os produtos secos obtidos por spray-drying, secagem com secadores de leito fluidizado ou liofilização e secagem a vácuo são mais viáveis devido à capacidade de armazenamento, transporte e capacidade de produzir grandes quantidades de produtos secos a baixo custo (VILA et al., 2017).

Dessa forma, na presente pesquisa objetivou-se obter e avaliar as formulações microencapsuladas por liofilização, bem como averiguar a ação dos isolados de *Trichoderma* spp., antes e após o processo de liofilização no biocontrole *in vitro* e *in vivo* de *Macrophomina phaseolina* e no crescimento de plantas de feijoeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, subfamília Faboideae. Dentre as diversas espécies cultivadas, tornou-se a mais importante, por se tratar da mais antiga e também mais utilizada (SANTOS; GAVILANES, 2011).

Esta cultura faz parte da alimentação humana e animal, contribuindo como uma importante fonte de proteína para a dieta em todo mundo. O feijoeiro é uma cultura distribuída em muitos países, presente em diversos sistemas de produção, em propriedade de pequeno, médio e grande porte (FAOSTAT, 2019). Em termos de produção mundial, a média é de 23,3 milhões de toneladas de feijão seco. Em 2015 o Brasil foi considerado o terceiro maior produtor mundial, respondendo por 11% da produção, atrás da Índia (14%) e Myanmar (13%) e à frente dos Estados Unidos (4%), da China, do México (4%) e da Tanzânia (3%) (LANDAU et al., 2020).

Dentre os estados brasileiros que cultivam o feijão destacam-se os estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo e Goiás. A produção possui certa sazonalidade, o que se traduz em três safras bem distintas no mesmo ano. No Brasil, na safra 2019/2020 a área cultivada alcançou 2.926,7 mil hectares, com uma produtividade de 3.564 kg por hectare e uma produção de 3.222,1 milhões de toneladas, volume 6,8% superior ao produzido na safra anterior (CONAB, 2021).

O feijoeiro é uma planta sensível à ação tanto de fatores edafoclimáticos abióticos, quanto de organismos vivos, bióticos, proporcionando oscilações no rendimento produtivo (FANCELLI e NETO, 2007). O mesmo autor destaca a problemática de cultivos sucessivos ao longo dos anos nas mesmas regiões, bem como utilização de sistemas de cultivo irrigado sem adoção de práticas culturais adequadas, como rotação de culturas, aliado ainda ao uso excessivo de agrotóxicos, os quais provocam desequilíbrio do agroecossistema, com isso, há a eliminação de organismos que agem como inimigos naturais, contribuindo para o aumento e disseminação de patógenos nas áreas de cultivo e persistência dos mesmos.

Apesar do feijoeiro apresentar uma ampla adaptação edafoclimática, caracterizada pela possibilidade do seu cultivo em até três safras durante o ano em uma grande parte do Brasil (MENEZES, 2001), há interferências de ordem abiótica que podem influenciar a sua produção.

Dentre os fatores abióticos tem como principais a radiação solar, que exerce influência direta na taxa de fotossíntese das plantas (DIDONET; SILVA, 2004), a precipitação, que pode variar entre 300 e 500 mm e a temperatura ao longo do ciclo da cultura para as diferentes regiões brasileiras, podendo reduzir em torno de 60% o percentual de rendimento de algumas cultivares de feijoeiro, quando submetido ao déficit hídrico (SILVEIRA et al., 2001).

Entre os principais fatores que provocam baixas produtividades na cultura têm-se fatores abióticos tais como temperatura, vento, precipitação, fotoperíodo e radiação solar e os fatores bióticos caracterizados pela interferência de microrganismos fitopatogênicos principalmente por fungos, bactérias e vírus. No feijoeiro, grande parte dos patógenos fúngicos podem ser transmitidos e/ou transportados pelo uso de sementes não certificadas ou pelos grãos, o que pode prejudicar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes e conseqüentemente resultar em baixos níveis de produtividade da cultura (ROHRIG, 2016; BARBOSA E GONZAGA, 2012).

Entre os principais fitopatógenos que acometem a cultura está *Macrophomina phaseolina*, que causa a podridão-cinzenta-da-haste. Este patógeno habitante de solo é um fungo complexo e de difícil controle em função das suas estruturas de resistência, que podem permanecer por longos períodos nas áreas de cultivo (BARBOSA E GONZAGA, 2012).

2.2 DOENÇAS NA CULTURA DO FEIJOEIRO

As doenças estão entre os principais fatores que reduzem a produção da cultura, uma vez que o feijoeiro pode ser hospedeiro de inúmeros patógenos, sendo eles fungos, bactérias, vírus ou nematoides (RIBEIRO, et al., 2011). Condições como temperatura e umidade, associados à agressividade dos agentes causais e à suscetibilidade de cultivares, são determinantes para a ocorrência de doenças. As perdas de produção devido às doenças são geralmente altas, inúmeras causam danos severos nas plantas, resultando em reduções superiores a 50% na produção, e em alguns casos chegam a ocasionar perdas totais, caso não sejam aplicadas medidas de controle adequadas (COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 2012).

Com a intensificação de cultivos, ocorreu um aumento na pressão de doenças no campo. Os sistemas de produção adotados no Brasil, em áreas de sequeiro ou áreas irrigadas, possuem

condições favoráveis para o desenvolvimento de um complexo de patógenos de ampla gama de hospedeiros e que sobrevivem no solo, podendo inviabilizar o cultivo do feijão (JUNIOR et al., 2004).

Dentre as doenças com maior potencial epidemiológico, se destacam as doenças fúngicas, as quais são responsáveis pela maior parte das doenças que ocorrem na cultura do feijão e são divididas em doenças causadas por patógenos de parte aérea e habitantes de solo. Os patógenos de parte aérea se caracterizam por apresentar seus sintomas manifestados nas hastes, cotilédones, vagens, sementes, mas principalmente nas folhas. Estes patógenos não possuem capacidade de sobreviver no solo, assim, ao destruir os restos culturais, tendem a desaparecer das áreas de cultivo (RIBEIRO et al., 2015; BIANCHINI, MARINGONI E CARNEIRO, 2005).

Já para os patógenos habitantes de solo, são observados sintomas na raiz, no colo, no caule, na forma de manchas encharcadas estendendo-se a podridões, resultando na clorose, desfolha precoce e murcha, podendo levar a planta a seca total (MANOS; OLIVEIRA; MARTINS, 2013). As doenças causadas por esses patógenos são de difícil controle, isso ocorre em razão destes patógenos possuírem estruturas de resistência, que lhes permite a viabilidade durante vários anos no solo, mesmo com a ausência do hospedeiro. Para Barbosa e Gonzaga (2012), as perdas na produção em decorrência desses patógenos podem chegar a 100%, tanto de forma indireta através do aumento do custo de produção, ou diretamente inviabilizando os cultivos comerciais.

2.3 PODRIDÃO-CINZENTA-DA-HASTE

A podridão cinzenta da haste causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. manifesta-se, principalmente, em condições de estresse hídrico, em períodos mais quentes e dificilmente é observada em períodos de chuvas ou em cultivos irrigados (WENDLAND et al., 2016).

Macrophomina phaseolina é um fungo polífago e possui diversas plantas hospedeiras, como o milho, soja, sorgo dentre outras. Os sintomas apresentam-se inicialmente com lesões irregulares na haste da planta, de cor escura e pouco deprimidas (DHINGRA E SINICALIR, 1978). As plântulas podem ser infectadas tanto pela germinação dos microescleródios (estrutura de resistência) em períodos de estresse hídrico, bem como as sementes podem carregar o

patógeno e posteriormente transmitir para a plântula. A presença do fungo nas sementes resulta na ocorrência de *damping-off* de pré-emergência, reduzindo assim o estabelecimento de plântulas (MENEZES et al., 2004). As principais formas de disseminação são as sementes contaminadas, além disso, implementos agrícolas, a água de irrigação, o vento e os animais, também podem atuar na disseminação (FIALHO; PAPA; CERESINI, 2015).

A ocorrência da doença depende de condições específicas como, temperaturas elevadas por vários dias consecutivos e associada a baixa umidade (FIALHO; PAPA; CERESINI, 2015). Há relatos da presença desse patógeno na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, sendo considerada uma das principais doenças da cultura do feijoeiro. Em áreas com ocorrência deste patógeno, as perdas na produção podem ser significativas, especialmente em anos com altas temperaturas, solos com baixa umidade e compactados, o que é frequentemente observado nesta região (KOTZ et al., 2016). Em áreas no município de Lages-SC este patógeno também foi o principal agente causal de podridões radiculares na cultura, quando associado a monocultura intensificou-se a ocorrência de podridões radiculares (VIEIRA JR et., 2017).

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PLANTAS

Nas últimas décadas a sociedade mundial passou a ter grande preocupação com os impactos causados pelo uso dos agrotóxicos no meio ambiente e pela contaminação de alimentos. O uso excessivo de agrotóxicos na agricultura visando o controle de doenças de plantas tem resultado diversos problemas, tanto para o meio ambiente como para os seres humanos. A contaminação de alimentos, solo e água são um dos principais motivos que podem ser destacados (CARVALHO, 2006; POPP et., 2013).

Estas mudanças fizeram com que o cenário agrônomo desenvolvesse novos mecanismos de ação e iniciasse novos mercados. Dentre estes novos mercados, métodos como o controle biológico destacam-se por diminuir a incidência e/ou a severidade de doenças, além de contribuir significativamente para a redução do uso de fungicidas químicos (POPP et., 2013; AMORIM et al., 2018).

Muitos estudos já foram apresentados sobre as princípios, vantagens e desvantagens do controle biológico (HOKKANEN, 1985; WAAGE, 1997; GURR & WRATTEN, 2000; POPP et al., 2013; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; CARVALHO et al, 2014; MA et al.,

2015; BAE et al., 2016; SAWANT et al., 2017). Estratégias para o controle de patógenos de solo, tais como tratamento químico de sementes, resistência genética e rotação de culturas, resultam em redução do inóculo do fitopatógeno, porém apresentam baixa eficiência (TOMAZELI; SANTOS; MORALES, 2011). Assim, conforme Monteiro (2013) Pearson e Callaway (2003) destacam a possibilidade da utilização do controle biológico, podendo este ser associado a outros métodos de controle, possibilitando desta forma uma maior segurança alimentar e constituindo-se assim uma importante alternativa de manejo.

Entre os microrganismos antagonistas com grande potencial no controle biológico destacam-se os fungos filamentosos. Quando comparados a outras formas de controle biológico, seja com o uso de bactérias produtoras de toxinas, protozoários e vírus, os fungos possuem vantagem, pois dispõem de um mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela penetração ativa nos hospedeiros, não dependendo assim da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção (FRANCESCHINI et al., 2001).

Atualmente, um dos gêneros mais importantes de fungos considerados como agentes de controle biológico de doenças de plantas é *Trichoderma* spp., tanto que em 2019 foram registrados 21 biofungicidas à base desse fungo no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Destes, 66% dos produtos registrados são à base de *T. harzianum*, 24% à base de *T. asperellum*, 5% à base de *T. koningiopsis* e 5% à base de *T. stromaticum* (BETTIOL et al., 2019).

Vários estudos vêm relatando a eficiência da utilização da suspensão de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de solo em feijoeiro (TEIXEIRA et al., 2012; CARVALHO et al., 2014; ARAUJO; BLUM; FIGUEIREDO, 2019), os quais são mais difíceis de serem controlados por meio de outras medidas de controle. *Trichoderma* spp. foi capaz de controlar *in vitro* *Sclerotinia rolfssi*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* spp. com inibições de até 60, 100 e 70%, respectivamente (CHAGAS JUNIOR et al., 2018). *T. harzianum* foi eficiente em induzir resistência e promover crescimento de plantas de feijoeiro (PEREIRA et al., 2014). Sendo assim, o biocontrole por *Trichoderma* spp. torna-se uma opção importante no manejo integrado de doenças, tratando-se da eficiência do controle dessas doenças, tanto por agir diretamente sobre o patógeno, bem como, por induzir resistência às plantas.

2.5 GÊNERO *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. pertence à classe Sordariomycetes do filo Ascomycota. Os fungos deste gênero são habitantes de solo, podem ser encontrados tanto em regiões de clima temperado como em clima tropical, sendo fácil deparar-se com representantes deste grupo associados à fração orgânica e a rizosfera das plantas (HARMAN, et al., 2004). As espécies mais comuns encontradas entre os isolados já estudados são: *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. virens*, *T. coningii*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. reesei*, *T. hamatum*, *T. viride* e *T. ganense* (ADNAN et al., 2019).

Alguns mecanismos pelos quais as espécies de *Trichoderma* reconhecem e atacam os fungos fitopatogênicos já são bastante conhecidos. Estes mecanismos podem ser divididos em efeitos diretos como: antibiose, competição por nutrientes e espaço físico, micoparasitismo e inativação das enzimas do fitopatógeno e como efeitos indiretos tem -se a indução de resistência e a tolerância ao estresse (SILVA; MELLO, 2007).

O uso de fungos do gênero *Trichoderma* é extremamente amplo, podendo ser utilizados em tratamento de sementes, aplicação em áreas de cultivo para o controle biológico de doenças de plantas e também como promotor de crescimento vegetal (WOO et al., 2014). Sua utilização como agente de controle biológico mostra efeitos positivos contra patógenos radiculares, assim como também contra patógenos que podem atingir a parte aérea de plantas e, há diversos relatos que demonstram sua eficácia comprovada cientificamente. Entretanto ainda são necessários novos estudos, pois assim como os demais agentes de controle biológico, a ação deste fungo pode ser influenciada por variações ambientais e do ecossistema (BENÍTEZ et al., 2004).

No trabalho realizado por Silva et al., (2021) foi possível observar a capacidade de *Trichoderma harzianum* (ESALQ – 1306) e *Trichoderma asperellum* (BRM-29104) em modificar a comunidade microbiana do solo nativo com cultivo de feijoeiro, bem como a composição da comunidade endofítica nas folhas e raízes da cultura. Em estudos realizados por Pedro et al., (2012), *Trichoderma* spp. promoveu o crescimento de diferentes culturas incluindo o feijoeiro. A promoção de crescimento de plantas por espécies de *Trichoderma* spp. ocorre em razão da produção de giberelinas e de auxinas como o AIA (HERMOSA et al., 2012), favorecendo o desenvolvimento de raízes laterais. A colonização radicular também é responsável pelo aumento do crescimento e desenvolvimento de raízes e área foliar, incrementando a produtividade das culturas e como consequência, permite às plantas a apresentarem maior resistência aos estresses abióticos, além de contribuir na absorção e utilização de nutrientes (HARMAN et al., 2004).

2.6 MICROENCAPSULAÇÃO DE AGENTES BIOLÓGICOS

A microencapsulação consiste em um processo que pode fornecer uma barreira física entre o composto do núcleo e os outros componentes do produto ou do meio externo. É uma técnica em que gotículas líquidas, ou gasosas formam cápsulas em miniaturas, chamadas de material ativo (GHARSALLAOUI et al., 2007; MENEZES et al., 2012). Um dos objetivos da microencapsulação é o isolamento de uma substância de interesse, protegendo-a de determinadas condições do ambiente, possibilitando assim a sobrevivência do microrganismo e, manter por um maior período de tempo sua atividade metabólica, bem como a vida útil do produto (IXTAINA et al., 2015; CASSIDY et al., 1996).

Há vários métodos de encapsulamento que podem ser classificados em três grupos: métodos físicos, onde destaca-se a secagem por atomização, a liofilização, a precipitação com fluido supercrítico e evaporação de solvente; métodos físico-químicos, inclui-se a coacervação, lipossomas e gelificação iônica; e por fim os métodos químicos, tais como polimerização interfacial e a inclusão molecular (OZKAN et al., 2019).

Horaczek (2004) avaliou três diferentes tecnologias de secagem e a longevidade de conídio aéreos de *Bauveria brongniartii* e *Metarhizium anisopliae*, e verificou que os níveis de viabilidade de *B. brongniartii* após o processo de liofilização foi de 68%. Luangthongkam (2021) comparou dois métodos diferentes de encapsulamento de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa H57, neste estudo a secagem por pulverização foi mais eficiente em comparação com a técnica de liofilização na preservação da viabilidade do microrganismo. Labuschagne (2018) ressalta que a secagem por atomização (Spray dryer) e a liofilização são os métodos de encapsulamento mais utilizados, estando presentes em cerca de 84% das publicações, enquanto outras tecnologias de encapsulamento têm ganhado destaque apenas nos últimos anos.

A microencapsulação de conídios de *Trichoderma* spp. em matrizes de biopolímeros, como quitosana ou alginato, prolonga a vida útil das formulações, aumenta a estabilidade em campo e controla a liberação microbiana, aumentando a eficácia do biocontrole. Além disso, conídios encapsulados precisam de menos aplicações do que suspensão de conídios simples, reduzindo custos (FRACETO et al., 2018).

Maruyama et al., (2020), avaliaram o potencial do encapsulamento de *Trichoderma harzianum* e observaram que a encapsulação do agente de biocontrole demonstrou uma melhora na atividade quitinolítica e celulósica, além disso ao avaliar sua ação *in vitro* no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*, constaram que o fungo encapsulado proporcionou um maior controle do agente patogênico.

2.6.1 Microencapsulação por Liofilização (*Freeze drying*)

O processo de liofilização consiste na remoção da água disponível presente na amostra congelada por processos de sublimação e dessorção, sob condições de atmosfera de vácuo (MA et al, 2020). Em outras palavras, a água presente no material passa do estado sólido para o estado gasoso sem passar pelo estado líquido devido a redução do ponto de vaporização da água causado pelo vácuo.

A liofilização é um processo usado para a desidratação de quase todos os materiais sensíveis ao calor ou produtos com alto valor comercial. A operação de liofilização é baseada na sublimação da água presente na amostra. O material a ser encapsulado é congelado preservando suas características químicas. Em seguida o material congelado é submetido a um vácuo parcial, o gelo e/ou outros solventes congelados são removidos do material por meio de sublimação, após o material sólido desidratado é moído até obter-se o tamanho de partícula desejado (FANG e BHANDARI, 2010). A estrutura dos pós liofilizados é mais porosa do que os pós secos por pulverização, no entanto, a secagem por congelamento é capaz de melhorar a estabilidade e facilitar o manuseio do produto final (AUGUSTIN E HEMAR, 2009; MORAIS et al., 2016).

Os extratos liofilizados de algumas plantas possuem atividade fungicida, como por exemplo extratos liofilizados de *Ruta graveolens* reduzem o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani*, *Pyrenochaetaly copersici*, *Thielaviopsis basicola*, *Verticillium dahliae* e *Penicilum* sp. (OLIVA et al., 1999), enquanto os extratos de *Pelargonium* sp., *Salvia officinalis*, *Lavandula officinalis*, *Mentha pulegium* e *Mentha arvensis* reduzem em até 85% a germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* (BORGES et al., 2013).

Toegel et al., (2010) relatam a possibilidade de secagem de esporos de *Metarhizium anisopliae* por liofilização, junto a agentes excipientes. No entanto, os autores relatam que obtiveram resultados relativamente baixos de viabilidade.

Horaczek; Viernstein, (2004) utilizaram spray dryer, liofilizador e leite fluidizado para secar soluções com esporos dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria brongniartii*. Os autores empregaram uma calda composta por leite desnatado e polivinilpirrolidona (PVP K90) para a extração dos esporos, uma vez que ambos agentes tinham capacidade de proteger os esporos após a secagem. Neste estudo a liofilização resultou em esporos com maior viabilidade e os ensaios por spray drying mostraram forte influência da temperatura de secagem sobre a viabilidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

O presente trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Santa Maria, localizada em Santa Maria, Rio Grande do Sul. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi no Departamento de Defesa Fitossanitária.

3.2 ENSAIOS *IN VITRO*

3.2.1 Origem e caracterização dos microrganismos

Foram utilizados quatro isolados do gênero *Trichoderma* spp. como antagonistas, sendo, dois da espécie *T. harzianum*, provenientes de formulações comerciais, sendo um o Trichodermil SC I306[®] – Produto registrado no MAPA sob o nº 002007, com mínimo de $2,0 \times 10^9$ conídios viáveis/mL e formulação em suspensão concentrada, e Stimucontrol[®] – Produto registrado no MAPA sob nº 22516, com 1×10^9 UFC/L e formulação em suspensão concentrada. Ambos isolados foram obtidos de uma alíquota de produto comercial transferida para o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Os isolados foram codificados como TD e SC. Foram utilizados

outros dois isolados provenientes de solo rizosférico, sendo um codificado como “TF1” (*T. virens*) (Genbank MK450344 e SISGEN A28E445), coletado de solo rizosférico em lavoura com cultivo de feijão no município de Roque Gonzales, RS, (28° 07' 53'' S 55° 01' 31'' W) e o isolado “IVCT1” (*T. asperellum*) (Genbank MN329691 e SISGEN A6F940E), coletado em solo rizosférico, com cultivo de Citrus no município de Montenegro, RS.

Como fungo fitopatogênico foi utilizado um isolado de *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão cinzenta da haste em feijoeiro, proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas, codificado como “PEL” (Genbank MK450343).

3.2.2 Suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.

Para preparação da suspensão, o fungo foi cultivado sob condições controladas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) por 7 dias a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Após o cultivo, para cada placa de Petri foram adicionados 10 ml de água destilada esterilizada, e foi feita uma raspagem leve na colônia com um bastão de vidro para auxiliar na remoção dos esporos. A suspensão resultante foi peneirada em dupla camada de gaze, e em seguida foram adicionadas duas gotas de Tween®. A suspensão resultante foi ajustada para a concentração de 10^7 esporos ml^{-1} , utilizando uma câmara de Neubauer. Após o preparo da suspensão dos isolados, parte foi destinada para realização dos testes *in vitro* sem utilização da técnica de microencapsulação, usando somente a suspensão, e a outra parte foi destinada para o preparo matriz de imobilização para a realização da microencapsulação.

3.2.3 Microencapsulação de *Trichoderma* spp. pelo método de liofilização

O processo de secagem por liofilização foi realizado no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minusi da Universidade Federal de Santa Maria, utilizando um liofilizador modelo LS3000 (Equipamentos Terroni® – São Carlos/SP).

A partir da suspensão inicial de esporos dos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. foram preparadas as soluções. Como material de parede utilizou-se leite em pó desnatado (Elegê®) sendo sua composição composta por: Carboidratos: 10 g; proteínas: 6,8 g; Gorduras

totais: 0; Gorduras saturadas: 0; Gorduras trans: 0; Fibra alimentar: 0; Sódio: 99 mg; Cálcio: 223 mg; Ferro: 2,1 mg; Vitamina A: 120 µg; Vitamina C: 13,05 mg; Vitamina D: 1,3 µg) estas informações correspondem a uma porção de 20 gramas.

O preparo das soluções para a matriz de imobilização foi preparado da seguinte forma: adicionou-se uma solução de leite em pó desnatado à 10%, em seguida a suspensão de esporos foi adicionada, após a solução foi homogeneizada com a utilização de vórtex durante um minuto. Em seguida realizou-se o processo de congelamento das amostras em um Ultrafreezer a -80°C durante um período de 24 horas.

Em seguida realizou-se o transporte imediato das amostras para o liofilizador, afim de que não iniciassem o processo de descongelamento, para evitar a redução da qualidade do produto final. A temperatura de operação do liofilizador foi de -50°C, o término da secagem foi determinado através da observação da aparência do material, sendo este período estabelecido após 48 horas de operação. O material coletado foi armazenado refrigerado em recipientes estéreis e hermeticamente fechados até o momento de caracterização do produto, para posterior aplicação nos testes *in vitro*. Para cada tratamento, realizou-se um total de 20 repetições.

3.2.4 Avaliação do pareamento de culturas

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o isolado patogênico de *M. phaseolina* foi avaliado por meio de confronto direto. Para cada tratamento foram utilizadas sete repetições, onde cada repetição foi composta por uma placa de Petri de 90 mm.

Os isolados de *M. phaseolina* e *Trichoderma* spp. foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, armazenadas em câmara de incubação, do tipo BOD, a 25 °C (± 2 °C), com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Posteriormente, transferiu-se um disco de micélio de 5 mm de diâmetro retirado das bordas das colônias de *M. phaseolina* para placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo meio de cultura BDA. Após, foi realizada a transferência de uma alíquota de 20 microlitros de formulação de *Trichoderma* spp. liofilizados para a, extremidade oposta das placas com o isolado de *M. phaseolina*, exceto no tratamento testemunha, no qual foi colocado apenas o patógeno em uma das extremidades da placa. Em seguida, as placas foram vedadas e transferidas para câmara de incubação a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias.

Para os testes com a suspensão dos organismos vivos, utilizou-se também uma alíquota de 20 microlitros de suspensão de esporos, e os demais processos seguintes foram os mesmos utilizados para suspensão e formulação liofilizada.

Durante o tempo de incubação, foram realizadas medições diárias do diâmetro das colônias de *M. phaseolina*, com auxílio de um paquímetro digital. O percentual de inibição médio do crescimento micelial foi calculado ao final do teste, conforme o método proposto por Jeyaseelan et al., (2012):

$$\% \text{ inibição} = [(R1 - R2)/R1] \times 100, \text{ em que:} \quad (1)$$

% inibição = porcentagem de inibição.

R1 = crescimento radial da testemunha.

R2 = crescimento radial do tratamento.

O crescimento micelial de cada isolado foi avaliado através da mensuração diária das colônias, com auxílio de um paquímetro digital. Foram realizadas medidas em sentidos diametralmente opostos até que um dos isolados preencheu a superfície do meio de cultura. Posteriormente, foi determinada a média de crescimento para cada placa (mm/dia). Esses dados foram utilizados para o cálculo do IVCM (Índice de Velocidade de Crescimento Micelial) do fungo, empregando-se a fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = \sum ((D - D_a)/N), \text{ em que:} \quad (2)$$

IVCM = índice de velocidade de crescimento Micelial.

D = diâmetro médio atual da colônia.

D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior.

N = número de dias após a transferência.

3.2.5 Avaliação de metabólitos voláteis

O efeito inibidor de metabólitos voláteis foi avaliado conforme Dennis e Webster (1971), com adaptações. Nesta metodologia, duas bases de placas de Petri de 90 mm contendo BDA receberam, individualmente, discos (5 mm de diâmetro) das culturas do patógeno em uma das bases das placas e 20 microlitros da formulação liofilizada e/ou para os testes com a utilização da suspensão dos organismos vivos, utilizou-se também uma alíquota de 20 microlitros de suspensão de esporos, dispostos no centro da outra base de placas, após essas foram unidas lateralmente, com plástico filme transparente. Como testemunha, foram sobrepostas duas bases, uma contendo o patógeno e a outra somente meio de cultura. As placas utilizadas no experimento foram incubadas em BOD ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 12h). A avaliação da inibição do crescimento micelial foi feita sete dias após a instalação do experimento. A avaliação dos tratamentos foi realizada por meio de medições do diâmetro das colônias em dois eixos, comparando-se o crescimento radial de cada tratamento com a testemunha.

O experimento consistiu em delineamento inteiramente casualizado com um bifatorial (formas de utilização dos isolados x 4 isolados de *Trichoderma* spp.) totalizando um total de oito tratamentos, mais o tratamento controle, onde cada tratamento será composto por sete repetições. Foi testada a normalidade dos erros e a homogeneidade de variância residual dos tratamentos pelo pacote ExpDes do software R Core Team (2019). Quando atendidos os pressupostos, foi realizada a análise de variância dos dados e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância, utilizando o software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

3.3 ENSAIO *IN VIVO*

As formulações liofilizadas de *Trichoderma* spp. que obtiveram os maiores valores de inibição do crescimento micelial do patógeno nas avaliações *in vitro*, foram selecionadas para a condução do ensaio *in vivo*.

3.3.1 *Trichoderma* spp. na redução da severidade de *M. phaseolina* e no crescimento de plantas de feijoeiro

Para a realização deste experimento foram utilizadas sementes de feijão da cultivar IAC Veloz, previamente desinfestadas em banho de álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos, seguido por três banhos de 30 segundos cada em água destilada e esterilizada. As sementes permaneceram em temperatura ambiente para secagem sob papel filtro. Como agentes de controle biológico foram utilizados dois isolados de *Trichoderma* spp. na forma de suspensão ou formulação liofilizada, aplicados via tratamento de sementes.

Como fitopatógeno foi utilizado um isolado de *M. phaseolina* (item 3.2.1), o qual foi inoculado via substrato. No tratamento testemunha não foi realizado o tratamento das sementes com os antagonistas nem a inoculação do patógeno, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos tratamentos de acordo com a aplicação do antagonista nas sementes e inoculação do patógeno via substrato.

Tratamento	Tratamento das sementes com o antagonista	Patógeno
1*	Ausência de <i>Trichoderma</i> (AT)	Ausência de patógeno
2	<i>T. harzianum</i> (SC 1)	Ausência de patógeno
3	<i>T. harzianum</i> (SC 2)	Ausência de patógeno
4	<i>T. harzianum</i> (TD 1)	Ausência de patógeno
5	<i>T. harzianum</i> (TD 2)	Ausência de patógeno
6	<i>T. virens</i> (TF1 1)	Ausência de patógeno
7	<i>T. virens</i> (TF1 2)	Ausência de patógeno
8	Ausência de <i>Trichoderma</i> (AT)	via substrato – PEL
9	<i>T. harzianum</i> (SC 1)	via substrato – PEL
10	<i>T. harzianum</i> (SC 2)	via substrato – PEL
11	<i>T. harzianum</i> (TD 1)	via substrato – PEL
12	<i>T. harzianum</i> (TD 2)	via substrato – PEL
13	<i>T. virens</i> (TF1 1)	via substrato – PEL
14	<i>T. virens</i> (TF1 2)	via substrato – PEL

*AT: Ausência de *Trichoderma*; TF1 1: Suspensão de *T. virens*; TD 1: Suspensão de *T. harzianum*; SC 1: Suspensão de *T. harzianum*; TD 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. harzianum*; TF1 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. virens*; SC 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização *T. harzianum*.

3.3.2 Aplicação dos antagonistas via tratamento de sementes

As sementes foram tratadas com três isolados de *Trichoderma* spp., individualmente, por meio da aplicação de 2 mL das formulações liofilizadas ou suspensão de esporos na concentração de 10^7 para *T. harzianum* (Stimucontrol® e Trichodermil®) e *T. virens.*, para cada 100 sementes.

3.3.3 Inoculação do patógeno via substrato

Para o cultivo do patógeno foram utilizados Erlenmeyers contendo grãos de arroz sem casca, previamente umedecidos com água destilada (6 mL de água/ 10 g de arroz) e posteriormente esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120°C. Após o resfriamento dos grãos, foram adicionados 10 discos de 5 mm contendo micélio, provenientes de culturas puras de *M. phaseolina* e incubados em BOD por 14 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, os grãos de arroz foram depositados a uma profundidade de 5 cm e sobre eles foram colocadas as sementes de feijão já tratadas com os antagonistas na forma de formulação liofilizada ou suspensão de esporos, de acordo com a metodologia de Cruciol e Costa (2018) com adaptações.

O experimento foi instalado em janeiro de 2022, e as plantas foram cultivadas em copos plásticos com capacidade de 770 mL preenchidos com substrato comercial MacPlant® e areia (1:1) e mantidas em casa de vegetação durante a execução do experimento (20 dias).

A severidade da doença foi avaliada por meio de uma escala de notas de Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987), que variou de 1 a 9, onde: 1 – ausência de sintomas visíveis da doença; 3- sintomas da doença restritos aos cotilédones ou o ponto de inoculação; 5- aproximadamente 10% do hipocótilo e ramos inferiores coberto de lesões e muitas vezes combinado com estruturas de frutificação do fungo; 9- aproximadamente 50% ou mais do hipocótilo e ramos inferiores cobertos de lesões e com um grande número de estruturas frutíferas do fungo.

A partir dessa escala de notas, aos 10 e 20 dias após a semeadura foi determinado o Índice de doença (MCKINNEY, 1923):

$$ID (\%) = \sum \left(\frac{Y * Xy}{(Xt * h)} \right) * 100 , \text{ em que:}$$

ID = Índice de Doença;

Y = número de plantas com determinada nota;

X_y = nota observada;

X_t = número total de plantas avaliadas;

h = nota máxima da escala

Com a mesma escala de notas foi determinada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) utilizando os valores de severidade da doença avaliados aos 10 e 20 dias após a semeadura (CAMPBELL e MADDEN, 1990):

$$AACPD = \sum \left[\left(\frac{Y_1 + Y_2}{2} \right) * (t_2 - t_1) \right], \text{ em que:}$$

Y_1 e Y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente.

Também foi realizada a estimativa da área foliar, seguindo a metodologia proposta por Pohlmann et al., (2021), a mesma foi proposta para a cultura do feijoeiro. O método não destrutivo é baseado nas dimensões lineares do folheto central da planta, e é estimada através da equação geral $LA = 1,092L1,945$.

Cada tratamento foi composto por sete repetições, em que cada planta representou uma unidade experimental. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em análise fatorial (Antagonistas, composto por seis tratamentos mais a testemunha, e com a ausência e presença do patógeno). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade dos erros e a homogeneidade de variância residual dos tratamentos pelo pacote ExpDes do software R Core Team (2019) se atendidos os pressupostos, foi realizado a análise de variância dos dados e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância, utilizando o software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

A promoção de crescimento da suspensão e formulação liofilizada de *Trichoderma* spp. sobre as plantas de feijoeiro foi avaliada aos 20 dias após a semeadura. As raízes foram separadas da parte aérea e colocadas em sacos de papel identificados e levados à estufa de secagem a 65°C por 96 h para a determinação da massa seca.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS IN VITRO

4.1.1 Pareamento de culturas e metabólitos voláteis

No teste de pareamento de culturas (Tabela 2), houve interação significativa entre os fatores para índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Todos os formulados resultaram em um menor IVCM em relação a suspensão e diferenciaram-se da testemunha. Entre os tratamentos, *Trichoderma virens* TF1 formulação reduziu mais significativamente o IVCM em relação a aplicação por suspensão, com valores de 2,15 e 1,15 mm.dia⁻¹ para o isolado aplicado na forma de suspensão e formulação, respectivamente. Conseqüentemente, o percentual de inibição do patógeno foi maior para os formulados.

Dessa maneira, todos os isolados reduziram o crescimento micelial de *M. phaseolina* independentemente de estarem formulados ou não. No entanto, a liofilização aumentou o efeito inibidor com exceção do isolado de *T. asperellum*. A liofilização como técnica de formulação de conídios já mostrou efeito positivo em isolados de *Trichoderma* para o controle de fitopatógenos (Li-Li et al. (2015). Li-Li et al. (2015), avaliaram a utilização de formulações de conídios de *Trichoderma asperellum* produzidos por caldo de fermentação e liofilizados no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, e obtiveram resultados de inibição de 64,17% a 88,67%. Estes valores diferiram dos encontrados neste estudo para essa espécie de *Trichoderma*, porém valores semelhantes foram encontrados para as demais espécies estudadas no presente trabalho.

Tabela 2 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e percentual de inibição de crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* confrontada com *Trichoderma* spp. no teste de pareamento de culturas.

<i>Trichoderma</i> spp.	Crescimento de <i>M. phaseolina</i>			
	IVCM (mm.dia ⁻¹)		Inibição (%)	
	Suspensão	Formulação	Suspensão	Formulação
<i>T. harzianum</i> (SC)	2.34 Ab	1.30 Bc	32.37 Bb	49.93 Ab
<i>T. harzianum</i> (TD)	2.27 Ab	1.20 Bc	42.97 Ba	53.23 Aa
<i>T. asperellum</i> (IVCT1)	2.20 Ab	1.81 Bb	45.17 Aa	34.14 Bc
<i>T. virens</i> (TF1)	2.15 Ab	1.15 Bc	47.99 Ba	56.18 Aa

Testemunha	3,09 Aa	3,06 Aa	-	-
CV (%)	9.43		8.82	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. *T. virens* (TF1): isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: proveniente do produto comercial Stimucontrol® (SC) e Trichodermil® (TD); *T. asperellum* (IVCT1); PEL: isolado de *Macrophomina phaseolina*, proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas.

Maruyama et al. (2020), estudaram o encapsulamento de *T. harzianum* quanto a sua preservação enzimática e sobre seu potencial de controle biológico *in vitro* de *S. sclerotiorum*, porém utilizando outra técnica de microencapsulamento (micropartículas de Alginato de cálcio) e em ensaios de antagonismo *in vitro* as micropartículas de *T. harzianum* microencapsuladas inibiram o crescimento do fitopatógeno, apresentando um bom resultado no potencial de biocontrole.

Assim, como Maruyama et al., (2020) neste estudo os isolados de *Trichoderma* spp. microencapsulados também foram capazes de inibir o crescimento micelial de *M. phaseolina* um fitopatógeno habitante de solo, bem como na pesquisa da autora citada que explorou o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Desta forma, este estudo corroborou com os resultados citados anteriormente, no potencial de biocontrole *in vitro*.

Isolados de *Trichoderma* spp. também apresentam a capacidade de produzir metabólitos voláteis, este mecanismo de ação pode ser utilizado por microrganismos afim de controlar o crescimento de diversos patógenos (Tabela 3).

Tabela 3 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e percentual de inibição de crescimento micelial de *M. phaseolina* confrontada com *Trichoderma* spp. no teste de metabólitos voláteis.

<i>Trichoderma</i> spp.	Crescimento de <i>M. phaseolina</i>			
	IVCM (mm.dia ⁻¹)		Inibição (%)	
	Suspensão	Formulação	Suspensão	Formulação
<i>T. harzianum</i> (SC)	3.52 Ab*	2.19 Bd	17.05 Bb	56.44 Aa
<i>T. harzianum</i> (TD)	2.99 Ac	2.61 Bc	22.21 Bb	45.37 Ab
<i>T. asperellum</i> (IVCT1)	3.60 Ab	3.15 Bb	13.75 Bb	32.72 Ac
<i>T. virens</i> (TF1)	2.44 Bd	3.31 Ab	31.85 Aa	25.47 Bc
Testemunha	3,86 Aa	3,50 Ba	-	-
CV (%)	7.50		24.61	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. *T. virens* (TF1): isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: proveniente do produto comercial Stimucontrol® (SC) e Trichodermil® (TD); *T. asperellum* (IVCT1): isolado de solo rizosférico de citrus; PEL: isolado de *Macrophomina phaseolina*, proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas.

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram a capacidade de produzir metabólitos voláteis e inibiram o crescimento de *M. phaseolina in vitro* (Tabela 3) sendo que houve interação significativa entre os fatores. Pôde-se observar que os isolados de *Trichoderma* spp. que formulados apresentaram os melhores resultados para o índice de velocidade de crescimento micelial e percentual de inibição do crescimento micelial, com exceção do isolado *T. virens*, porém todos diferiram estatisticamente do tratamento testemunha. Destaca-se o isolado *T. harzianum* (SC), em que a técnica possibilitou uma redução no IVCm ($2,19 \text{ mm. dia}^{-1}$) e conseqüentemente um maior percentual de inibição do crescimento micelial em comparação a utilização da suspensão onde o IVCm correspondeu à $3,52 \text{ mm. dia}^{-1}$ e o percentual de inibição à 17,05 %. Neste estudo também foi possível observar que o isolado *T. virens* suspensão também apresentou o melhor resultado de inibição para o teste de metabólitos voláteis. A produção de VOCs por isolados de *Trichoderma* já é bem estudado no controle de diferentes fitopatógenos (Sarzi, 2019). No entanto, este trabalho demonstrou pela primeira vez o aumento na efetividade do formulado liofilizado em relação a suspensão de esporos.

A liofilização aumentou a eficiência na redução de crescimento micelial e na produção de metabólitos tóxicos a *M. phaseolina*. O uso da liofilização para formulação de outros fungos ou materiais já mostrou melhora no efeito biocontrolador de fitopatógenos (Han et al., 2021; Jarque et al., 2016). Além disso, estudos também comprovaram que a utilização da liofilização como método de encapsulação para isolados de *Trichoderma* spp. mostraram maiores taxas de sobrevivência em diferentes temperaturas de armazenamento (Lopes et al., 2020). Isso demonstra que está técnica pode ser considerada promissora entre os métodos de encapsulação de fungos antagonistas como os do gênero *Trichoderma* spp. para o biocontrole de patógenos radiculares de solo.

4.2 ENSAIO *IN VIVO*

4.2.1 *Trichoderma* spp. na redução da severidade de *M. phaseolina* e promoção de crescimento em feijoeiro

Houve interação entre *Trichoderma* spp. e patógeno para a AACPD (Tabela 4), onde todos os tratamentos diferenciaram-se da testemunha com ausência de *Trichoderma* spp. (AT). Medeiros et al. (2022), ao estudar a ação do antagonismo *in vivo* de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e na promoção de crescimento de plantas de feijoeiro, através da utilização de isolados de *Trichoderma* spp., relataram que as cepas de *Trichoderma* estudadas controlaram o agente patogênico *F. oxysporum* nos testes *in vivo*, e também proporcionaram o aumento do crescimento das plantas tratadas com *Trichoderma* spp.

O tratamento com *T. virens* microencapsulado (TF1 2), foi o que apresentou a menor área abaixo da curva de progresso da doença na presença do patógeno, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos TF1 1 e TD 1, suspensão *T. virens* e *T. harzianum* (TD 1) respectivamente. Para os tratamentos com ausência de patógeno, não houve diferença estatística entre os isolados, não foi observado presença de doença nestes tratamentos. Porém, ao analisar os isolados de *Trichoderma* spp. com a presença e ausência de patógeno, todos os tratamentos diferiram entre si.

O presente estudo divergiu dos resultados encontrados por Sarzi (2019) ao estudar a ação de *Trichoderma* spp. na redução da severidade do também agente patogênico *M. phaseolina*, ao avaliar a AACPD em plantas de feijoeiro tratadas com *Trichoderma* spp., independente da forma de aplicação seja por suspensão ou filtrado de cultura. Embora a aplicação de *Trichoderma* spp. tenha reduzido os sintomas da doença, não houve interação entre fatores patógeno e *Trichoderma* spp.

Tabela 4 - Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) em plantas de feijoeiro, cultivar IAC Veloz, tratadas com suspensão e formulação liofilizada de *Trichoderma* spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste causada por *M. phaseolina*.

<i>Trichoderma</i> spp.	Patógeno	
	AP	PP
AT	10.00 Ba*	60.00 Aa
TF1 1	10.00 Ba	25.00 Ac
TD1	10.00 Ba	25.00 Ac
SC1	10.00 Ba	35.00 Ab
TD2	10.00 Ba	35.00 Ab
TF1 2	10.00 Ba	22.50 Ac
SC2	10.00 Ba	30.00 Ab
CV (%)	30.92	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. AT: Ausência de *Trichoderma*; TF1 1: Suspensão de *T. virens*; TD 1: Suspensão de *T. harzianum*; SC 1: Suspensão de *T. harzianum*; TD 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. harzianum*; TF1 2:

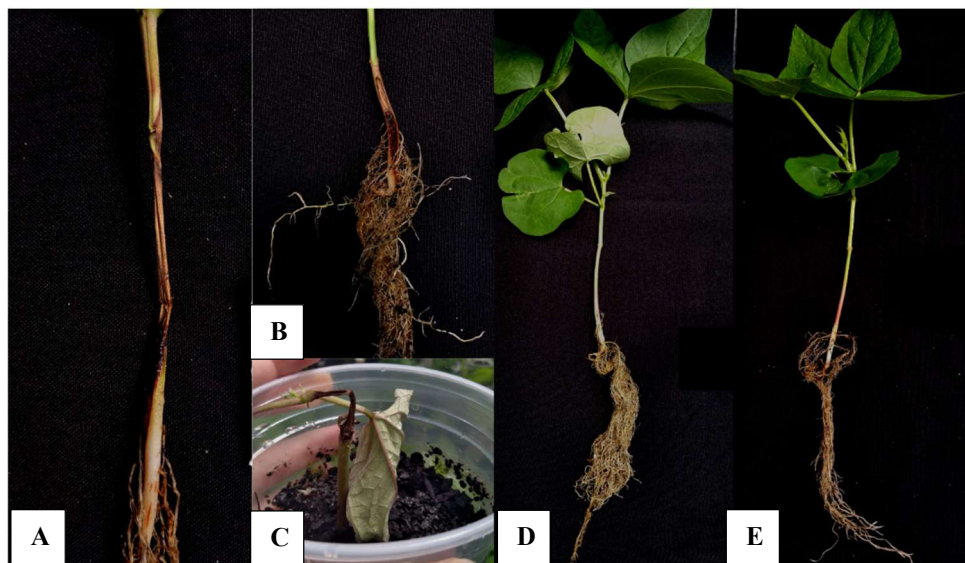
Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. virens*; SC 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização *T. harzianum*; AP: Ausência do patógeno; PP: Presença do patógeno.

Os fungos do gênero *Trichoderma* possuem várias características que favorecem sua sobrevivência no solo, bem como também são promissores como agentes de biocontrole. Por se tratarem de fungos saprófitas, apresentam rápida colonização do substrato, possuem exigências nutricionais baixas, são capazes de produzir clamidósporos, que são estruturas de resistência para sobreviver sob condições adversas, são capazes de produzir substâncias tóxicas (antibióticos), bem como também enzimas degradadoras de parede celular de outros fungos (quitinases, glucanases, entre outras) (GERALDINE et al., 2013; TROIAN et al., 2014).

Maruyama et al. (2020) observaram que o encapsulamento de *T. harzianum* preservou a atividade enzimática e aumentou o potencial do controle biológico do isolado. E, ao avaliar após o processo de microencapsulação observou-se que o antagonista aumentou a atividade da quitinase.

Os principais sintomas apresentados por *Macrophomina phaseolina* em feijoeiro são a redução do crescimento das plantas, seguido do amarelecimento das folhas que acabam caindo com o avanço da doença. Após ocorre a seca e morte das plantas. Na região do caule é possível observar pequenas pintas pretas (picnídios) que são ressaltados por uma superfície pardo-acinzentada da haste senescente (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2018). Ao observarmos a figura 1, visualiza-se os sintomas causados por *M. phaseolina* em plantas de feijoeiro do presente estudo e em alguns casos, esses sintomas foram observados desde os estágios iniciais da planta.

Figura 1 - Sintomas de podridão-cinzenta-da-haste em plantas de feijoeiro sem e com o tratamento de sementes com *Trichoderma* spp.



A, B: Presença de cancos escuros, deprimidos e com margens bem definidas; C: *Damping-off* causado pelo patógeno *M. phaseolina* em feijoeiro; D: Planta de feijoeiro com presença de *M. phaseolina* e tratada com formulação liofilizada de *T. harzianum* (TD); E: Tratamento testemunha, sem tratamento e com presença de patógeno aos 20 dias após a semeadura.

O Índice de Doença (ID) foi verificado aos 10 e 20 dias após a semeadura e aos 10 dias após a semeadura, houve interação significativa entre isolados de *Trichoderma* spp. e patógeno para essa variável.

Foi possível observar que os tratamentos com os isolados *T. virens* e *T. harzianum* microencapsulados (TF1 2 e SC 2 respectivamente) apresentaram o menor índice de doença aos 10 dias. Conseqüentemente, o tratamento controle com a ausência de *Trichoderma* spp., que manteve o contato direto entre o patógeno e semente, apresentou a maior presença de sintomas da podridão cinzenta da haste (Tabela 5). Entretanto, TF1 1 isolado de *T. virens* aplicado como suspensão não diferiu estatisticamente dos tratamentos TF1 2 e SC 2 ambos microencapsulados.

Baiyee et al. (2019) avaliaram a atividade antifúngica de *T. asperellum* contra fungos da mancha foliar em alface e observaram que após o tratamento das plantas com a suspensão de esporos de *T. asperellum* por pulverização foliar ou imersão das raízes, houve redução do índice de severidade da doença após cinco dias de incubação em comparação com o tratamento testemunha. Sarzi (2019) também encontrou resultados semelhantes aos observados neste estudo, utilizando duas espécies de *Trichoderma* (*T. virens* e *T. harzianum*) por meio de duas formas de aplicação (Suspensão e filtrado de cultura) na redução do índice de doença de *M. phaseolina*.

Tabela 5 - Índice de doença (ID) aos 10 dias após a semeadura de plantas de feijoeiro, cultivar IAC Veloz, tratadas com suspensão e formulação liofilizada de *Trichoderma* spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste causada por *M. phaseolina*.

<i>Trichoderma</i> spp.	Patógeno	
	AP	PP
AT	2.77 Ba*	16.66 Aa
TF11	2.77 Ba	8.33 Ae
TD1	2.77 Ba	9.72 Ad
SC1	2.77 Ba	12.50 Ab
TD2	2.77 Ba	11.11Ac
TF12	2.77 Ba	6.94 Ae
SC2	2.77 Ba	6.94 Ae
CV (%)	29.28	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. AT: Ausência de *Trichoderma*; TF1 1: Suspensão de *T. virens*; TD 1: Suspensão de *T. harzianum*; SC 1: Suspensão de *T. harzianum*; TD 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. harzianum*; TF1 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. virens*; SC 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização *T. harzianum*; AP: Ausência do patógeno; PP: Presença do patógeno.

Em relação aos 20 dias após a semeadura, houve interação significativa entre isolados de *Trichoderma* spp. e patógeno, observando um índice de doença maior no tratamento com ausência de *Trichoderma* spp. (AT). Todos os tratamentos diferiram do tratamento testemunha, tanto os isolados aplicados através da suspensão, bem como os isolados liofilizados reduziram o índice de doença aos 20 dias, com exceção do isolado SC 2, isolado *T. harzianum* microencapsulado, que teve um aumento no índice de doença aos 20 dias após a semeadura.

Ao analisarmos os isolados de *Trichoderma* spp. quanto a presença e ausência do patógeno, os tratamentos SC 2, TD 2, SC 1 e AT apresentaram diferença estatística para o fator ausência e presença do patógeno. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente, quanto a AP e PP.

Neste estudo, foi possível observar que o tratamento de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram efeito benéfico na emergência de plantas e por inibir a incidência de tombamento e retardar o aparecimento de sintomas de *M. phaseolina*. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores que mostraram que os fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de reduzir a incidência de tombamento causado por fungos patogênicos em mudas de feijoeiro (ABD-EL-KHAIR et al., 2010; MALIK et al., 2005; RUVIMBO et al., 2016). Abd-El-Khair et al., (2010) relataram que sementes de feijão tratadas com *T. album*, *T. hamatum*, *T. harzianum* e *T. viride* apresentaram-se eficazes no controle de tombamento em feijão, causado pelo agente patogênico *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*.

Tabela 6 - Índice de doença (ID) aos 20 dias após a semeadura de plantas de feijoeiro, cultivar IAC Veloz, tratada com suspensão e formulação liofilizada de *Trichoderma* spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste causada por *M. phaseolina*.

<i>Trichoderma</i> spp.	Patógeno	
	AP	PP
AT	2.77 Ba*	16.66 Aa
TF1 1	2.77 Aa	5.55 Ac
TD1	2.77 Aa	4.16 Ac
SC1	2.77 Ba	6.94 Ac
TD2	2.77 Ba	8.33 Ab
TF1 2	2.77 Aa	5.55 Ac
SC2	2.77 Ba	9.72 Ab
CV (%)	42.3	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. AT: Ausência de *Trichoderma*; TF1 1: Suspensão de *T. virens*; TD 1: Suspensão de *T. harzianum*; SC 1: Suspensão de *T. harzianum*; TD 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. harzianum*; TF1 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. virens*; SC 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização *T. harzianum*; AP: Ausência do patógeno; PP: Presença do patógeno.

Outro mecanismo utilizado pelas espécies de *Trichoderma* spp. é a sua ação como promotor de crescimento, que ocorre pela indução da produção de giberelinas e de auxinas como AIA (HERMOSA et al., 2012), que favorece o desenvolvimento de raízes laterais. A colonização radicular resultante aumenta o crescimento e desenvolvimento da raiz e da área foliar, com capacidade de incrementar a produtividade das culturas e como consequência, permite à planta melhorar sua capacidade em suportar estresses abióticos, além de auxiliar na absorção e utilização de nutrientes (HARMAN et al., 2004).

Quanto a promoção de crescimento, entre a suspensão e a formulação liofilizada de *Trichoderma* spp. não houve interação significativa entre os fatores *Trichoderma* spp. e patógeno (Tabela 7) para a variável comprimento de raiz.

Tabela 7 - Atividade biológica do suspensão e formulação liofilizada de *Trichoderma* spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste causada por *M. phaseolina* sobre plantas de feijoeiro da cultivar IAC Veloz quanto ao comprimento de raiz.

<i>Trichoderma</i> spp.	Patógeno		Média
	AP	PP	
AT	20.22	16.77	18.50 b*
TF1 1	22.15	17.91	20.03 b
TD 1	20.77	22.22	21.50 b
SC 1	22.85	21.02	21.93 b
TD 2	23.42	23.22	23.32 a
TF1 2	25.92	22.97	24.45 a

SC 2	27.60	22.37	24.98 a
Média	23.27 A	20.93B	
CV (%)		15.04	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. AT: Ausência de *Trichoderma*; TF1 1: Suspensão de *T. virens*; TD 1: Suspensão de *T. harzianum*; SC 1: Suspensão de *T. harzianum*; TD 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. harzianum*; TF1 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. virens*; SC 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização *T. harzianum*; AP: Ausência do patógeno; PP: Presença do patógeno.

Quanto ao comprimento de raiz, apesar de não haver interação entre os fatores, foi possível observar que na maioria dos tratamentos onde *Trichoderma* spp. foi aplicado ocorreu incremento no crescimento das raízes das plantas. Ao observar-se as médias, os tratamentos SC 2, TD 2, TF1 2 foram responsáveis pelos maiores incrementos no comprimento de raiz em comparação com os demais tratamentos que não diferiram da testemunha com ausência de *Trichoderma* spp. Portanto os melhores resultados foram observados nos tratamentos que receberam as formulações liofilizadas de *Trichoderma* spp (Figura 2).

O processo de microencapsulamento de conídios do gênero *Trichoderma* através de matrizes de biopolímeros possibilita prolongar a vida útil das formulações, aumentam a estabilidade em campo e controlam a liberação microbiana, aumentando a eficácia do biocontrole. Além disso, conídios encapsulados necessitam menos aplicações do que suspensões de conídios simples, reduzindo custos (FRACETO et al., 2018).

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira Filho (2019), que ao realizar o tratamento de sementes de soja com *Trichoderma* spp., observou que o comprimento de raiz foi superior nas plantas tratadas com o antagonista. O crescimento das raízes promovido pelos isolados de *Trichoderma* spp. também pode estar relacionado a produção de metabólitos que podem interferir no índice mitótico, estimulando a divisão celular das raízes, e desta forma promover o crescimento das mesmas (AGUIAR et al., 2015).

Figura 2 - Plantas de feijoeiro sadias tratadas com *Trichoderma* spp. na presença e ausência do patógeno.



A: Planta de feijoeiro com presença de *M. phaseolina* tratada com *T. harzianum* (TD 2); B: Planta com presença de *M. phaseolina* tratada com *T. harzianum* (TD 1); C: Planta de feijoeiro sem presença de patógeno tratada com *T. harzianum* (SC 2).

Para a variável massa seca de raiz (Tabela 8) houve interação significativa entre os fatores *Trichoderma* spp. e patógeno. Entre os isolados avaliados sem (AP) e com (PP) presença de patógeno, todos os tratamentos diferiram entre si, com exceção do tratamento com ausência de *Trichoderma* spp. e *T. harzianum* proveniente da formulação comercial Trichodermil® liofilizado.

Foi possível observar na massa seca de raiz que os isolados microencapsulados ausentes de patógeno apresentaram as maiores médias, incrementando a massa seca de raiz das plantas. Na presença do patógeno causador da podridão cinzenta da haste, o isolado TD 2 apresentou o maior incremento de biomassa seca de raiz, diferindo-se estatisticamente da testemunha e dos demais tratamentos. Portanto é possível analisar que tanto na presença como na ausência do patógeno os isolados liofilizados foram capazes de incrementar a massa seca de raiz das plantas de feijoeiro.

Tabela 8 - Promoção de crescimento do suspensão e formulação liofilizada de *Trichoderma* spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste por *M. phaseolina* sobre plantas de feijoeiro, cultivar IAC Veloz, quanto a massa seca de raiz.

<i>Trichoderma</i> spp.	Patógeno	
	AP	PP

AT	0,81 Ab*	0,72 Ab
TF11	1,21 Aa	0,90 Bb
TD1	0,84 Ab	0,47 Bc
SC1	1,30 Aa	0,83 Bb
TD2	1,33 Aa	1,27 Aa
TF12	1,31 Aa	0,92 Bb
SC2	1,34 Aa	0,75 Bb
CV (%)	11.63	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. AT: Ausência de *Trichoderma*; TF1 1: Suspensão de *T. virens*; TD 1: Suspensão de *T. harzianum*; SC 1: Suspensão de *T. harzianum*; TD 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. harzianum*; TF1 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. virens*; SC 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização *T. harzianum*; AP: Ausência do patógeno; PP: Presença do patógeno.

A promoção de crescimento de plantas mediada por fungos do gênero *Trichoderma* spp. também pode estar diretamente relacionado as moléculas liberadas nas plantas ou um efeito indireto no impacto e modificação do ambiente envolvido por *Trichoderma*. Por exemplo, através da modificação do microbioma do solo ou reduzindo o pH do solo, tornando os macros e micronutrientes mais disponíveis para as plantas (TANDON et al., 2020).

A produção de biomassa por espécies de *Trichoderma* se deve pelo desenvolvimento de raízes laterais em função da produção de giberelinas e auxinas como o AIA (HERMOSA et al., 2012), que favorecem a absorção de nutrientes e conseguem suportar melhor estresses abióticos que eventualmente possam ocorrer.

Para a variável área foliar (Tabela 9) não houve interação significativa entre os fatores *Trichoderma* spp. e patógeno. É possível observar nas médias que o tratamento testemunha (AT) se diferenciou para os demais tratamentos, com exceção do tratamento TD 1 que não se diferiu da testemunha.

Tabela 9 – Promoção de crescimento do suspensão e formulação liofilizada de *Trichoderma* spp. no controle de podridão-cinzenta-da-haste por *M. phaseolina* sobre plantas de feijão-comum, cultivar IAC Veloz, quanto a área foliar.

<i>Trichoderma</i> spp.	Patógeno		Média
	AP	PP	
AT	45,39	35,73	40.56 c*
TF1 1	62,33	59,55	60.94 a
TD 1	43,94	45,65	44.80 c
SC 1	55,79	58,27	57.03 b
TD 2	57,26	55,48	56.37 b
TF1 2	63,20	47,16	55.19 b
SC 2	65,46	41,26	53.36 b

Média	56,20 A	49,09 B
CV (%)		26.2

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. AT: Ausência de *Trichoderma*; TF1 1: Suspensão de *T. virens*; TD 1: Suspensão de *T. harzianum*; SC 1: Suspensão de *T. harzianum*; TD 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. harzianum*; TF1 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização de *T. virens*; SC 2: Formulação microencapsulada pela técnica de liofilização *T. harzianum*; AP: Ausência do patógeno; PP: Presença do patógeno.

Estudos realizados por Moreira (2014) indicam a capacidade de aumento da área foliar em feijoeiro tratados com *Trichoderma* spp. em grande parte do ciclo fenológico da cultura, tendo uma maior porcentagem de acréscimo em área foliar obtido com o tratamento composto por *T. asperellum*. No presente estudo, os isolados *T. virens* com e sem a técnica de microencapsulação e os isolados à base de *T. harzianum* microencapsulados apresentaram as maiores médias para a variável área foliar. As avaliações que buscam a determinação e a capacidade de incremento de área foliar são essenciais para o entendimento relacionado ao desenvolvimento das plantas bem como o ambiente onde a mesma esteja estabelecida (JESUS JÚNIOR et al., 2001). Cabe ressaltar que no presente estudo, os isolados liofilizados não prejudicaram o desenvolvimento da área foliar das plantas de feijoeiro.

No presente estudo foi possível verificar que os isolados de *Trichoderma* spp. utilizam diferentes mecanismos de ação que atuam no controle de *M. phaseolina* *in vitro* e *in vivo*. Assim como Solino et al. (2017) visualizaram essa mesma perspectiva, afirmando que microrganismos que apresentam essas características, de possuir diferentes modos de ação, por exemplo, além de parasitar estruturas de fitopatógenos, produzem metabólitos de efeito fungistático ou fungicida, o que incrementa na ação de biocontrole.

5. CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichoderma* spp. microencapsulados proporcionaram maior redução crescimento micelial de *M. phaseolina* tanto no pareamento de culturas como por metabólitos voláteis.

A aplicação da microencapsulação pela técnica de liofilização não interferiu no crescimento e na eficiência dos isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *M. phaseolina* *in vitro*.

A aplicação de *Trichoderma* spp., na forma de suspensão ou formulação microencapsulada pela técnica de liofilização, via tratamento de sementes, foi capaz de reduzir os sintomas da podridão-cinzenta-da-haste, causada pelo patógeno *M. phaseolina* em feijoeiro.

O isolado de *T. virens* na forma de suspensão, apresentou efeito positivo no crescimento das raízes e no aumento da área foliar.

Os isolados microencapsulados apresentaram efeito positivo no crescimento das raízes e contribuíram para o aumento da área foliar das plantas de feijoeiro.

REFERÊNCIAS

- ABD-EL-KHAIR, H et al. Effect of *Trichoderma* species on *damping off* diseases incidence, some plant enzymes activity and nutritional status of bean plants. **Journal of American Science**, v.486 – 497, 2010.
- ADNAN, M. et al. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial pathogenesis*, v. 129, p. 7-18, 2019. Acesso em: 12 nov. 2020.
- AGUIAR, A. C. M. D. **Interferência e nível de dano econômico de milho voluntário em feijão**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria campus Frederico Westphalen. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Agricultura e Ambiente, RS. 111p., 2018.
- AGUIAR, A. R. et al. Efeito de metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o índice mitótico em células das pontas de raízes de *Allium* cepa. **Bioscience journal**, Uberlândia, v.31, n.3, p.934-940, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v31n3a2015-23292> >.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. eds. Manual de Fitopatologia. Volume 1 - Princípios e Conceitos. 4. ed. São Paulo: Ed. 4, 2018.
- ARAUJO, S. A.; BLUM, B. E. L.; FIGUEIREDO, C. C. Biochar and *Trichoderma harzianum* for the control of *Macrophomina phaseolina*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 62, 2019.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; SANTOS, A. R. B.; SILVA, P. H. S. da.; SILVA, K. J. D. Ocorrências de doenças fúngicas em feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) no Piauí. **Comunicado Técnico** 245. Teresina, PI. 2018.
- AUGUSTIN, A. M.; HEMAR, Y. Nano and micro structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, v. 38, p. 902 – 912, 2009. Disponível em: <[ubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2009/cs/b801739p?casa_token=9c4bRIPXRGUAAAAA:vPcyUO1oJ2cKFyrfII0_JXCQUb8p6yJyKjeFFlyhdqj0L8Rm0yPOXLzYQO9byP82qvOSltmkyx1gIPPY](https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2009/cs/b801739p?casa_token=9c4bRIPXRGUAAAAA:vPcyUO1oJ2cKFyrfII0_JXCQUb8p6yJyKjeFFlyhdqj0L8Rm0yPOXLzYQO9byP82qvOSltmkyx1gIPPY)>. Acesso em: 12 dez. 2021.
- BAE, S.J.; MOHANTA, T.K.; CHUNG, J.Y.; RYA, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S.B.; SEO, H.; BAE, D.W.; BAE, I.; KIM, J.J.; BAE, H. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. **Biological Control**, v. 92, p. 128-138, 2016.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249- 260, 2004. Disponível em. Acesso em: 16 mai. 2020.
- BETTIOL. W.; SILVA da C. J.; CASTRO de P. M. L. M. Uso atual e perspectivas do *Trichoderma* no Brasil. In: MEYER C. M.; MAZARO M. S.; SILVA da C. J. *Trichoderma: Uso na agricultura*. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **EMBRAPA SOJA**, 2019. Disponível em: <[file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/livrotrichodermaonline06.01.20%20\(5\).pdf](file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/livrotrichodermaonline06.01.20%20(5).pdf)> Acesso em: 24 maio 2020.

BIANCHINI, A; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, B. S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H. et al. (EE). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. V.2, 4 ed. São Paulo, 2005. cap.37, p.333-349.

BAIYEE, B. et al. *Trichoderma asperellum* T1 mediated antifungal activity and induced defense response against leaf spot fungi in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.106, p.96-101, 2019. Disponível em: <ciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0885576518303047?casa_token=OrMKI4LQRzkAAAA:BBCCm_ijnFDQXHxuuJNlsPM8NTTaRs2unkVP6T3TknBFGVc7JhUt9FdJclVIDAgt6-on2irQF7sg#bib31>. Acesso em: 10 jan. 2022.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C de O. (EE). Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. 1 ed. Santo Antônio de Goiás, GO – Embrapa Arroz e Feijão – **Documentos** (INFOTECA-E). 2012, 248 p. Disponível em: <https://www.cnpaf.embrapa.br/transferencia/informacoestecnicas/publicacoesonline/seriedoc>. Acesso em: 10 jan. 2022.

BARBOSA, R. F., et al. Sistemas de produção Integrada do feijão-comum na região central brasileira. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2018. Acessado em: 06 jan. 2022.

BORGES, D. I.; ALVEZ, E.; MORAES, M. B. de.; OLIVEIRA, D. F. Efeitos de extratos e óleos essenciais de plantas na germinação de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, n. 3, p. 325 – 331, 2013.

BISUTTI, I.L.; HIRT, K.; STEPHAN, D. Influence of different growth conditions on the survival and the efficacy of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* strain Pf153 **Biocontrol Science and Technology**, v25, n.11, p.1269-1284, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09583157.2015.1044498?casa_token=ewMkSxfwc3IAAAAA%3A-SGWwdC-AKjeb50A2lei1kWv831KeaMlFsZrVqaFB_p3vGB_Iopj8iejnQst_f9GFIH4Q91bBghhpAP1>. Acesso em: 10 jan. 2022.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley e Sons, 1990. 532p.

CRUCIOL, G.C.D.; COSTA, M.L.N. Influência de metodologias de inoculação de *Macrophomina phaseolina* no desempenho de cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, p.32-37, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2649400/>. Acesso em: 24 abr. 2020.

CAO, L.; XU, Q.; XING, Y.; GUO, Y.; LI, W.; CAI, Y. Effect of skimmed milk powder concentrations on the biological characteristics of microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* by vacuum spray freeze drying. **Drying Technology**, v. 38, n. 4, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373937.2019.1581797?casa_token=oCRnc5saDQcAAAAA%3AgJRzc1t4yntCb1DoLHjNp8q7-rqvRs4K-wV-4_SYOyRNdXzv-Ej1Up5KXiiYt2I8KLPK8-YuFCNL5vHH&journalCode=ldrt20>. Acesso em: jan.2020.

- CARVALHO, D. D. C.; JUNIOR, M. L.; MARTINS, I.; INGLIS, P.W.; MELLO, S.C.M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v. 39(5), p. 384-391, 2014.
- CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, v. 9, p. 685-290, 2006.
- CARVALHO, J. J.; SAAD, J. C. C.; BASTOS, A. V. S.; NAVES, S. S.; SOARES, A. L.; VIDAL, V. M. Teor e acúmulo de nutrientes em grãos de feijão comum em semeadura direta, sob déficit hídrico. **Irriga Brazilian Journal of irrigation and drainage**, v. 1, n. 1, p.104-117, 2014. Disponível em < <http://revistas.fca.unesp.br/index.php/irriga/article/view/1686>> .Acesso em: 01 mai. 2020.
- CASSIDY MB, LEE H, TREVORS JT. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. **Journal of Industrial Microbiology**, n. 16, p. 79–101, 1996.
- CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Agri-Environmental Sciences**, v. 4, n. 2, p. 9-15, 2018. Disponível em: < <https://revista.unitins.br/index.php/agri-environmental-sciences/article/view/420>>. Acesso em: 02 out. 2019.
- COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. 2.ed. Florianópolis: Epagri, 2012. 157p.
- CONAB. Quinto levantamento de acompanhamento da safra brasileira de grãos/ 21, 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos>>. Acesso em: 15 de jan. De 2022.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species - groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, Manchester, v. 57, p. 363 - 369, 1971. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153671800505>>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Monografia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 166 f. 1978.
- DIDONET, A. D.; SILVA, C. S. Elementos climáticos e produtividade do feijoeiro, **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p.13-20. 2004.
- ESLAHI, N. et al. The profile change of defense pathways in *Phaseolus vulgaris* L. by biochemical and molecular interactions of *Trichoderma harzianum* transformants overexpressing a chimeric chitinase. **Biological Control**, v. 152, p. 104304, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104304>>. Acesso em: 06 jan. 2022.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Estresse de água e temperatura na cultura do feijão. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (ed.) **Feijão irrigado: estratégias básicas de manejo**. Piracicaba: Publique, p. 155-169, 1999.
- FAOSTAT. **Crop**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/%23data/QC>. Acesso em janeiro de 2022.

FIALHO, R. de O.; PAPA, M. de F. S.; CERESINI, P. C. Doenças. In: ARF, O. et al. (EE). **Aspectos gerais da cultura do feijão**. Botucatu: FEPAF, 2015. p.253-282.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A. P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A. P.; BARATTO, C. M.; KOGLER, V.; SILVA, M. V.; DUTRA, V.; NAKAZOTO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.23, p.32-37, 2001.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510 – 523, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224410001925?casa_token=3nMtFPrJuqMAAAAA:BRcj9OkL6TwSnW9eFaYzPfvE0QGugeoP4ZUaDAW_F6oRBOQZ5e4tTDojoIqWKAB4xNH3p5ns2Vt>. Acesso em: 12 dez. 2021.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542011000600001>. Acesso em: 01 abr. 2020.

FRACETO, L.F.; MARUYAMA, C.R.; GUILGER, M.; MISHRA, S.; KESWANI, C.; SINGH, H.B. *et al.* Trichoderma harzianum-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 93, p. 2056 - 2063, 2018.

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

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, 40, p. 1107–1121, 2007.

GURR, G., WRATTEN, S. **Biological Control: Measures of Success**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000.

GUPTA, G.K.; SHARMA, S.K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v.160, p.167–180, 2012.

HAN, P. Optimization of the freeze-drying of marine yeast *Sporidiobolus pararoseus* ZMY-1 for its application in biocontrol of fungal infections, **Biological Control**, v.161, 2021.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plants symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43, 2004. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro797>>. Acesso em: 16 mai. 2020.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; ESCUDERO, I. R.; ASENSIO A. C.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Encapsulation of the *Bacillus thuringiensis* secreted toxins Vip3Aa and CryIIa in *Pseudomonas fluorescens*. **Biological Control**, v. 66, p. 159-165, 2013.

HOKKANEN, H.M.T. Success in classical biological control. **Crit. Rev. Plant Sci.** 3, 35–73, 1985.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology** v.158, p.17–25, 2012.

HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying Technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, n. 1, p. 65-71, 2004b. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/248592684_Comparison_of_three_commonly_used_drying_technologies_with_respect_to_activity_and_longevity_of_aerial_conidia_of_Beauveria_brongniartii_and_Metarhizium_anisopliae. Acesso em: 22 mai. 2020.

IXTAINA, V.Y.; JULIO, L.M.; WAGNER, J.R.; NOLASCO, S.M.; TOMÁS, M.C. Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. **Powder Technology**, v. 271, p. 26-34, 2015.

JARQUE, S.; BITTNER, M.; HILSCHEROVA, K. Freeze-drying as suitable method to achieve ready-to-use yeast biosensors for androgenic and estrogenic compounds, **Chemosphere**, v.148, p. 204 -210, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516300376?casa_token=1nnQeh37RZEAAAAA:sldCaM9YK4z6AH_FcA00rMPeWM1F8qgykuZFNr6IRO0bDvDXygJnqOdTCdp9qvmqkRrVQtCwWmuG>. Acesso em: jan. 2022.

Jl, S. et al. *Trichoderma* biofertilizer (mixTroTha) mediates *Malus sieversii* resistance to *Alternaria alternata*. **Biological Control**, v. 156, p. 104539, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964421000098?casa_token=VoLTMBeoqr8AAAAA:K1D26Bkhpn4IXGYnd7sPpGlFh4YjqxZjl0NRBxrs6IDLt5XxcYDvD7B3_x-SHBuKeJppVtuHhGjD>. Acesso em: 06 jan. 2022.

KOTZ, J. E. S. et al. Isolamento e seleção de rizobactérias para o biocontrole de *Macrophomina phaseolina*. In: VI Jornada de iniciação científica e tecnológica, 2016, Cerro Largo/RS. **Anais VI Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica**. Cerro Largo/RS: Universidade Federal da Fronteira Sul, 2016.

JÚNIOR, T. J, de P.; VIEIRA, R. F.; ZAMBOLINI, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro, **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 99. 2004.

JESUS JÚNIOR, W. C.; VALE, F. X. R.; COELHO, R. R.; COSTA, L. C. Comparison of two methods for estimating leaf area index on common bean. **Agronomy Journal, Madison**, v. 93, n. 5, p. 989-991, 2001.

JEYASEELAN, E. R.; THARMILA, S.; NIRANJAN, K. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. **Archives of Applied Science Research**, v. 4, n. 4, p. 1623-1627, 2012.

LABUSCHAGNE, P. Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. **Food Research International**, v. 107, p. 227-247, 2018.

LARENA, I.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, abiological control agente against *Fusarium wilt* of tomato. *Journal of Phytopathology*, v. 151, p. 600-606, 2003. Disponível em Acesso em: <http://www.researchgate.net/publication/229470859_Drying_of_Conidia_of_Penicillium_o> 16mai. 2020.

LUANGTHONGKAM, P.; BLINCO, A. J.; DART, P.; CALLAGHAN, M.; SPEIGHT, R. Comparison os spray drying and feeze drying for inoculum production of the pobiotic *Bacillus amyloliquefaciens* strain H57. **Food and Bioproducts Processing**, v. 130, p. 121 – 131, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308521001450?casa_token=nzIcBtfzcrQAAAAA:M_jvyeZkAlGUpviQGL9Y1HfXwTO70L21ygBYTTja42d2O2SO45r0hSoHf1RChw2JHyMmiCr2KiIo>. Acesso em: 06 jan. 2022.

LANDAU, E. C.; MOURA, L. Evolução da produção de feijão (*Phaseolus vulgaris*, Fa baceae). Embrapa Milho e Sorgo Capítulo em livro científico (ALICE), 2020.

LI, Q.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G.; HSIANG, T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biol. Control**, v.61, p.113–120, 2012.

LOBO JUNIOR, M. Controle de Podridões Radiculares no Feijoeiro Comum com o Fungicida Microbiano *Trichoderma*. In: Tarcísio Cobucci; Flávio Jesus Wruck. (Org.). Resultados obtidos na Área Pólo de Feijão no período de 2002 a 2004. Santo Antônio de Goiás, GO: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2005, p. 13-17.

LOCATELLI, G.O.; DOS SANTOS, G.F.; BOTELHO, P.S.; FINKLER, C.L.L.; BUENO, L.A. Desenvolvimento de *Trichoderma* sp. formulações em grânulos encapsulados (GC) e avaliação da vida útil dos conídios. **Biol. Controle**, v.117, p.21-29, 2018.

LOPES, A.R.; DE, O., LOCATELLI, G.O.; BARBOSA, R.; DE, M.; LOBO, M. JUNIOR; *et al.* Preparation, characterisation and cell viability of encapsulated *Trichoderma asperellum* in alginate beads. **J. Microencapsul**, .37, p.270-282, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652048.2020.1729884>>. Acesso em: jan. 2022.

LI-LI, S. *et al.* Preparation and fungicidal bioactivity fo wetttable poder formulations of *Trichoderma asperellum*. **Journal of Beijing Forestry University**, v.37, n.6, p.45-52, 2015. Disponível em: <<http://j.bjfu.edu.cn/en/article/doi/10.13332/j.1000-1522.20140438>>. Acesso em: 06 jan. 2022.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. da; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

- MA, X.; XIAOBING, W.; CHENG, J.; NIE, X.; YU, X.; ZHAO, Y.; WANG, W. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biological Control*, v. 90, p. 34-41, 2015.
- MA, YINGYING; GAO, JIN; JIA, WANKUI; LIU, YANGYANG; ZHANG, LANYING; YANG, QIYING; GUO, JUAN; ZHAO, JUAN; YAN, BEIBEI; WANG, YANCAI. A Comparison of Spray drying and Freeze-Drying for the Production of Stable Silybin Nanosuspensions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 20, 6, 3598-3603, 2020.
- MANOS, M. G. L.; OLIVEIRA, M. G. De C.; MARTINS, C. R. (EE). **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro comum na região Nordeste Brasileira 2013-2014/17ª Reunião de Comissão Técnica Norte/Nordeste Brasileira de Feijão – CNTNBF**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1 ed. 2013. 199p.
- MENEZES, C. R. et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, dez. 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/8DyQPZQNwQTQJb74ypK6B7r/?lang=pt&format=html>>. Acesso em: 01 mai. 2020.
- MENEZES, J. R. de. Manejo da cultura de feijão: enfoque sistêmico. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DE FEIJÃO IRRIGADO, 4., Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, Departamento de Produção Vegetal, p.35-42. 2001.
- MENEZES, M.; MACHADO, A. L. M.; SILVEIRA, M. C. V.; SILVA, R. L. X. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* com espécies de *Trichoderma* aplicadas no tratamento de sementes de feijão e no solo. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas**, Recife, v.1, p.133-140, 2004.
- MONTEIRO, T. S. A. **Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans***. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, para obtenção do título de Magister Scientiae. p. 21, 2013.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. *Crop Science*, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962. Disponível em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/2/2/CS0020020176>>
- MALIK, G., *et al.* Eficácia de *Trichoderma harzianum* após multiplicação em diferentes substratos no controle de fungos da podridão radicular. **Revista Internacional de Biologia e Biotecnologia**, v.2, p.237 – 242, 2005.
- MARUYAMA, Cintia Rodrigues et al. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control. **Front. Bioeng. Biotechnol**, v.8, n.225, mar.2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/192985>. Acesso em: 04 mar. 2020.
- MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, v. 26, n.5, p.195-2018, 1923. Disponível em: <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43967086/PDF> . Acesso em: 5 fev. 2021

MEDEIROS, da S. M. *et al.* *In vivo* antagonismo of *Fusarium oxysporum f. sp. Phaseoli*, and growth promotion in common bean (*Phaseolus vulgaris*) (Fabaceae) by *Trichoderma* spp.. **Journal of Global Ecology and Environment**, v. 14, n. 3, p.1-6, 2022.

MOREIRA, S. S. **Aspectos do desenvolvimento em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados com *Trichoderma* spp.** 2014. 85f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

MAYO, S. *et al.* Development of a qPCR strategy to select bean genes involved in plant defense response and regulated by the *Trichoderma velutinum*–*Rhizoctonia solani* interaction. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1109, 2016.

MORAIS, A. R. V.; ALENCAR, É. N.; XAVIER JÚNIOR, F. H.; OLIVEIRA, C. M.; MARCELINO, H. R.; BARRATT, G.; FESSI, H.; EGITO, E. S. T.; ELAISSARI, A. Freezedrying of emulsified systems: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 503, p. 102-114, 2016.

OLIVA, A.; LAHOZ, R.; CONTILLO, G. Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extract and its alelo chemicals **J. Chem. Ecol.**, v. 25, p. 519-526, 1999.

POHLMANN *et al.* Estimation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) leaf area by a non-destructive method. **Semina: Ciências agrárias**, v. 42, n.4, p. 2163-2180, 2021.

OLIVEIRA FILHO, F. G. D. **Uso de isolados e produto biológico comercial de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de plantas na fase inicial da cultura da soja.** Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Agronomia – Centro Universitário Anápolis – UniEVANGÉLICA, 2019.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumissativus* L.) e pimentão (*Capsicumannum* L.).** 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 1991.

OZKAN, G.; FRANCO, P.; DE MARCOB I., XIAO, J.; CAPANOGLU, E. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. **Food Chemistry**, v. 272, p. 494-506, 2019.

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review **Mater. Sci. Eng.**, v.77, p.1327-1340, 2017.

PEARSON, D. E.; CALLAWAY, R.M. Indirect effects of host-specific biological control agents. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18 (9), p. 456-460. 2003.

PEDRO, E. A. S. *et al.* Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1589-1595, 2012. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2012001100005&script=sci_abstract&tlng=pt >. Acesso em: 16 jan. 2022.

POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. v. 33, p. 243-255, 2013.

PEREIRA, V. GRIS, D. J., MARANGONI, T., FRIGO, J. P., AZEVEDO, K. D., & GRZESIUCK, A. E. et al. Exigências agroclimáticas para a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Cascavel, v.3, n.1, p.32-42, 2014.

RIBEIRO, F. E. et al. **Recomendações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum (Phaseolus vulgaris L.) nas regiões Norte e Nordeste do Brasil**. Circular Técnica Embrapa Arroz e Feijão. N. 89. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2011.

ROHRIG, B. **Bioprospeccção de bactérias, isoladas de diferentes sistemas de cultivo, para o controle de patógenos habitantes de solo da cultura do feijão**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal da Fronteira Sul, curso de agronomia, Cerro Largo, RS. 51 p.,2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**. 2019. Disponível em <http://www.r-project.org/>.

ROHRIG, B. **Bioprospeccção de bactérias, isoladas de diferentes sistemas de cultivo, para o controle de patógenos habitantes de solo da cultura do feijão**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal da Fronteira Sul, curso de agronomia, Cerro Largo, RS. 51 p.,2016.

RUVIMBO, M.M.; CHAIBVA, P.; TAKAWIRA, M.; NJENI, P. Avaliação de *Trichoderma harzianum* no controle do tombamento (*Pythium* spp) em variedades de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) . **Annals of Biological Research** , v.7, n.6, p.6 – 11, 2016.

SANTOS, J. B. Dos; GAVILANES, M. L.. Botânica. In: VIERA, C.; PAULA JUNIOR, J. T. de; BORÈM, A.. **Feijão**. 2. Ed. Viçosa: 2011. p. 41-65.

SRIS, J.; SEETHADEVI, A.; SURIA PRABHA K.; MUTHUPRASANNA, P.; PAVITRA, P. Microencapsulation: A Review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.3, p. 509–531, 2012.

SAWANT, I.S.; WADKAR, P.N.; GHULE, S.B.; RAJGURU, Y.R.; SALUNKHE, V.P.; SAWANT, S.D. Enhanced biological control of powdery mildew in vineyards by integrating a strain of *Trichoderma harzianum* with Sulphur. **Biological Control**, v. 114, p.133-143, 2017.

SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos. **Documentos: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília – DF, dez. 2007.

SOLINO, A. J. da S. et al. Antagonistic potential and in vitro control of *Alternaria solani* by saprobic fungi. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 3, p. 199-204, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2202>>. Acesso em: 2 jan. 2022.

SILVA, de A. F.; VIEIRA, de O. V.; SILVA da, C. R.; PINHEIRO, G. D.; SOARES, A. M. Introduction of *Trichoderma* spp. biocontrol strains against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary change soil microbial community composition in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivation. **Biological control**, v.163, 2021. Disponível em: <

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964421002243?casa_token=He6rOF8w6R8AAAAA:Gx7O5d5Ygx0-oqs04CFKYk-H6brhPaj_s4XFifERaWD2EcbvdScJ5z4LtfB1UxL1GfvyJZMCRew->. Acesso em: 06 jan. 2022.

SILVEIRA, P. M.; STONE, L. F. Requerimento de água. In: SILVEIRA, P. M.; STONE, L. F. (Eds). Irrigação do feijoeiro. Santo Antônio de Góias: **Embrapa Arroz e Feijão**, 230p. Spectrometry. v. 15, p. 203-209, 2001.

SARZI, Janaina Silva. **Trichoderma spp. no biocontrole de *Macrophomina phaseolina* e no crescimento de feijoeiro**. 2019. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências: Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2019.

SCHOONHOVEN, A. V.; PASTOR-CORRALES, M. A. Standard system for the evaluation of bena germplasm. Cali: **CIAT**, 1987. 54p.

SOUZA, C.M.D.; ALCANTARA, C.B.D. Cruzamento entre cultivares de feijão BRS-Majestoso e IAC-Imperador pelo método da hibridação. **Revista educação, saúde & meio ambiente**, v.1, Ano.4, n.7, 2020.

TANDON, A. *et al.* Fosfato Solubilização por *Trichoderma Koningiopsis* (NBRI-PR5) sob Condições de Estresse Abiótico. **J. King Saud. Univ. Sci.**, v.32, p.791-798, 2020.

TROIAN, R. F.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. A. S.; ARRUDA, W.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. **Biotechnology Letters**, v. 2, p. 1-6, 2014.

TEIXEIRA, H. *et al.* *Trichoderma* spp. decrease *Fusarium* root rot in common bean. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, p. 334-336, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/sp/a/m37KLvzDxwsBMprzJnJLBSg/?format=pdf&lang=en>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

TOMAZELI, V. N.; SANTOS, I.; MORALES, R. G. F. Resíduos orgânicos para o controle das doenças do feijoeiro causadas por *Sclerotium rofsi*. **Ambiência**. Guarapuava, v.7, n.1, p. 65-74, 2011.

TOEGEL, S.; SHARAREH, S. B.; HORACZEK, A. C.; VIERNSTEIN, H. Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 1, p. 16 – 23, 2010.

VIEIRA JR., J. A. L. *et al.* Redução do rendimento de grãos causado por podridões radiculares em lavouras de feijão no município de Lages, Santa Catarina, safra 2013/14. **Summa Phytopathologica**, v. 43, Botucatu, 2017. Disponível em: <http://www.summanet.com.br/summanet-site/congressos/2017/Resumos/Resumo40CPFito_173.pdf>. Acesso em: 25 de jan. 2021.

VILA, G. A.; USALL, J.; TORRES, R.; ABADIAS, M.; TEIXIDÓ, N. Formulation of the biocontrol agente *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using diferente approaches: liquid, freeze-

drying and fluid-bed spray-drying, *BioControl*, v. 62, p. 545 – 555, 2017. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10526-017-9802-3>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

VEMMER, M.; PATEL, A.V. Revisão de métodos de encapsulamento adequados para agentes de controle biológico microbiano. **Biol. Controle**, v.67, p.380-389, 2013.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 80-86, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2008.05.005>>. Acesso em: 06 jan. 2022.

WAAGE, J. Global developments in biological control and the implications for Europe. *EPPO Bull.* v. 27, p. 5-13, 1997.

WENDLAND, A; LOBO JUNIOR, M; FARIA, J. C. de. **Manual de Identificação das Principais Doenças do Feijoeiro-Comum**. 1. ed. Brasília: Embrapa 49 p.2018.

WOO, S.L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. **The Open Mycology Journal**, v.8, p.71–126, 2014.

YASSIN, M. T. et al. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* strains against some fusarial pathogens causing stalk rot disease of maize, in vitro. **Journal of King Saud University-Science**, p. 101363, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101363>. Acesso em: 06 jan. 2022.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1405, 2016. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01405/full>>. Acesso em: 17 dez. 2021.

ZHU, J.; WANG, J.; DING, Y.; LIU, B.; XIAO, W. A systems-level approach for investigating organophosphorus pesticide toxicity. **Ecotoxicol. Environ.**, v.149, p.26–35, 2018