

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

Janaina Silva Sarzi

***Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DE *Macrophomina*
phaseolina E NO CRESCIMENTO DE FEIJOEIRO**

Santa Maria, RS
2019

Janaina Silva Sarzi

***Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DE *Macrophomina phaseolina* E NO
CRESCIMENTO DE 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 de **Mestre em Agronomia**

Orientadora: Dra. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS
2019

Sarzi, Janaina Silva
Trichoderma spp. no biocontrole de Macrophomina
phaseolina e no crescimento de feijoeiro / Janaina Silva
Sarzi.- 2019.
64 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2019

1. Phaseolus vulgaris 2. Controle biológico 3.
Filtrados de cultura 4. Metabólitos secundários I. Muniz,
Marlove Fátima Brião II. Título.

Janaina Silva Sarzi

***Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DE *Macrophomina phaseolina* E NO
CRESCIMENTO DE 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 de **Mestre em Agronomia**

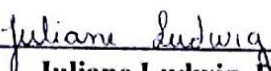
Aprovado em 18 de fevereiro de 2019:



Marlove Fátima Brião Muniz, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Márcio Antônio Mazutti, Dr. (UFSM)



Juliane Ludwig, Dra. (UFFS)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar presente, pela força e fé para superar todos os desafios.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelo acolhimento e oportunidades oferecidas durante todos estes anos, bem como a todos os professores que fizeram parte da minha formação.

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!

Ao professor Dr. Márcio Mazutti e à equipe do Laboratório Biotech Factory do Departamento de Engenharia Química, pela disponibilidade e parceria, pelo conhecimento e experiências compartilhadas para a realização dos trabalhos.

Aos meus pais, Elvio João Sarzi e Jeneci Silva Sarzi, minhas irmãs Juliana Silva Sarzi e Jaqueline Silva Sarzi Haas, 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 junto comigo nesta caminhada. Amo vocês!

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!

Ao Cristiano Bellé pelo auxílio na extração de DNA dos isolados fúngicos e interpretação dos dados, pela parceria e conhecimentos compartilhados.

Aos novos e velhos amigos que estiveram comigo nesse período, agradeço pelo carinho, amizade e apoio para seguir sempre em frente, até o fim!

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Colônias de *T. virens* (TF1) (A) e *T. harzianum* (B) em meio batata-dextrose-ágar (BDA) 33
- Figura 2- Dendrograma baseado no método Maximum Likelihood Tree derivado das sequências da região do fator de alongação (TEF1- α), com base em 1000 réplicas de bootstrap, do isolado TF1 (*Trichoderma virens*) e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap* 34
- Figura 3- Dendrograma baseado no método Maximum Likelihood Tree derivado das sequências da região do fator de alongação (TEF1- α), com base em 1000 réplicas de bootstrap, do isolado PEL (*Macrophomina phaseolina*) e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados da família *Botryosphaeriaceae*. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap* 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tratamentos dos meios de cultura líquido compostos por sacarose, água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), concentração de esporos, agitação do meio e o potencial de hidrogênio (pH) ajustado para cada tratamento, para o crescimento dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	23
Tabela 2- Composição dos tratamentos de acordo com a aplicação do antagonista nas sementes e inoculação do patógeno via substrato ou contato direto com a semente.	29
Tabela 3- Características morfológicas de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA)	32
Tabela 4- 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 pareamento de culturas	36
Tabela 5- Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e percentual de inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> confrontada com <i>Trichoderma</i> spp. no teste de metabólitos voláteis	37
Tabela 6- Biomassa fúngica seca de filtrados de cultura de <i>T. virens</i> e o efeito dos filtrados no crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i>	39
Tabela 7- Biomassa fúngica seca de filtrados de cultura de <i>T. harzianum</i> e o efeito dos filtrados no crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i>	40
Tabela 8- Atividade de quitinase dos filtrados de cultura de <i>Trichoderma</i> spp. em função dos tratamentos em meio de cultura líquido compostos por sacarose, água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), concentração de esporos, agitação do meio e o potencial de hidrogênio (pH) ajustado para cada tratamento	41
Tabela 9- Atividade de β -1,3-glucanases dos filtrados de cultura de <i>Trichoderma</i> spp., na condição 4 (pH 5, agitação de 180 rpm, 100g.L ⁻¹ de sacarose e 10 ⁷ conídios.mL ⁻¹) para <i>T. virens</i> (TF1) e condição 8 (pH 5, agitação de 100 rpm, 50g.L ⁻¹ de sacarose e 10 ⁵ conídios.mL ⁻¹) para <i>T. harzianum</i>	42
Tabela 10- Identificação dos três principais componentes presentes no filtrado de cultura de <i>Trichoderma virens</i> (TF1) (isolado de solo rizosférico de feijoeiro) extraídos com quatro solventes: hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) (min), a unidade área (UA) e a área (%).....	44
Tabela 11- Identificação dos três principais componentes presentes no filtrado de cultura de <i>Trichoderma harzianum</i> (proveniente do produto comercial Ecotrich) extraídos com quatro solventes: hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) (min), a unidade área (UA) e a área (%).....	45
Tabela 12- Atividade biológica de organismo vivo e filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp. sobre germinação de sementes e plântulas de feijoeiro.....	46
Tabela 13- Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) na cultura do feijoeiro, cultivar IPR Graúna, tratada com organismo vivo e filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp. no controle da podridão cinzenta do caule causada por <i>M. phaseolina</i>	48
Tabela 14- Índice de doença (ID) aos 10 dias após a semeadura da cultura do feijoeiro cultivar IPR Graúna, tratada com organismo vivo e filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp. no controle da podridão cinzenta do caule causada por <i>M. phaseolina</i>	49
Tabela 15- Índice de doença (ID) aos 20 dias após a semeadura da cultura do feijoeiro cultivar IPR Graúna, tratada com organismo vivo e filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp. no controle da podridão cinzenta do caule causada por <i>M. phaseolina</i>	50

Tabela 16- Atividade biológica de organismo vivo e filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp. sobre plantas de feijoeiro.....	51
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO	13
2.2 DOENÇAS DA CULTURA DO FEIJOEIRO	14
2.2.1 <i>Macrophomina phaseolina</i>	15
2.3 CONTROLE DE PATÓGENOS HABITANTES DO SOLO	16
2.3.1 Controle biológico de patógenos habitantes do solo	17
2.3.2 <i>Trichoderma</i> spp. no controle biológico de doenças e promoção do crescimento das plantas	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 LOCALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	20
3.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	20
3.2.1 Origem e caracterização dos micro-organismos	20
3.2.2 Identificação molecular dos isolados PEL e TF1	21
3.2.3 Pareamento de culturas e metabólitos voláteis	22
3.2.4 Produção de filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes meios de cultura	23
3.2.5 Metabólitos não voláteis e enzimas de <i>Trichoderma</i> spp. na inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i>	24
3.2.7 Determinação da atividade de β -1,3-glucanase	25
3.2.8 Análise cromatográfica dos compostos presentes no filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp.	26
3.2.8.1 Procedimento de extração	26
3.2.8.2 Equipamentos e procedimento para cromatografia gasosa	26
3.3 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	27
3.3.1 Atividade biológica de filtrado de cultura e organismo vivo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre plântulas de feijoeiro	27
3.3.2 <i>Trichoderma</i> spp. na redução da severidade de <i>M. phaseolina</i> e no crescimento de plantas de feijoeiro	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	32
4.1.1 Caracterização morfológica dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	32
4.1.2 Identificação molecular dos isolados PEL e TF1	33
4.1.3 Pareamento de culturas e metabólitos voláteis	35
4.1.4 Metabólitos não voláteis e enzimas de <i>Trichoderma</i> spp. na inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i>	38
4.1.6 Atividade de β -1,3-glucanase	41
4.1.7 Análise cromatográfica dos compostos presentes no filtrado de cultura de <i>Trichoderma</i> spp.	43
4.2 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	46
4.2.1 Atividade biológica de filtrado de cultura e organismo vivo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre plântulas de feijoeiro	46
4.2.2 <i>Trichoderma</i> spp. na redução da severidade de <i>M. phaseolina</i> e promoção de crescimento em feijoeiro	47
5 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

RESUMO

***Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DE *Macrophomina phaseolina* E NO CRESCIMENTO DE FEIJOEIRO**

AUTORA: JANAINA SILVA SARZI

ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Macrophomina phaseolina é um dos principais patógenos do feijoeiro, causando a doença conhecida como podridão cinzenta, é disseminado via sementes e pode atacar diversas espécies de plantas. Esse patógeno é de difícil controle, por produzir estruturas de resistência que lhe permitem permanecer viável no solo por um longo período de tempo. Diante disso, o uso de práticas como a rotação de culturas apresenta baixa eficiência de controle, no entanto, a utilização de organismos antagonistas pode ser uma medida efetiva no manejo desse patógeno, auxiliando também na promoção do crescimento das plantas. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *M. phaseolina* e no crescimento de plantas de feijoeiro, bem como identificar os compostos produzidos por *Trichoderma* spp. com potencial fungicida. Para tanto, foram utilizados dois isolados de *Trichoderma* spp., um proveniente de formulação comercial e outro isolado de solo rizoférico de feijoeiro, e dois isolados patogênicos de *M. phaseolina*. Analisou-se a ação antagônica de *Trichoderma* spp. sobre *M. phaseolina* por meio de pareamento de culturas e metabólitos voláteis e após, determinou-se o meio de cultura líquido mais adequado para o cultivo do antagonista quanto ao crescimento e atividade no biocontrole *in vitro* de *M. phaseolina*. Os filtrados de cultura e os organismos vivos dos isolados de *Trichoderma* spp. foram utilizados no tratamento de sementes para avaliação da promoção de crescimento das plantas. Para avaliar o controle da doença, foi feita a aplicação do filtrado de cultura, bem como os esporos dos organismos vivos do antagonista nas sementes, e a inoculação do patógeno via substrato ou contato direto com a semente. Por fim, foi realizada a identificação dos compostos com potencial fungicida produzidos pelo antagonista por meio de análises em espectrofotômetro e cromatografia gasosa. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes em controlar o crescimento micelial de *M. phaseolina* tanto no pareamento de culturas como por metabólitos voláteis. Ambos os isolados de *Trichoderma* spp. produziram quitinase e somente *T. harzianum* produziu β -1,3-glucanase. Isolados de *Trichoderma* spp. cultivados em meio líquido produziram oxidrilas e ácidos graxos descritos na literatura com potencial fungicida e de indução de respostas de defesa em plantas. A aplicação de *Trichoderma* spp., vivo ou filtrado, via tratamento de sementes, foi capaz de controlar a doença podridão cinzenta do caule, causada por *M. phaseolina* em feijoeiro. *T. virens* possui efeito positivo sobre o crescimento das raízes de feijoeiro.

PALAVRAS-CHAVE: *Phaseolus vulgaris*. Controle biológico. Filtrados de cultura. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

***Trichoderma* spp. IN THE BIOCONTROL OF *M. phaseolina* AND IN COMMON BEAN GROWTH**

AUTHOR: JANAINA SILVA SARZI

ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Macrophomina phaseolina is one of the main pathogens of common bean, causing the disease known as charcoal rot, it is disseminated through seeds and able to attack many species of plants. It is a difficult pathogen to control, since it produces resistance structures that allow it to remain viable in the soil for a long period of time. Therefore, the use of practices such as crop rotation present low control efficiency, however, using antagonist organisms may be an effective measure in handling this pathogen, while also aiding in plant growth promotion. Thus, the aim of this work has been to evaluate *Trichoderma* spp. action in the biocontrol of *M. phaseolina* and in common bean plant growth, as well as identifying composts produced by *Trichoderma* spp. with potential fungicide. In order to do so, two *Trichoderma* spp. isolates were used, one of commercial formulation, and one of common bean rhizospheric soil, as well as two pathogenic isolates of *M. phaseolina*. The antagonistic action of *Trichoderma* spp. over *M. phaseolina* was evaluated through pairing of cultures and volatile metabolites, the most adequate means of liquid culture for cultivating the antagonist as well as growth and activity in *in vitro* biocontrol of *M. Phaseolina* have been determined subsequently. Culture filtrates and living organisms of *Trichoderma* spp. isolates were used in the treatment of seeds for evaluating growth promotion. In order to evaluate disease control, application of filtrate culture has been made, along with spores of living organisms of the antagonist in seeds as well as inoculation of the pathogen by substrate or direct contact with the seed. Lastly, identification of composts with potential fungicide produced by the antagonist was carried out through means of spectrophotometer analysis and gas chromatography. *Trichoderma* spp. isolates have been efficient in controlling *M. phaseolina* mycelial growth both in pairing of cultures as well as through volatile metabolites. Both *Trichoderma* spp. isolates have produced chitinase and only *T. harzianum* has produced β -1,3-glucanase. *Trichoderma* spp. isolates cultivated in liquid environment have produced hydroxyl and fatty acids described in literature with potential fungicide and induction of defense response in plants. The application of *Trichoderma* spp. alive or filtered, through seed treatment, has been capable of controlling charcoal rot disease from the stalk, caused by *M. phaseolina* in common bean. *T. virens* has a positive effect over root growth in common bean.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Biological control. Culture filtrates. Secondary metabolites

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante cultura em âmbito nacional por ser um dos itens básicos na alimentação e fonte de proteínas e carboidratos. É uma cultura com ampla adaptação edafoclimática, porém nessas circunstâncias, muitas vezes, as plantas ficam expostas a condições e fatores desfavoráveis que podem acarretar em injúrias, destacando-se aquelas causadas por doenças. Uma ampla gama de patógenos, de origem fúngica, viral ou bacteriana, pode atacar a cultura e acarretar perdas significativas na produção (ESTEFANI; MIRANDA FILHO; UESUGI, 2007). Os patógenos habitantes do solo, em geral, são mais difíceis de serem controlados, por apresentarem estruturas de resistência que os permitem sobreviver em condições adversas do meio e na ausência do hospedeiro (AMORIM, 1995), sendo esse um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento de resistência aos métodos de controle usuais (SALES JR et al., 2005).

As sementes de feijão são um dos principais meios de disseminação de patógenos a longas distâncias e para novas áreas, como também servem de meio para a sobrevivência de patógenos (MARINO et al., 2008). Considerando que apenas 19% dos agricultores utiliza sementes certificadas de feijão (ABRASEM, 2016), a qualidade sanitária e fisiológica assume papel importante na produção.

Entre os principais patógenos transmitidos pelas sementes, destaca-se *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão cinzenta do caule na cultura do feijoeiro (LOBO JÚNIOR; BRANDÃO; MARTINS, 2013). Prejuízos à cultura associados à redução do estande, desempenho produtivo insuficiente das plantas e baixa qualidade das sementes produzidas quanto ao vigor e sanidade (CARDOSO, 1994) tornam *M. phaseolina* um dos principais agentes causais de podridões radiculares do feijoeiro, sendo que os danos são intensificados quando aliado à monocultura (CASA et al., 2011; VIEIRA JR et al., 2017).

O controle de *M. phaseolina* e outros patógenos habitantes do solo é dificultado pois esses apresentam baixa especificidade, alta agressividade e produzem estruturas de resistência que podem permanecer viáveis no solo por um longo período de tempo. Por sua vez, os métodos de controle empregados apresentam resultados insatisfatórios quanto a redução dos prejuízos, principalmente quando usados isoladamente. Diante disso, o controle biológico torna-se uma importante ferramenta a agregar no manejo integrado de doenças, onde se busca selecionar organismos efetivos no controle de enfermidades de plantas (ROMEIRO, 2007). Fungos do gênero *Trichoderma* se destacam por serem os mais estudados e utilizados no biocontrole de doenças em plantas, em função da efetividade de ação, principalmente por

atuarem de diversas formas sobre o patógeno, e também por possuírem mecanismos que auxiliam na promoção do crescimento das plantas (CHAGAS et al., 2017; MILANESI et al., 2013a).

Espécies de *Trichoderma* possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários, os quais podem variar de uma espécie para outra e entre os isolados da mesma espécie, bem como na condição que eles estão submetidos, dessa forma produzem efeitos variados sobre patógenos de plantas (VINALE et al., 2014). E por se tratar de micro-organismos vivos, os antagonistas necessitam de condições adequadas que favoreçam o seu crescimento e garantam a efetividade de sua ação, portanto, a utilização de processos de fermentação em condições controladas, permite uma melhor qualidade e maior produção de enzimas de interesse para o biocontrole de fitopatógenos (MARIANO; SILVEIRA; GOMES, 2005).

Sendo assim, a utilização de fungos e de processos que estimulem a produção de substâncias com ação biocontroladora ou que atuem na indução de resistência e redução da severidade de doenças é uma importante ferramenta, pois permite uma maior proteção às plantas na fase inicial e outras fases do ciclo de cultivo e a redução da utilização de defensivos químicos (JUNGES, 2016).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *M. phaseolina* e no crescimento de plantas de feijoeiro, bem como identificar os compostos produzidos por *Trichoderma* spp. com potencial fungicida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

A cultura do feijoeiro está difundida em todo território nacional, como cultivo de subsistência em pequenas propriedades de base familiar, até em sistemas de produção com tecnologias adaptadas à cultura (NETO, 2017). É uma cultura que se destaca no Brasil por sua importância econômica e nutricional aliada à sua relevância do ponto de vista social, devido ao seu cultivo se concentrar em pequenos estabelecimentos agropecuários, na maioria com base de trabalho familiar (TARSITANO; SANT'ANA; TARSITANO, 2015).

O Brasil se destaca por ser o terceiro maior produtor mundial de feijão (NETO, 2017) e apresentar o maior consumo no cenário internacional (CARVALHO et al., 2014). No Brasil é possível explorar a cultura em três épocas distintas no mesmo ano, possibilitando três safras distribuídas em regiões mais adequadas para cada uma delas. A primeira safra ou “safra das águas” é utilizada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia, sendo o cultivo realizado nos meses de agosto a novembro. Na segunda safra ou “safra da seca” o cultivo ocorre entre os meses de dezembro a abril e abrange os estados da região Sul, Sudeste, Centro-Oeste e em único período de plantio no Norte, onde é consorciado com o milho. A terceira safra, também designada como safra irrigada de inverno, é cultivado entre os meses de abril a julho, no Centro-Sul do Brasil (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2017).

O feijão é uma cultura de difícil produção, e algumas características interferem na variação dos preços no processo de comercialização, tais como qualidade, armazenamento, preferência de variedade e tipo, hábito alimentar e variação do consumo per capita em diferentes épocas (NETO, 2017). Além do preço, outros fatores influenciam a escolha do produtor sobre o que semear na próxima safra, dentre eles o custo de produção, liquidez da cultura, produtividade e disponibilidade de recursos para financiamento (COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 2012).

No Brasil há três principais tipos de feijão cultivados comercialmente, o feijão-comum cores que compreende a 63% do volume produzido, seguido pelo feijão-caupi com 19% e o feijão-comum preto com 18%, o qual é essencialmente, produzido no sul do país, onde aproximadamente 70% da sua produção é oriunda da primeira safra (COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 2012). Na primeira e na terceira safra, o feijão-comum

cores é o mais produzido, enquanto que na segunda safra o feijão-caupi ocupa a maior área cultivada (CONAB, 2018a).

Os estados com maior produção são o Paraná, Minas Gerais, Goiás, Bahia e São Paulo, enquanto que o estado do Rio Grande do Sul ocupa a 8ª colocação (CONAB, 2017). No Rio Grande do Sul, o cultivo do feijão é realizado em duas épocas de semeadura, a safra, de setembro a novembro e a safrinha, de janeiro a fevereiro (DOMINGUES et. al, 2013). Na safra se produz o feijão-comum cores e o feijão-comum preto, e na safrinha se produz apenas o feijão-comum preto, que em geral é o mais produzido em função da maior área cultivada (CONAB, 2017).

Segundo dados da Conab (2018b), atualmente a média da produtividade de feijão no Brasil é de 978 kg.ha⁻¹, com área cultivada nas três safras de 3,082 milhões de hectares, conferindo uma produção média total de 3,014 milhões de t.ano⁻¹. Percebe-se um aumento no consumo nacional de feijão-comum nos últimos anos, superando 17 kg.hab⁻¹ (SILVA e WANDER, 2013). Dessa forma, a cadeia produtiva do feijão é voltada ao mercado interno, pois toda a produção é consumida no próprio país, necessitando algumas vezes, importar de outros países por não ser autossuficiente (LEMOS; MINGOTTE; FARINELLI, 2015). No segundo semestre, quando o produto nacional está na entressafra é que são importadas as maiores quantidades, tendo a Argentina, China e Bolívia como os principais fornecedores (COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 2012).

Além da limitação da produção da cultura para suprir o consumo interno, outros problemas acometem a cultura, aumentando ainda mais a necessidade de importar o produto. Atualmente, grande parte das cultivares de feijão apresentam algum tipo de tolerância ou resistência ao ataque de pragas e doenças, no entanto, o tratamento de sementes é uma prática relevante para a instalação da cultura no campo (SILVA, 2015). A utilização de sementes de baixa qualidade favorece a ocorrência de doenças, especialmente por elas serem o principal meio de disseminação de patógenos (MARINO et al., 2008).

2.2 DOENÇAS DA CULTURA DO FEIJOEIRO

As doenças estão entre os principais fatores que reduzem a produção da cultura, uma vez que o feijoeiro pode ser hospedeiro a inúmeros patógenos, sendo eles fungos, bactérias, vírus ou nematoides (RIBEIRO et al., 2011). As condições de temperatura e umidade, aliadas à agressividade dos agentes causais e à suscetibilidade das cultivares, são determinantes para a ocorrência das doenças. Dessa forma, a importância de cada doença varia de acordo com as

condições ambientais, cultivar empregada e o manejo da cultura. As doenças em geral possuem importância, pois as perdas ocasionadas por elas normalmente são altas, frequentemente acima de 50%, podendo chegar a causar perdas totais em casos onde as medidas de controle utilizadas não foram adequadas (COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 2012). Em Lages-SC, os danos causados por podridões radiculares chegaram a gerar danos de até 26% na produção de grãos de feijão cultivado em monocultura (VIEIRA JR et al., 2017).

As doenças fúngicas são as mais impactantes para a cultura e são divididas em doenças causadas por patógenos de parte aérea e habitantes do solo. Segundo Bianchini; Maringoni e Carneiro (2005), os patógenos de parte aérea são aqueles em que seus sintomas são manifestados nas hastes, cotilédones, vagens, sementes, mas principalmente nas folhas, na forma de manchas de diferentes cores e formatos, lesões e pústulas. Esses patógenos não apresentam capacidade de sobreviver no solo, assim, ao destruir os restos de cultura, tendem a desaparecer das áreas de cultivo (RIBEIRO et al., 2011).

Por outro lado, os sintomas provenientes do ataque de patógenos habitantes do solo são inicialmente, observados na raiz, no colo e no caule, na forma de manchas encharcadas estendendo-se a podridões ou lesões, até atingir toda a planta causando clorose, desfolha precoce e murcha que pode levar a seca total da planta (MANOS; OLIVEIRA; MARTINS, 2013). As doenças causadas por esses patógenos são de difícil controle, uma vez que, diferente dos patógenos de parte aérea, esses possuem estruturas de resistência, que lhes permite viabilidade durante vários anos mesmo na ausência do hospedeiro. Devido as cultivares de feijoeiro apresentarem variabilidade quanto a resistência a patógenos radiculares, há genótipos mais resistentes e outros mais suscetíveis, e, portanto, a utilização de cultivares resistentes pode ser uma ferramenta no manejo de doenças causadas por esses patógenos na lavoura (MIRANDA; LOBO JÚNIOR; CUNHA, 2007). Barbosa e Gonzaga (2012), ressaltam que as perdas na produção por esses patógenos podem chegar a 100%, tanto de forma indireta, através do aumento no custo de produção em áreas condenadas, ou diretamente, inviabilizando os cultivos comerciais.

2.2.1 *Macrophomina phaseolina*

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid., agente causal da podridão cinzenta do caule na cultura do feijoeiro, é um exemplo de patógeno habitante de solo e transmitido via

semente. A ocorrência da doença depende de condições específicas de temperaturas elevadas por vários dias consecutivos, aliada a baixa umidade (FIALHO; PAPA; CERESINI, 2015).

Na região noroeste do Rio Grande do Sul, foi relatada como sendo uma das principais doenças na cultura do feijoeiro, onde o patógeno mostra-se agressivo, causando perdas significativas na produção, especialmente em anos com alta temperatura e em solos com baixa umidade e compactados, frequentemente observados na região (KOTZ et al., 2016). Em lavouras situadas no município de Muitos Capões-RS, *M. phaseolina* esteve entre os principais agentes causais de podridões radiculares no feijoeiro comum (CASA et al., 2011). *M. phaseolina* também foi o agente causal predominante em plantas de feijoeiro com podridões radiculares em lavouras no município de Lages-SC, quando aliado a monocultura intensificaram a ocorrência de podridões radiculares (VIEIRA JR et al., 2017).

M. phaseolina é capaz de sobreviver no solo sob condições adversas na forma de microescleródio ou em restos de cultura em picnídios (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). É um fungo polífago, possuindo cerca de 300 espécies vegetais como hospedeiras, tanto gramíneas como leguminosas, e a forma de disseminação predominante é por meio de sementes contaminadas, implementos agrícolas, água de irrigação, vento e animais (FIALHO; PAPA; CERESINI, 2015).

Quando o patógeno infecta as plantas no início do estabelecimento, seja por estar presente na semente ou pelos microescleródios e/ou micélios do fungo que sobreviveram no solo, apresentam cancrs escuros, deprimidos, com margens bem definidas, frequentemente com anéis concêntricos, que podem rodear completamente o caule, e, acima da lesão a plântula pode amarelecer e murchar, ou quebrar-se ao nível da mesma (CARDOSO, 1990). Já em plantas desenvolvidas, os sintomas progridem mais lentamente, causando raquitismo, clorose e desfolhamento prematuro, especialmente ao lado da lesão, na qual aparecem massas de microescleródios, o seu centro torna-se cinza e aparecem numerosos corpos frutíferos macroscópicos, denominados picnídios (MANOS; OLIVEIRA; MARTINS, 2013). As sementes podem ser infectadas quando as vagens entram em contato com o solo contaminado, bem como, quando a palhada infectada entra em contato com os grãos na debulha das vagens, comumente verificado em pequenas propriedades no processo de colheita.

2.3 CONTROLE DE PATÓGENOS HABITANTES DO SOLO

Em função dos patógenos habitantes do solo apresentarem estruturas de resistência e vários hospedeiros alternativos, a rotação de culturas, uma das principais práticas empregadas

no controle cultural, apresenta pouca resposta, porém, é utilizada visando reduzir a quantidade de estruturas viáveis do fungo no solo.

Devido grande parte dos patógenos serem transmitidos por sementes, é indispensável que estas sejam de boa qualidade, bem como, preconiza-se a realização do tratamento de sementes, para que permita a instalação da cultura e o desenvolvimento de plantas vigorosas (RIBEIRO et al., 2011). A termoterapia também é uma medida eficiente de fácil aplicação e baixo custo no controle de patógenos associados à semente, onde utiliza a sensibilidade diferencial à temperatura entre o patógeno e a semente, que tem uma ação sistêmica e sem efeitos ao meio ambiente, não comprometendo o consumo da semente. No entanto, essa medida não apresenta efeito residual, não é eficiente para patógenos localizados internamente e apresenta dificuldade de aplicação em grandes volumes de sementes (BEVILAQUA et al., 2013).

Há uma carência de produtos químicos destinados ao controle de patógenos radiculares, bem como uma limitação nos mecanismos de ação e conseqüentemente, na eficiência de controle, tornando iminente o surgimento de populações de patógenos resistentes. No entanto, os produtos químicos comerciais existentes apresentam um alto poder residual, são extremamente tóxicos para as populações microbianas do solo e fontes hídricas (SALES JR et al., 2005). Dessa forma, o controle biológico é uma medida efetiva no controle de doenças causadas por patógenos habitantes do solo, especialmente pelo fato de outras práticas de controle serem limitadas na redução da densidade de inóculos de patógenos (LOBO JUNIOR, 2016), com vantagens de período de controle/ação maior, baixo impacto ambiental e baixo risco à saúde humana e animal (SOARES et al., 2016).

2.3.1 Controle biológico de patógenos habitantes do solo

O controle biológico de fitopatógenos atua na manipulação do ambiente, de forma a favorecer a população de micro-organismos benéficos presentes ou, introduzir de forma massal, antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos ou agentes benéficos (MORANDI; BETTIOL; PAULA JÚNIOR, 2014). Os micro-organismos utilizados no controle biológico de fitopatógenos com ação antifúngica, por serem os principais componentes da microflora de solos nativos e agrícolas, possuem melhores resultados no controle de patógenos habitantes do solo (GUZMÁN-GUZMÁN et al., 2019). Antagonistas isolados de rizosfera de plantas sintomáticas, mostraram-se mais eficazes no controle da

doença (MILANESI et al., 2013b), especialmente por estarem mais bem adequados as condições do ambiente.

Os micro-organismos antagonistas podem atuar de diversas formas em oposição aos patógenos e a consequente redução da ocorrência das doenças. Dentre os mecanismos de controle por eles utilizados, incluem a antibiose, a competição, parasitismo, predação, hipovirulência, indução de resistência e proteção cruzada (MARIANO; SILVEIRA; GOMES, 2005). Dentre os fungos utilizados no biocontrole de fitopatógenos, o gênero *Trichoderma* se destaca por ser um dos mais estudados, em função da sua eficiência no controle, possibilitada pelos diferentes mecanismos de ação apresentados (MACHADO et al., 2012).

2.3.2 *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças e promoção do crescimento das plantas

Fungos do gênero *Trichoderma* são considerados de vida livre, contudo, também parasitam outros fungos (MEDEIROS e MONTEIRO, 2015) ou sobrevivem em restos de cultura, relacionando-se com as raízes, o solo e o interior das plantas (POMELLA e RIBEIRO, 2009). Dentre os mecanismos já identificados e geralmente utilizados por fungos do gênero *Trichoderma* no controle de fitopatógenos destacam-se a antibiose (SILVA et al., 2008), a competição (BARBOSA; MEZA, 2009), o micoparasitismo (SILVA et al., 2017) e a indução de resistência (PEDRO et al., 2012).

Em estudos realizados por Nascimento et al., (2016), mostraram que isolados de *Trichoderma* spp. foram efetivos na inibição do crescimento micelial de patógenos habitantes do solo como *Sclerotium rolfii* e *Macrophomina phaseolina*, bem como, inibiram o crescimento dos microescleródios (estrutura de sobrevivência) de *M. phaseolina*. Além disso, *Trichoderma* spp. também mostrou potencial positivo no acúmulo de biomassa nas culturas de soja, feijão-caupi, arroz e milho (CHAGAS et al., 2017).

Estudos comprovam que isolados de *Trichoderma* spp. podem promover o crescimento em plantas, em função de melhorar a nutrição das plantas pela solubilização de fósforo e produzirem substâncias promotoras de crescimento por meio da síntese de ácido indol acético (AIA) (OLIVEIRA et al., 2012). O fósforo é responsável por desempenhar diversas funções na planta, atua na fotossíntese, no armazenamento e transferência de energia, na divisão celular e no crescimento das células, dessa forma, além de promover o crescimento prematuro das raízes, o fósforo auxilia as raízes e as plântulas a se desenvolverem mais rapidamente, melhora a eficiência no uso da água, bem como, em algumas plantas favorece a

resistência às doenças (POTASH & PHOSPHATE INSTITUTE, 1998). O AIA é responsável em promover o crescimento de raízes e a proliferação de pelos radiculares, melhorando a absorção de nutrientes e água do solo e, conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento da planta (CABALLERO-MELLADO, 2006).

A produção de enzimas por fungos ocorre naturalmente, seja conferindo resistência à fitopatógenos ou produzindo fitorreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004). No entanto, processos de cultivo e fermentação desses micro-organismos são realizados em condições controladas, para que permitam uma melhor qualidade e maior produção de enzimas de interesse, destinadas ao biocontrole de fitopatógenos (MARIANO; SILVEIRA; GOMES, 2005). Estudos mostram que a submissão de micro-organismos endofíticos, tais como o *Trichoderma*, a condições de meio excitantes ou adequadas ao seu desenvolvimento, otimiza a produção de compostos e estimula a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Junges (2016) identificou a produção de ácidos graxos e oxidrilas produzidos por *Trichoderma* spp. com potencial fungicida e de indução de resposta de defesa em plantas, que reduziram a severidade e o progresso da antracnose no feijoeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia “Dr^a Elocy Minussi” e na casa de vegetação do Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O cultivo em meio líquido dos antagonistas, bem como as análises químicas foram realizadas no Laboratório Biotech Factory do Departamento de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da UFSM.

3.2 ENSAIOS *IN VITRO*

3.2.1 Origem e caracterização dos micro-organismos

Como agentes de controle biológico, foram utilizados dois isolados do gênero *Trichoderma*, sendo, “*T. harzianum*”, proveniente de formulação comercial, Ecotrich® – Produto registrado no MAPA sob o nº 04213, com 1×10^{10} UFC/g e formulação em pó molhável, e outro isolado codificado como “TF1”, coletado de solo rizosférico em lavoura com cultivo de feijoeiro no município de Roque Gonzales, localizado na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, coordenadas geográficas 28° 07’ 53’’ S e 55° 01’ 32’’ W. Como patógeno desafiante, foram utilizados dois isolados virulentos de *Macrophomina phaseolina*, um proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas, codificado como “PEL” e outro da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos, "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), codificado como “2101”.

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados de *Trichoderma* spp. foi determinado a partir da transferência de discos (5mm) de meio batata-dextrose-ágar (BDA) com estruturas de ambos os isolados do fungo para placas com meio BDA, que foram mantidas a 25 ± 2 °C, e fotoperíodo de 12 h. Foram utilizadas quatro repetições, sendo cada uma constituída por uma placa de Petri (90 mm). O crescimento micelial de cada isolado foi avaliado diariamente até os cinco dias de incubação, quando uma das repetições colonizou toda a superfície do meio de cultura, mensurando dois sentidos diametralmente opostos da colônia, obtendo-se a média do crescimento micelial. Os dados foram utilizados para o cálculo do IVCM, empregando-se a fórmula de Maguire (1962):

$$IVCM = \Sigma(D - D_a) / N$$

Em que:

IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial

D: Diâmetro médio atual

Da: Diâmetro médio anterior

N: Número de dias após a inoculação

A esporulação dos isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliada aos sete dias de incubação, pela adição de 10 mL de água destilada e esterilizada, acrescida de uma gota do emulsificante Tween 80® em cada uma das placas, após procedeu-se a raspagem das colônias e filtragem em camada dupla de gaze. A suspensão foi agitada por 30 segundos e, com auxílio de uma micropipeta, retirou-se 1 mL e depositou-se na câmara de Neubauer, para estimar a concentração de conídios (conídios.mL⁻¹). A coloração das colônias foi observada aos sete dias de incubação, com o auxílio da carta de cores Munsell Soil Color Chart (2009) e a caracterização dos conídios de *Trichoderma* por meio da mensuração da largura e comprimento de 30 conídios.

3.2.2 Identificação molecular dos isolados PEL e TF1

O DNA foi extraído por meio da raspagem no crescimento micelial do fungo crescido em meio de cultivo BDA, usando o Kit de extração ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep (Zymo Research, Irvine, EUA). Após a extração do DNA, foi amplificado parte do gene do fator de alongação 1-alpha (EF1) com o par de primers A-TEF_F: 5'-CCTTCAAGTACGCTGGGTTTC-3' e A-TEF_R: 5' -TTCTTGGAGTCACCGGCAA-3' (PERRONE et al., 2011).

As reações foram efetuadas em um ciclador térmico de PCR (PTC-100 Bio-Rad) utilizando-se 25 µl de uma solução contendo 17,35 µl de água ultra pura (milli-Q), 0,8 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de tampão 10X, 0,5 µl de cada primer (10 µM), 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de DNA polimerase (2,5 unidades) e 2,0 µl de DNA. O programa de PCR consistiu em um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 68 °C por 1 minuto, seguido de um passo final de extensão a 68 °C por 10 minutos.

Após a amplificação, foi realizada a eletroforese para verificar a amplificação em gel de agarose a 1,5% e tampão TBE 1X. As amostras de DNA foram coradas com BlueGreen Loading Dye I® (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) e observadas em luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com o kit Gen Elute PCR clean-up Kit® (Sigma, Saint

Louis, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, EUA).

3.2.3 Pareamento de culturas e metabólitos voláteis

Para avaliar o potencial dos isolados antagonistas do gênero *Trichoderma* na inibição do crescimento micelial dos isolados patogênicos de *M. phaseolina*, foi utilizada a técnica de confrontação direta. Para tanto, discos de micélio do fitopatógeno + BDA foram retirados de placas onde os mesmos foram cultivados, separadamente, por sete dias e, posteriormente estes foram depositados a 1,0 cm da borda interna de outra placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Após, foi realizada a transferência individual de discos de mesmo diâmetro dos isolados de *Trichoderma*, previamente cultivados em meio de cultura BDA por sete dias, colocando-os de forma oposta aos discos do patógeno. As placas foram mantidas a temperatura de 25 +-2°C e fotoperíodo de 12 h, realizando medidas diárias de crescimento micelial até o patógeno colonizar toda a superfície do meio nas placas Testemunha.

O efeito inibidor de metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* spp. foi testado por meio da utilização de duas bases de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo BDA, sendo transferido para o centro de uma placa, um disco (5mm) da cultura do patógeno e no centro de outra placa um disco (5 mm) da cultura do antagonista, ambos previamente cultivados por sete dias, após as bases das placas foram sobrepostas e unidas com plástico filme. Como testemunha, foram sobrepostas duas bases contendo o patógeno e outra somente meio BDA. As placas foram incubadas a 25 +-2°C e fotoperíodo de 12 h até o patógeno colonizar toda a superfície do meio nas placas Testemunha.

Após os testes de pareamento de culturas e metabólitos voláteis foi calculado o IVCN conforme a fórmula de Maguire (1962) citada no item 3.2.1 e o percentual de inibição do crescimento micelial empregando-se a fórmula:

$$\left(\frac{\text{Crescimento micelial da testemunha} - \text{crescimento micelial do tratamento}}{\text{Crescimento micelial da testemunha}} \right) \times 100.$$

Cada tratamento foi composto por quatro repetições em análise fatorial 3x2 (Antagonista: 2 isolados de *Trichoderma* spp. e ausência de *Trichoderma* spp. x Patógeno: 2 isolados de *M. phaseolina*) e delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram

submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott utilizando o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

3.2.4 Produção de filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. em diferentes meios de cultura

Os processos de fermentação submersa dos micro-organismos antagonistas foram executados conforme metodologia de Junges (2016). Foi realizado o cultivo dos dois isolados de *Trichoderma* spp. em Erlenmeyers de 250 mL contendo meio de cultura líquido, composto por água destilada, sacarose, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura (EL). O potencial de hidrogênio (pH) foi ajustado para cada tratamento e os meios foram autoclavados por 20 minutos a 1 atm. Após o resfriamento dos meios a temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL da concentração de esporos dos isolados de *Trichoderma* spp. para cada 100 mL de meio que em seguida foram incubados em Shaker (Tecnal® shakermodel TE-420) a 28°C, por 96 horas sob agitação constante ajustada para cada tratamento (Tabela 1). Para o delineamento experimental utilizou-se a matriz do planejamento fatorial Placket Burman, para avaliar o efeito das variáveis que compõem os meios de cultura.

Tabela 1- Tratamentos dos meios de cultura líquido compostos por sacarose, água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), concentração de esporos, agitação do meio e o potencial de hidrogênio (pH) ajustado para cada tratamento, para o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamento	Água destilada (mL)	EL (g.L ⁻¹)	AMM (g.L ⁻¹)	pH	Sacarose (g.L ⁻¹)	Agitação (rpm)	Concentração de esporos
1	1000	7,5	20	7	50	100	10 ⁷
2	1000	7,5	20	7	50	180	10 ⁵
3	1000	7,5	20	7	100	180	10 ⁵
4	1000	7,5	20	5	100	180	10 ⁷
5	1000	7,5	20	7	100	100	10 ⁷
6	1000	7,5	20	5	50	180	10 ⁷
7	1000	7,5	20	5	100	100	10 ⁵
8	1000	7,5	20	5	50	100	10 ⁵
9	1000	7,5	20	6	75	140	10 ⁶
10	1000	7,5	20	6	75	140	10 ⁶
11	1000	7,5	20	6	75	140	10 ⁶

Após o período de incubação, os meios de cultura foram filtrados primeiramente, em membrana milipore® de 11 micras com auxílio de bomba de vácuo, removendo a biomassa microbiana que foi depositada em placas de Petri e transferidas para estufa a 105°C durante 24 horas para determinar a biomassa fúngica seca. Em seguida foi realizada uma segunda filtragem dos meios em membrana milipore® de 0,22 micras, para remoção das células fúngicas, posteriormente, as amostras foram congeladas para posterior uso e análise.

3.2.5 Metabólitos não voláteis e enzimas de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*

Para a avaliação do efeito inibitório de metabólitos não voláteis e enzimas produzidas pelos isolados de *Trichoderma* spp. na fermentação submersa, foi utilizada a metodologia descrita por Furlani et al. (2007) com modificações.

Após os isolados de *Trichoderma* spp. passarem pelo processo de fermentação e filtragem, originaram o filtrado de cultura com a presença de metabólitos e enzimas, o qual foi incorporado ao meio BDA na proporção de 10 mL do filtrado de cultura para cada 100 mL de meio BDA. Após a solidificação do meio, foi depositado, no centro de cada placa, um disco de 5mm de diâmetro de estruturas de cada um dos isolados fitopatogênicos com sete dias de crescimento em meio BDA. Para o tratamento testemunha, foi depositado um disco de mesmo diâmetro do fitopatógeno, em meio de cultura BDA, sem a presença do filtrado de cultura na placa. A cada dia de incubação em BOD a 25° +/- 2 °C e fotoperíodo de 12 h, foi avaliado o crescimento micelial do patógeno, por meio da mensuração do diâmetro da colônia em dois sentidos opostos determinando-se a média do crescimento micelial para posterior cálculo do percentual de inibição do crescimento micelial conforme fórmula citada no item 3.2.3.

Cada tratamento foi composto por quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott utilizando o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011). O tratamento com o filtrado de cultura que obteve a maior inibição do crescimento micelial foi escolhido como a condição mais adequada para a realização da fermentação submersa e utilizado para os testes *in vivo*.

3.2.6 Determinação da atividade de quitinase

O procedimento para determinação da atividade de quitinase consistiu em adicionar 0,005 g de quitina e 250 µL do caldo enzimático de cada tratamento em tubos de ensaio preenchidos com 250 µL de solução tampão (acetato de sódio). Para o tratamento testemunha foi adicionado mais 250 µL de solução tampão em substituição ao caldo enzimático. Após essa solução foi incubada a 37 °C durante 1h em banho termostático. Decorrido o tempo, adicionou-se 0,5 mL de reagente DNS, agitou-se em vórtex e incubou-se a 100 °C por 5 minutos novamente em banho termostático, em seguida os tubos foram imersos em banho de gelo e adicionados 8 mL de tartarato de sódio e potássio em cada um dos tubos. Posteriormente, foram executadas as leituras de concentração de quitinase por meio de análises no espectrofotômetro a 540 nm, sendo calculada por fim a atividade de quitinase conforme a fórmula:

$$A \text{ (U/mL)} = C * 0,0753 * D$$

Em que:

A: Atividade de quitinase

D: diluição (realizada quando foi preciso diluir a solução enzimática).

C: concentração determinada a partir do método DNS calculada através da equação da reta da curva de calibração.

Os ensaios foram realizados em triplicata em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott utilizando o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

3.2.7 Determinação da atividade de β-1,3-glucanase

O procedimento para a determinação da enzima β-1,3-glucanase, consistiu em adicionar 10 µL do caldo enzimático em 90 µL de solução 1% de laminarina (0,05g de laminarina em 5mL de solução tampão (acetato de sódio) 50nM pH 5) e 400µL de solução tampão. Para o tratamento testemunha foi adicionado mais 10 µL de tampão em substituição ao caldo enzimático, todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após a mistura reacional foi incubada a 45 °C durante 30 min. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de reagente DNS, agitou-se em vórtex e incubou-se a 100 °C por 5 minutos em banho-termostático. Após os tubos foram imersos em banho de gelo e adicionados 8 mL de tartarato de sódio e potássio.

Posteriormente, foram executadas as leituras de concentração de β -1,3-glucanase por meio de análises no espectrofotômetro a 540 nm e calculado a atividade de β -1,3-glucanase segundo a fórmula:

$$A \text{ (U/mL)} = C * 0,1850 * D$$

Em que:

A: Atividade de β -1,3-glucanase

D: diluição (realizada quando foi preciso diluir a solução enzimática).

C: concentração determinada a partir do método DNS calculada através da equação da reta da curva de calibração.

3.2.8 Análise cromatográfica dos compostos presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma* spp.

3.2.8.1 Procedimento de extração

Uma alíquota de 10 mL dos filtrados de cultura de *T. harzianum* e *T. virens* (TF1), sem células do micro-organismo, foi adicionada à 50 mL dos solventes orgânicos, etanol, metanol, acetato de etila e hexano. As soluções permaneceram em agitação constante em temperatura ambiente, acopladas a condensador por 24 h. Decorrido este período foram colocadas para precipitar em tubo de ensaio por 24 h (etanol e metanol) e 2 h (acetato de etila) e 1 h (hexano). O sobrenadante foi acondicionado em refrigerador para análises.

3.2.8.2 Equipamentos e procedimento para cromatografia gasosa

As amostras foram analisadas em um sistema GC-Q / MS. Para isso, utilizou-se um autoamostrador tipo injetor da série AOC-20is (Shimadzu, Kyoto, Japão), o cromatógrafo a gás do modelo GC-2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) e o espectrômetro de massa do modelo GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japão). Utilizou-se uma coluna de sílica fundida Rtx®-5ms GC (30 m \times 0,25 mm.i.d. \times 0,25 micron de espessura de filme) com 5% de difenil e 95% de dimetil polisiloxano (Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA). O gás Hélio foi utilizado para o transporte a uma vazão de 1,69 mL.min⁻¹ para as amostras dissolvidas em acetato de etila e hexano e 1,33 mL.min⁻¹ para as amostras dissolvidas em metanol e etanol. Para todas as amostras a temperatura de injeção foi mantida a 270 °C.

Um volume de 1 μL de cada amostra foi injetado com uma razão de separação de 1:10. Para as amostras dissolvidas em acetato de etila e hexano, a temperatura do forno foi aumentada de 50 $^{\circ}\text{C}$ para 280 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, e mantida por 15 min. Para as amostras dissolvidas em metanol e etanol, a temperatura do forno foi aumentada de 100 $^{\circ}\text{C}$ para 310 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, e mantida por 15 min. A temperatura da interface para todas as amostras foi mantida a 280 $^{\circ}\text{C}$ e a temperatura da fonte de ions a 280 $^{\circ}\text{C}$. Os espectros de massa foram registados ao longo de 35-500 amu, a 0,30 scan/s para as amostras dissolvidas em acetato de etila e hexano e acima de 35-700 amu, a 0,30 scan/s para as amostras dissolvidas em metanol e etanol. Os voláteis foram identificados por espectrômetro de massa quadrupolo com o modo de impacto de elétrons (EI) gerado a 70 eV no modo de aquisição de varredura. A identificação de componentes individuais foi feita usando os seus índices de retenção relativos com o Registro Wiley de Dados Espectrais de Massa (Palisade Corporation, Newfield, NY).

3.3 ENSAIOS *IN VIVO*

Os filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. que obtiveram os maiores valores de inibição do crescimento micelial do patógeno nas avaliações *in vitro*, foram escolhidos para os ensaios *in vivo*. Em função disso, utilizou-se, para *T. harzianum* o tratamento 8, cuja a condição de crescimento foi: pH 5, agitação de 100rpm, 50g.L⁻¹ de sacarose e 10⁵ conídios.mL⁻¹ e para *T. virens* (TF1) o tratamento 4, onde empregou-se a condição de crescimento: pH 5, agitação de 180rpm, 100g.L⁻¹ de sacarose e 10⁷ conídios.mL⁻¹.

3.3.1 Atividade biológica de filtrado de cultura e organismo vivo de *Trichoderma* spp. sobre plântulas de feijoeiro

O teste de germinação das sementes e crescimento das plântulas de feijoeiro foi desenvolvido em laboratório sob condições de ambiente favorável e controlado, utilizando sementes da cultivar IPR Graúna, que foram submetidas a tratamento com os dois isolados de *Trichoderma* spp. Tanto os filtrados de cultura como os organismos vivos (suspensão de esporos viáveis) dos isolados de *Trichoderma* spp. foram utilizados no tratamento de sementes.

Filtrado de cultura: O tratamento das sementes foi realizado com a aplicação de 2 mL do filtrado de cultura de cada isolado de *Trichoderma* spp., para cada 100 sementes de feijão. Após a aplicação, as sementes foram colocadas em sacos plásticos e homogeneizadas.

Organismo vivo: Foram utilizados 2 mL da suspensão de esporos de cada isolado de *Trichoderma* spp., na concentração de 1×10^5 UFC/mL para *T. harzianum* e 1×10^7 UFC/mL para *T. virens* (TF1) em 100 sementes, que após foram homogeneizadas em sacos plásticos.

O tratamento testemunha consistiu na aplicação de 2 mL de água destilada e esterilizada em substituição ao tratamento com o filtrado de cultura ou organismo vivo. Foram utilizadas 400 sementes em cada tratamento, divididas em oito repetições de 50 sementes, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Posteriormente, os rolos contendo as sementes foram mantidos em câmara climática tipo BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

Decorrido o tempo de incubação, foi contabilizado o percentual de germinação na primeira contagem (PC) aos cinco dias e, na germinação final (G) aos nove dias (BRASIL, 2009). Na primeira contagem de germinação foram escolhidas aleatoriamente, dez plântulas normais do terço superior da folha de papel de cada repetição, e medido o comprimento da parte aérea e da raiz por meio da separação das partes com um corte na região do colo da planta. Em seguida, cada uma das partes foi colocada em sacos de papel identificados e levados à estufa de secagem a 65 °C por 48 h para a determinação da massa seca.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott utilizando o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

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

Para esse experimento foram utilizadas sementes de feijão da cultivar IPR Graúna, previamente desinfestadas em banho de álcool 70% por 30 segundos, banho em 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*, na forma de organismo vivo ou de filtrado de cultura, aplicados via tratamento de sementes.

Como fitopatógenos foram utilizados os dois isolados virulentos de *M. phaseolina*, os quais foram inoculados via substrato ou contato direto com a semente (Tabela 2). No

tratamento testemunha, não foi realizado o tratamento das sementes com os antagonistas nem a inoculação do patógeno.

Tabela 2- Composição dos tratamentos de acordo com a aplicação do antagonista nas sementes e inoculação do patógeno via substrato ou contato direto com a semente.

Tratamento	Tratamento das sementes com o antagonista	Inoculação patógeno
1	Organismo vivo de <i>Trichoderma harzianum</i>	via substrato-PEL
2	Organismo vivo de <i>Trichoderma harzianum</i>	via semente- PEL
3	Organismo vivo de <i>Trichoderma harzianum</i>	via substrato-2101
4	Organismo vivo de <i>Trichoderma harzianum</i>	via semente-2101
5	Organismo vivo de <i>Trichoderma harzianum</i>	Ausência do patógeno
6	Filtrado de cultura de <i>Trichoderma harzianum</i>	via substrato-PEL
7	Filtrado de cultura de <i>Trichoderma harzianum</i>	via semente- PEL
8	Filtrado de cultura de <i>Trichoderma harzianum</i>	via substrato-2101
9	Filtrado de cultura de <i>Trichoderma harzianum</i>	via semente-2101
10	Filtrado de cultura de <i>Trichoderma harzianum</i>	Ausência do patógeno
11	Organismo vivo de <i>T. virens</i> (TF1)	via substrato-PEL
12	Organismo vivo de <i>T. virens</i> (TF1)	via semente- PEL
13	Organismo vivo de <i>T. virens</i> (TF1)	via substrato-2101
14	Organismo vivo de <i>T. virens</i> (TF1)	via semente-2101
15	Organismo vivo de <i>T. virens</i> (TF1)	Ausência do patógeno
16	Filtrado de cultura de <i>T. virens</i> (TF1)	via substrato-PEL
17	Filtrado de cultura de <i>T. virens</i> (TF1)	via semente- PEL
18	Filtrado de cultura de <i>T. virens</i> (TF1)	via substrato-2101
19	Filtrado de cultura de <i>T. virens</i> (TF1)	via semente-2101
20	Filtrado de cultura de <i>T. virens</i> (TF1)	Ausência do patógeno
21	Ausência de <i>Trichoderma</i> spp.	via substrato-PEL
22	Ausência de <i>Trichoderma</i> spp.	via semente- PEL
23	Ausência de <i>Trichoderma</i> spp.	via substrato-2101
24	Ausência de <i>Trichoderma</i> spp.	via semente-2101
25	Ausência de <i>Trichoderma</i> spp.	Ausência do patógeno

T. virens (TF1): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich; via substrato-PEL: Isolado de *M. phaseolina*, proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas, codificado como PEL, inoculado via substrato; via semente-PEL: Isolado de *M. phaseolina*, proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas, codificado como PEL, inoculado via semente; via substrato-2101: Isolado de *M. phaseolina*, proveniente da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos, "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), codificado como 2101, inoculado via substrato; via semente 2101: Isolado de *M. phaseolina*, proveniente da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos, "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), codificado como 2101, inoculado via semente.

Aplicação dos antagonistas via tratamento de sementes

As sementes foram tratadas com os dois isolados de *Trichoderma* spp., individualmente, após a inoculação do patógeno, por meio da aplicação de 2 mL dos filtrados

de cultura ou dos organismos vivos (suspensão de esporos viáveis na concentração de 10^5 para *T. harzianum* e 10^7 para *T. virens* (TF1), para cada 100 sementes.

Inoculação do patógeno via semente

Vinte sementes foram depositadas sobre colônias de *M. phaseolina*, desenvolvida em meio de cultura BDA durante 15 dias a temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, e permaneceram em contato com o fungo nas mesmas condições por 48 h de acordo com a metodologia de Silva et al. (2016) com modificações.

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 nove dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, os grãos de arroz foram depositados a uma profundidade de 5 cm e sobre eles foram colocadas as sementes de feijão, de acordo com a metodologia de Cruciol e Costa (2018) com modificações.

O experimento foi instalado em março de 2018, e as plantas foram cultivadas em copos plásticos com capacidade de 770 mL preenchidos com substrato comercial 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; 7- aproximadamente 25% 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): $ID (\%) = \frac{\sum(Y \cdot X_y)}{(X_t \cdot h)} * 100$, 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, 15 e 20 dias após a semeadura (CAMPBELL e MADDEN, 1990): $AACPD = \sum \left[\left(\frac{Y_1 + Y_2}{2} \right) * (t_2 - t_1) \right]$, em que Y_1 e Y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente.

Cada tratamento foi composto por quatro repetições, em que cada planta representou uma unidade experimental. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em análise fatorial 5x5 (Antagonista: 2 isolados de *Trichoderma* spp., 2 formas do antagonista: organismo vivo e filtrado de cultura e, ausência de *Trichoderma* spp. x Patógeno: 2 isolados de *M. phaseolina*, 2 formas de inoculação do patógeno: via semente ou substrato e, ausência do patógeno). Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott utilizando o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

A atividade biológica do organismo vivo e filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. sobre as plantas de feijoeiro foi avaliada aos 20 dias após a semeadura. Apenas nas plantas que receberam tratamento com *Trichoderma* spp. e não foram inoculadas com o patógeno foi mensurado o comprimento da parte aérea e da raiz, por meio da separação das partes com um corte na região do colo da planta. Em seguida, cada um dos segmentos foi colocado em sacos de papel identificados e levados à estufa de secagem a 65 °C por 96 h para a determinação da massa seca.

Os tratamentos utilizados nessa análise foram: 1) tratamento de sementes com o organismo vivo de *T. virens* (TF1); 2) tratamento de sementes com o filtrado de cultura de *T. virens* (TF1); 3) tratamento de sementes com o organismo vivo de *T. harzianum*; 4) tratamento de sementes com o filtrado de cultura de *T. harzianum* e; 5) Testemunha: tratamento de sementes com água destilada e esterilizada. Cada tratamento foi composto por quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott utilizando o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS *IN VITRO*

4.1.1 Caracterização morfológica dos isolados de *Trichoderma* spp.

Avaliando os dados referentes à caracterização morfológica dos isolados de *Trichoderma* spp., verifica-se que a esporulação média foi de $2,56.10^6$ e $2,73.10^7$ esporos.mL⁻¹, para *T. virens* (TF1) e *T. harzianum* respectivamente (Tabela 3). O diâmetro médio final das colônias de ambos os isolados de *Trichoderma* spp. foi de 90 mm. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) para *T. harzianum* foi de 6,78 mm.dia⁻¹ e para *T. virens* (TF1) foi de 5,36 mm.dia⁻¹ demonstrando similaridade entre os isolados quanto ao crescimento micelial *in vitro*. Bomfim et al. (2010) avaliando o crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. também observaram que *T. virens* e *T. harzianum* apresentaram crescimento micelial similar, sem diferirem estatisticamente.

A variação do tamanho dos conídios entre os isolados foi baixa, a média do comprimento de 30 conídios para ambos os isolados foi a mesma (3,71 µm) enquanto que a largura para *T. harzianum* foi um pouco superior (3,10 µm) a do *T. virens* (TF1) (2,82 µm). Por outro lado, Guimarães et al. (2016) analisando cinco isolados de *T. harzianum*, observaram que os conídios apresentaram medidas médias de 2,6 x 2,1 µm, as quais são inferiores às encontradas nesse estudo.

Tabela 3- Características morfológicas de isolados de *Trichoderma* spp. cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA)

Isolado	Esp.	D.C. (mm)	IVCM (mm.dia ⁻¹)	Conídio		Coloração da colônia
				comp. (µm)	larg. (µm)	
<i>T. harzianum</i>	$2,73.10^7$	90,00	6,78	3,71	3,10	Verde acinzentado
<i>T. virens</i> (TF1)	$2,56.10^6$	90,00	5,36	3,71	2,82	Cinza claro esverdeado

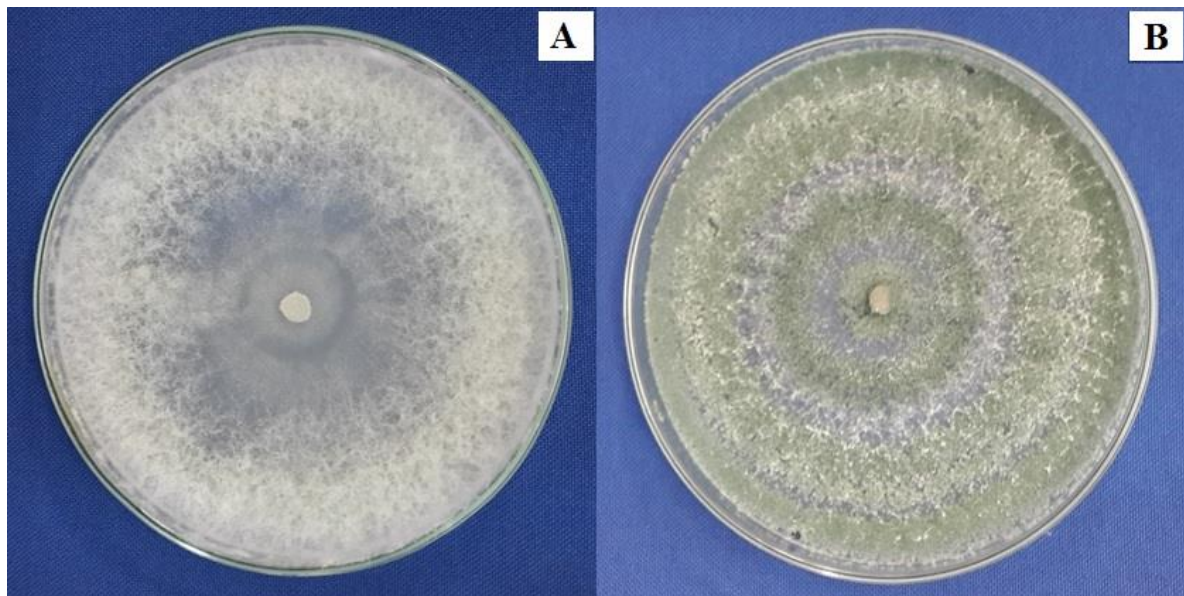
Esp.: Esporulação aos sete dias; D. C.: Diâmetro da colônia; IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial; Comp.: comprimento; Larg.: largura.

T. virens (TF1): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich.

Em relação a coloração, avaliada por meio da Carta de Cores de Munsell, houve variação entre os isolados, sendo que para *T. harzianum* foi verde acinzentado, enquanto que

para *T. virens* (TF1) a coloração foi cinza claro esverdeado (Figura 1). Segundo Saito et al. (2011) a coloração da colônia é influenciada pela quantidade de conídios, podendo variar entre tons de verde, as vezes muito claro. Dessa forma, devido *T. virens* (TF1) ter apresentado menor esporulação em relação a *T. harzianum* a coloração da sua colônia também foi mais clara.

Figura 1- Colônias de *T. virens* (TF1) (A) e *T. harzianum* (B) em meio batata-dextrose-ágar (BDA)



Milan et al. (2015) afirmam que as características dos isolados de *Trichoderma* estão mais ligadas à natureza do micro-organismo do que as condições que os conídios estão submetidos. Sánchez López et al. (2012) ressaltam que, embora pertencendo à mesma espécie, algumas características são específicas de cada isolado, dependendo do seu habitat natural e das condições que estavam submetidos.

4.1.2 Identificação molecular dos isolados PEL e TF1

Com o sequenciamento da região do fator de alongação (TEF1- α) por PCR (Figuras 2 e 3), e comparação com sequências depositadas no *GenBank*, foi construído o dendrograma para essa região utilizando o método Maximum Likelihood Tree, obtendo-se altos valores de cobertura e similaridade, que aumentam a confiabilidade do alinhamento. Observou-se que o isolado TF1 de *Trichoderma* foi colocado no mesmo grupo que a espécie *Trichoderma virens*

com *bootstrap* igual a 100. Este isolado foi depositado no *GenBank* e tem como número de acesso MK450344. O isolado PEL de *Macrophomina* foi colocado no mesmo grupo que *Macrophomina phaseolina* com *bootstrap* igual a 81, e seu número de acesso no *GenBank* é MK450343.

Figura 2- Dendrograma baseado no método Maximum Likelihood Tree derivado das sequências da região do fator de alongação (TEF1- α), com base em 1000 réplicas de *bootstrap*, do isolado TF1 (*Trichoderma virens*) e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*

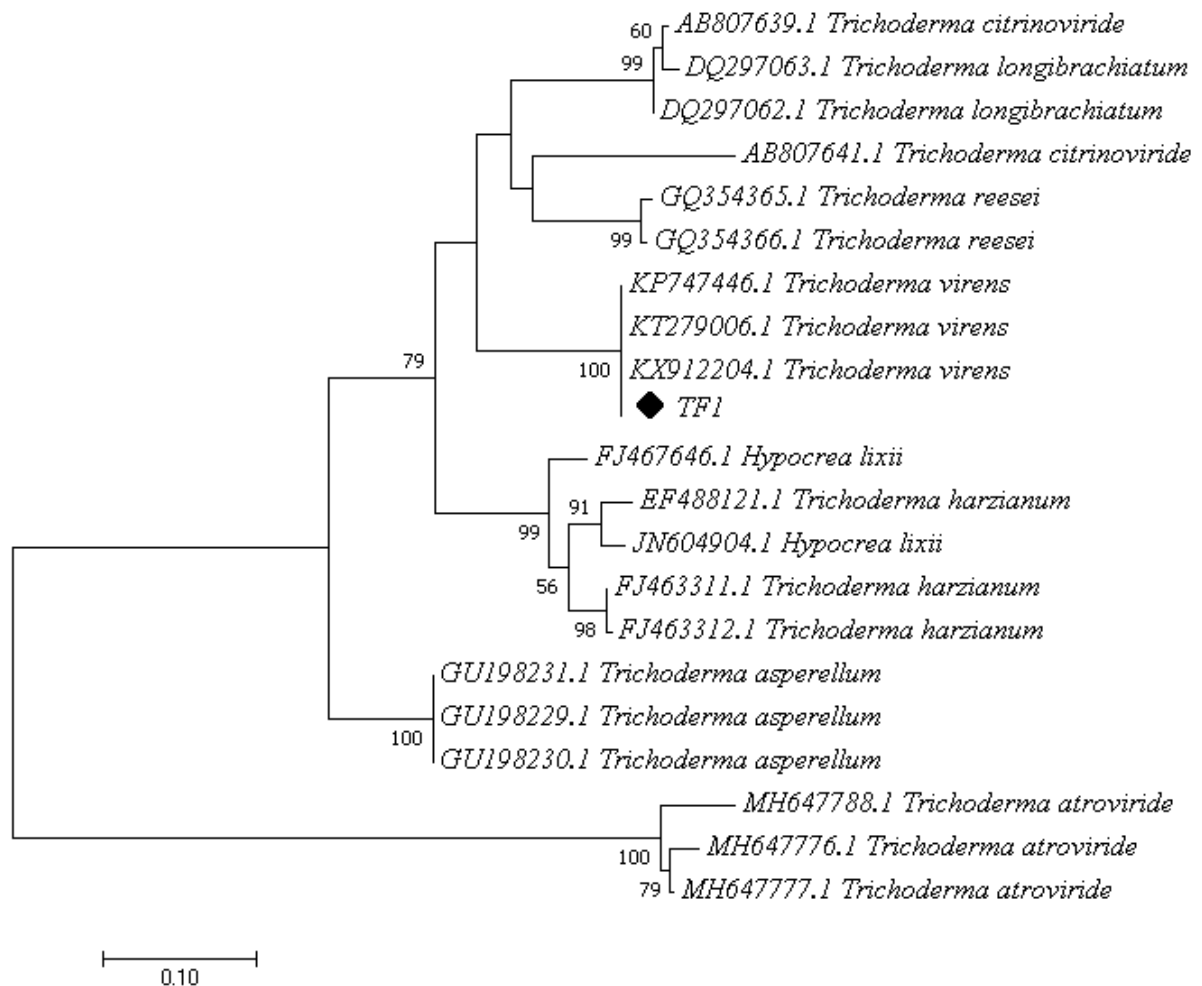
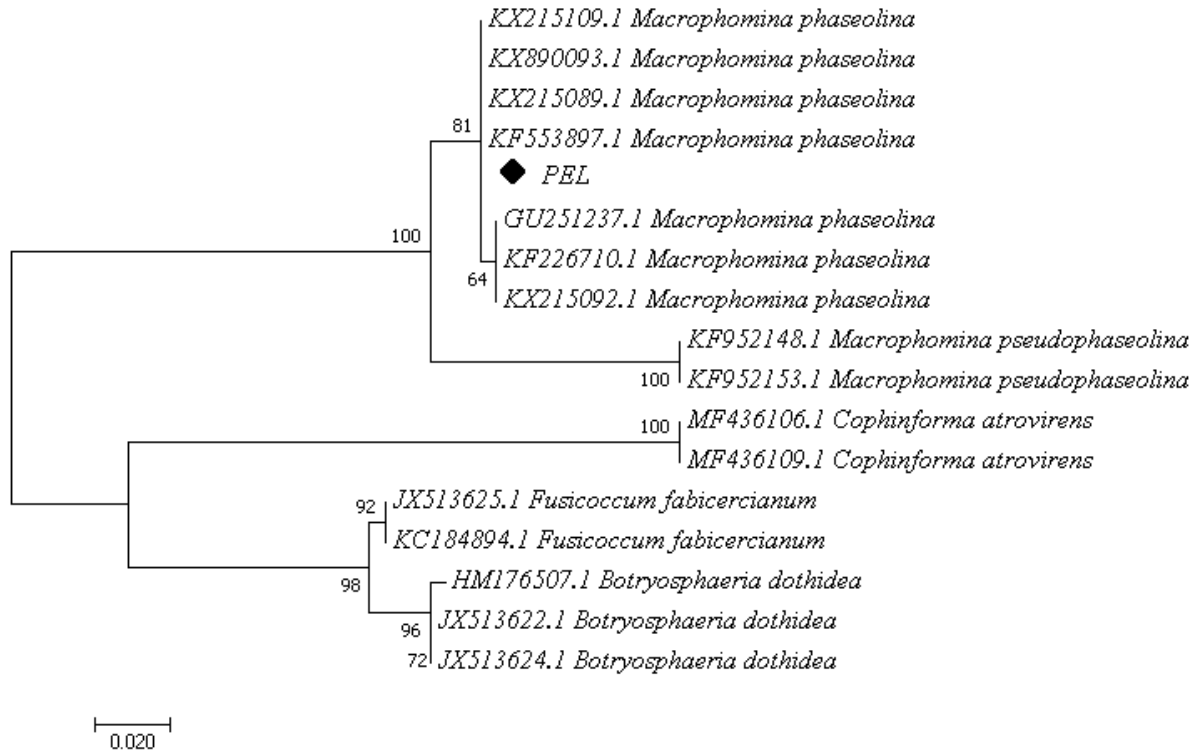


Figura 3- Dendrograma baseado no método Maximum Likelihood Tree derivado das sequências da região do fator de alongação (TEF1- α), com base em 1000 réplicas de *bootstrap*, do isolado PEL (*Macrophomina phaseolina*) e de sequências obtidas no *GenBank* de diferentes isolados da família *Botryosphaeriaceae*. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*



4.1.3 Pareamento de culturas e metabólitos voláteis

No pareamento de culturas (Tabela 4), pôde-se observar que todos os tratamentos com *Trichoderma* spp. interferiram no crescimento micelial dos dois isolados de *M. phaseolina*. Para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) não houve interação significativa entre *Trichoderma* spp. e os isolados de *M. phaseolina*, no entanto, há diferença estatística entre os isolados de *Trichoderma* spp. e *M. phaseolina* separadamente. *T. virens* (TF1) proveniente de solo rizosférico de feijoeiro foi o que proporcionou maior interferência no IVCM com valores de 4,68 e 6,32 mm.dia⁻¹ respectivamente para os isolados PEL e 2101, diferenciando-se estatisticamente de *T. harzianum*. Entretanto, Bomfim et al. (2010) avaliando o crescimento de *Rhizopus stolonifer* pareado com isolados de *Trichoderma* spp., observaram que *T. harzianum* foi capaz de interferir com maior intensidade o crescimento micelial do patógeno, quando comparado a *T. virens*.

Tabela 4- Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e percentual de inibição de crescimento micelial de *M. phaseolina* confrontada com *Trichoderma* spp. no teste de pareamento de culturas

<i>Trichoderma</i> spp.	IVCM (mm.dia ⁻¹)			% Inibição	
	<i>M. phaseolina</i>		Média	<i>M. phaseolina</i>	
	PEL	2101		PEL	2101
<i>T. harzianum</i>	5,79	7,01	6,40 b*	24,51 Ab	25,33 Ab
<i>T. virens</i> (TF1)	4,68	6,32	5,50 c	43,93 Aa	35,51 Ba
Testemunha	7,47	8,51	8,00 a	-	-
Média	5,98 b	7,28 a	-	-	-
CV (%)	5,05			7,60	

*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): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich; PEL: isolado de *Macrophomina phaseolina*, proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas; 2101: isolado de *Macrophomina phaseolina* proveniente da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos, "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Para o percentual de inibição, houve interação significativa entre os fatores (*Trichoderma* spp. x *M. phaseolina*). Os isolados de *M. phaseolina* obtiveram maior redução do crescimento micelial quando confrontados com *T. virens* (TF1) (43,93 e 35,51%, para PEL e 2101, respectivamente). Por outro lado, Das; Haridas e Sabu (2019) estudando a ação de *T. harzianum* por meio do confronto direto contra *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* causadores da podridão mole do gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) e *Phytophthora capsici* causador da podridão do pé em pimenta preta (*Piper nigrum* L.), encontraram valores de inibição superiores e que chegaram a 78,3, 45,3 e 65,3% respectivamente para cada um dos patógenos. Haddad et al. (2017) identificaram a capacidade de *T. virens* em inibir a germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e reduzir os efeitos negativos do patógeno na germinação das sementes e crescimento das plantas de soja. Djonović et al. (2007) identificaram que o menor crescimento e esporulação de mutantes de *T. virens* em relação a sua forma selvagem, não afetaram a sua capacidade micoparasita e de biocontrole, mostrando que esta não é uma limitação para a produção de enzimas.

Observa-se que os isolados de *Trichoderma* spp. também apresentaram a capacidade de produzir metabólitos voláteis, sendo este mais um mecanismo que pode ser utilizado por esses micro-organismos a fim de controlar o crescimento micelial de patógenos (Tabela 5).

Tabela 5- Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e percentual de inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* confrontada com *Trichoderma* spp. no teste de metabólitos voláteis

<i>Trichoderma</i> spp.	IVCM (mm.dia ⁻¹)			% Inibição		
	<i>M. phaseolina</i>		Média	<i>M. phaseolina</i>		Média
	PEL	2101		PEL	2101	
<i>T. harzianum</i>	7,00	1,82	4,41 b*	21,98	61,40	41,69 b
<i>T. virens</i> (TF1)	4,82	1,36	3,09 c	36,38	68,72	52,54 a
Testemunha	8,18	4,29	6,23 a			
Média	6,67 a	2,49 b		29,18 b	65,06 a	
CV (%)		22,09			20,95	

*Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

T. virens (TF1): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich; PEL: isolado de *Macrophomina phaseolina*, proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas; 2101:isolado de *Macrophomina phaseolina* proveniente da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos, "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Os fatores avaliados, patógeno e antagonista, não apresentaram interação significativa em nenhuma das variáveis analisadas, porém, pôde-se observar que *T. virens* (TF1) mais uma vez apresentou maior capacidade de interferir no crescimento micelial do patógeno, observado no IVCM e no percentual de inibição do crescimento micelial de ambos os isolados patogênicos. Para o tratamento com *T. harzianum* o IVCM foi de 4,41 mm.dia⁻¹ e para *T. virens* (TF1) foi de 3,09 cm.dia⁻¹. No percentual de inibição, *T. virens* (TF1) foi responsável por inibir 52,54% do crescimento micelial do patógeno, diferenciando-se estatisticamente de *T. harzianum* que inibiu 41,69%. Micro-organismos que possuem a capacidade de produzir metabólitos de efeito fungistático ou fungicida que impedem a germinação de esporos ou o crescimento e esporulação de fitopatógenos, vem a somar em programas de biocontrole (SOLINO et al., 2017).

Em outros estudos, a eficiência dos isolados de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento micelial de fitopatógenos, diferenciou-se nos testes de pareamento de culturas e metabólitos voláteis, mostrando que os isolados dos antagonistas podem apresentar diferenças quanto aos mecanismos de ação em cada um dos testes (ISAIAS et al., 2014). Nesse mesmo estudo, foi possível observar que isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de inibir mais de 60% o crescimento micelial de fitopatógenos no teste de metabólitos voláteis, corroborando aos resultados encontrados no presente estudo. Metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. também foram relatados em outros estudos, apresentando grande eficiência

na inibição do crescimento micelial e da produção de microescleródios de *M. phaseolina* (BROETTO et al., 2014).

Os resultados de ambos os testes mostraram de que a ação de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento micelial do patógeno foi maior quando estes apresentavam menor IVCM isoladamente, observado no isolado PEL no pareamento de culturas, e no isolado 2101 no teste de metabólitos voláteis, favorecendo a ação do antagonista mais rápida. A ação de *Trichoderma* spp. também se torna mais eficiente se linhagens desse antagonista apresentarem mais de um mecanismo ação (parasitismo, antibiose, competição, entre outros) assim, quando confrontados com o patógeno, há um maior potencial no controle deste (MACHADO et al., 2012).

4.1.4 Metabólitos não voláteis e enzimas de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*

É possível observar que para *T. virens* os tratamentos 2, 3, 4 e 6 obtiveram maior biomassa fúngica seca e foram influenciados especialmente pela agitação de 180 rpm (Tabela 6). Para *T. harzianum* o tratamento 6 apresentou maior biomassa fúngica seca, porém, apesar da agitação do meio também ser igual a 180 rpm, outros fatores podem ter influenciado o resultado, visto que os demais tratamentos com a mesma agitação diferiram estatisticamente deste (Tabela 7).

Apenas para *T. virens* (TF1) a condição de agitação de 180 rpm também esteve presente no tratamento que apresentou maior inibição do crescimento micelial do patógeno (tratamento 4), possivelmente pelo antagonista utilizar dessa condição para se desenvolver vegetativamente e em menor intensidade para a produção de metabólitos com ação fungicida. Em estudo realizado por Soares e Maringoni (2018), com *Fusarium* spp., a agitação do meio promoveu diferenciação da coloração da colônia, possivelmente em função da produção de substâncias e pigmentos, bem como, na produção de uma densa camada micelial branca na superfície dos tratamentos sem agitação.

Tabela 6- Biomassa fúngica seca de filtrados de cultura de *T. virens* e o efeito dos filtrados no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*

Tratamento	pH	Sacarose (g.L ⁻¹)	Agitação (rpm)	Concentração de esporos	Biomassa fúngica seca (g)	% Inibição PEL	% Inibição 2101
1	7	50	100	10 ⁷	0,90 c	1,13 c	8,26 b
2	7	50	180	10 ⁵	1,58 a	1,93 c	0,00 c
3	7	100	180	10 ⁵	1,49 a	1,32 c	7,70 b
4	5	100	180	10 ⁷	1,78 a	17,63 a	36,45 a
5	7	100	100	10 ⁷	0,90 c	2,47 c	2,88 c
6	5	50	180	10 ⁷	1,72 a	9,71 b	8,08 b
7	5	100	100	10 ⁵	0,73 c	2,15 c	5,27 c
8	5	50	100	10 ⁵	0,83 c	2,82 c	14,05 b
9	6	75	140	10 ⁶	1,25 b	0,73 c	1,20 c
10	6	75	140	10 ⁶	1,19 b	1,19 c	0,38 c
11	6	75	140	10 ⁶	0,98 c	5,92 c	1,19 c
CV (%)					14,00	61,69	74,02

*Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. *T. virens* (TF1): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich; PEL: isolado de *Macrophomina phaseolina*, proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas; 2101:isolado de *Macrophomina phaseolina* proveniente da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos, "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Para ambos os isolados de *M. phaseolina* os resultados dos filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. apresentaram grande similaridade em relação ao tratamento com maior percentual de inibição do crescimento micelial, sendo que para *T. virens* (TF1) o tratamento que apresentou maior inibição foi o 4 (pH 5, agitação de 180 rpm, 100g.L⁻¹ de sacarose e 10⁷ conídios.mL⁻¹), e para *T. harzianum* o tratamento foi o 8 (pH 5, agitação de 100rpm, 50g.L⁻¹ de sacarose e 10⁵ conídios.mL⁻¹). Pôde-se observar que para ambos os tratamentos o pH é igual a 5, já comprovado pela literatura que fungos de forma geral, desenvolvem-se melhor em meios com pH neutro ou ligeiramente ácido (MELLO; REIS; SILVA, 2011).

Outros estudos também relatam a eficiência na utilização de filtrados de cultura de *Trichoderma* no controle de patógenos habitantes do solo, tais como *Sclerotinia sclerotiorum*, em que se observou a ação de isolados de *Trichoderma* spp. por meio de metabólitos voláteis em conjunto aos metabólitos não termo-lábeis (filtrados de cultura), ressaltando a importância de se selecionar isolados que atuam utilizando mais de um mecanismo, conferindo-lhe vantagem quando liberado no meio ambiente (LOUZADA et al., 2016).

Tabela 7- Biomassa fúngica seca de filtrados de cultura de *T. harzianum* e o efeito dos filtrados no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*

Tratamento	pH	Sacarose (g.L ⁻¹)	Agitação (rpm)	Concentração de esporos	Biomassa fúngica seca (g)	% Inibição PEL	% Inibição 2101
1	7	50	100	10 ⁷	0,54 c	0,00 d	23,25 b
2	7	50	180	10 ⁵	0,67 c	0,00 d	29,72 a
3	7	100	180	10 ⁵	0,56 c	0,18 d	26,88 a
4	5	100	180	10 ⁷	1,14 b	6,74 b	19,34 b
5	7	100	100	10 ⁷	0,48 c	0,00 d	15,34 b
6	5	50	180	10 ⁷	1,50 a	3,32 c	25,96 a
7	5	100	100	10 ⁵	0,53 c	0,00 d	17,70 b
8	5	50	100	10 ⁵	0,93 c	24,21ad	32,77 a
9	6	75	140	10 ⁶	0,86 c	0,46 d	20,53 b
10	6	75	140	10 ⁶	0,79 c	1,75 d	26,63 a
11	6	75	140	10 ⁶	0,70 c	0,00 d	27,87 a
CV (%)					24,84	57,10	21,17

*Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. *T. virens* (TF1): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich; PEL: isolado de *Macrophomina phaseolina*, proveniente da micoteca da Universidade Federal de Pelotas; 2101: isolado de *Macrophomina phaseolina* proveniente da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos, "Prof. Maria Menezes" da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

4.1.5 Atividade de quitinase

Na Tabela 8, pode-se observar a diferenciação na atividade de quitinase entre os tratamentos testados, em que para *T. harzianum* o tratamento que apresentou maior atividade foi o de número 5 com atividade enzimática de 0,75 U/mL e para *T. virens* (TF1) o tratamento que proporcionou maior atividade foi o 7 com valor de 0,175 U/mL. Esses tratamentos têm em comum a agitação de 100 rpm e a quantidade de sacarose de 100g.L⁻¹. Parâmetros de fermentação como o tempo e condições do meio podem influenciar na produção de metabólitos secundários (PFEFFERLE et al., 2000), sendo que a otimização das condições de cultura pode levar a produção de compostos mais eficazes (SPECIAN et al., 2014). Ribas; Sand; Matsumura (2014) encontraram concentrações superiores de atividade de quitinase de isolados de *Trichoderma* spp., cultivados em meio modificado de Mandel e Reese, por 96 h, as quais variaram de 7,86 a 13,54 U/mL, possivelmente devido a presença de micélio de *Bipolaris sorokiniana* no meio, o que induziu maior produção da enzima.

Tabela 8- Atividade de quitinase dos filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. em função dos tratamentos em meio de cultura líquido compostos por sacarose, água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), concentração de esporos, agitação do meio e o potencial de hidrogênio (pH) ajustado para cada tratamento

Tratamento	pH	Sacarose (g.L ⁻¹)	Agitação (rpm)	Concentração de esporos	Atividade de quitinase (U/mL)	
					<i>T. harzianum</i>	<i>T. virens</i> (TF1)
1	7	50	100	10 ⁷	0,043 a	0,021 g
2	7	50	180	10 ⁵	0,042 a	0,025 f
3	7	100	180	10 ⁵	0,061 a	0,037 e
4	5	100	180	10 ⁷	0,065 a	0,061 d
5	7	100	100	10 ⁷	0,752 e	0,024 g
6	5	50	180	10 ⁷	0,204 c	0,035 e
7	5	100	100	10 ⁵	0,062 a	0,175 a
8	5	50	100	10 ⁵	0,538 d	0,030 f
9	6	75	140	10 ⁶	0,061 a	0,093 c
10	6	75	140	10 ⁶	0,116 b	0,100 b
11	6	75	140	10 ⁶	0,052 a	0,042 e
CV (%)					15,46	6,62

*Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. *T. virens* (TF1): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich.

O tratamento 8 de *T. harzianum*, que apresentou eficiência na inibição do crescimento micelial do patógeno (Tabela 7), também apresentou alta atividade da enzima quitinase (Tabela 8), podendo esta ser uma das enzimas que atua na inibição do crescimento micelial do patógeno. *Trichoderma* spp. ao utilizar diferentes genes da quitinase, degrada a quitina que é um dos principais componentes da parede celular de fungos fitopatogênicos (PANDIAN; RAJA; SHARMA, 2018).

4.1.6 Atividade de β -1,3-glucanase

Para a determinação da atividade de β -1,3-glucanase, foram selecionados os tratamentos dos filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. que apresentaram maior percentual de inibição do crescimento micelial do patógeno. Dessa forma, para *T. harzianum* foi utilizado o tratamento 8, cuja condição de crescimento foi: pH 5, agitação de 100rpm, 50g.L⁻¹ de sacarose e 10⁵ conídios.mL⁻¹ e para *T. virens* (TF1) foi utilizado o tratamento 4 com a condição de: pH 5, agitação de 180 rpm, 100g.L⁻¹ de sacarose e 10⁷ conídios.mL⁻¹. *T.*

harzianum apresentou atividade de 0,86 U/mL, entretanto, *T. virens* (TF1) não apresentou atividade enzimática (Tabela 9). Por outro lado, Djonović et al. (2007) constataram a capacidade de mutantes de *T. virens* expressarem dois genes relacionados a duas enzimas degradadoras de glucana (β -1,3 e β -1,6-glucanase) na mesma espécie genética, com uma ação mais ampla e sobre maiores concentrações de fitopatógenos quando comparado a sua forma selvagem, além disso, obteve maiores níveis das enzimas quanto maior a concentração do patógeno presente.

Tabela 9- Atividade de β -1,3-glucanases dos filtrados de cultura de *Trichoderma* spp., na condição 4 (pH 5, agitação de 180 rpm, 100g.L⁻¹ de sacarose e 10⁷ conídios.mL⁻¹) para *T. virens* (TF1) e condição 8 (pH 5, agitação de 100 rpm, 50g.L⁻¹ de sacarose e 10⁵ conídios.mL⁻¹) para *T. harzianum*

<i>Trichoderma</i>	pH	Sacarose (g.L ⁻¹)	Agitação (rpm)	Concentração de esporos	Atividade (U/mL)
<i>T. virens</i> (TF1)	5	100	180	10 ⁷	0
<i>T. harzianum</i>	5	50	100	10 ⁵	0,86

T. virens (TF1): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich.

Em estudo realizado por Chaibub et al. (2016), *Cladosporium* sp. também foi utilizado como antagonista no controle de *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone do arroz, e constatou-se a ação direta do antagonista sobre o patógeno, bem como, induzindo resistência à planta através da ativação de enzimas de defesa, dentre elas a β -1,3-glucanase. Segundo Marco e Felix (2007), a atividade enzimática de β -1,3-glucanase de *Trichoderma harzianum* é estimulada quando na presença de paredes celulares do fungo fitopatogênico *Pythium* spp., as quais são compostas por β -glucano. Lima et al. (2017) avaliando a atividade de β -1,3-glucanase de *T. harzianum* em meio suplementado com micélio de *Guignardia citricarpa*, observaram maior expressão da atividade nas primeiras horas de crescimento (48 h), possivelmente pela produção dessa enzima ser oriunda do metabolismo primário do fungo antagonista, e, após, observou-se um pico maior às 96 h de cultivo, provavelmente devido a degradação da parede celular do patógeno.

Devido a parede celular de *M. phaseolina* ser composta por quitina e β -1,3-glucana (BROETTO et al., 2014), a produção de quitinases e β -1,3-glucanase por parte de isolados de *Trichoderma* spp. age diretamente na inibição do seu desenvolvimento, impedindo o

crescimento fúngico, colonização do tecido vegetal e progresso da doença (SOUSA et al., 2018).

4.1.7 Análise cromatográfica dos compostos presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma* spp.

A melhor condição de inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, foi encontrada no tratamento 4 (pH 5, agitação de 180 rpm, 100g.L⁻¹ de sacarose e 10⁷ conídios.mL⁻¹) e 8 (pH 5, agitação de 100 rpm, 50g.L⁻¹ de sacarose e 10⁵ conídios.mL⁻¹), para *T. virens* (TF1) e *T. harzianum* respectivamente. Com base nesses resultados, realizou-se a separação dos componentes químicos desses filtrados de cultura por meio de solventes, com diferentes polaridades. Nas tabelas 10 e 11 é possível observar os constituintes químicos majoritários destes filtrados de cultura, sendo que esses constituintes variaram conforme o solvente utilizado para a extração líquido-líquido.

A análise cromatográfica demonstrou a presença de oxidrilas em ambos os filtrados de *Trichoderma* spp., e a presença de ácidos graxos também foi observada no filtrado de *T. virens* (TF1), além de outros compostos. A utilização do Hexano como extrator permitiu identificar outros compostos presentes na solução, tais como éster, alcano, epóxido, composto aromático, imônio e alcóxido. A utilização dos solventes acetato de etila (polaridade intermediária), metanol e etanol (polares), por apresentarem maior solubilidade em água, identificaram as oxidrilas, as quais apresentam o grupo funcional -OH que são solúveis em solventes polares, em função da associação resultante das ligações de hidrogênio (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013). As oxidrilas, também chamadas de hidroxilas, são espécies ativas de oxigênio que desempenham várias funções de resposta de defesa das plantas ao reconhecer um ataque patogênico, estimulando o sistema de sinalização imunológica da planta (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

A utilização de metanol também identificou ácidos graxos, apesar deste composto ser considerado apolar, em função de apresentar uma cadeia carbônica maior, a parte da cadeia ligada ao grupo carboxila (COOH) é polar devido ao O ser eletronegativo, e por isso apresentou solubilidade em metanol. Os ácidos graxos têm ação antimicrobiana sobre fungos, especialmente na membrana celular destes, pois causam aumento na fluidez da membrana, resultando em desorganização generalizada, que leva a alterações conformacionais e extravasamento dos componentes intracelulares (POHL; KOCK; THIBANE, 2011).

Tabela 10- Identificação dos três principais componentes presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma virens* (TF1) (isolado de solo rizosférico de feijoeiro) extraídos com quatro solventes: hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) (min), a unidade área (UA) e a área (%)

NOMENCLATURA IUPAC	HEXANO			ACETATO ETILA			METANOL			ETANOL		
	TR (min)	UA	Área (%)	TR (min)	UA	Área (%)	TR (min)	UA	Área (%)	TR (min)	UA	Área (%)
ÁCIDOS GRAXOS												
Cyclopropaneoctanoic acid, 2-hexyl-, methyl e							25,715	22919	17,19			
OXIDRILAS												
1-Butanol, 3-methyl-				3,771	487796	7,18						
2,3- Butanediol, [R-(R*,R*)]-				4,400	639231	9,41						
2,3- Butanediol, [R-(R*,R*)]-				4,559	535304	7,88						
Phenylethyl Alcohol							5,481	52734	39,54			
4-(1-hydroxy-ethyl). gamma. Butanolactone							7,224	57701	43,27	7,236	30440	9,83
Benzeneethanol (CAS)										5,466	29569	9,55
OUTROS COMPOSTOS												
Ethanone, 1-(3-ethyloxiranyl)-(CAS)	7,039	1464594	9,82									
Ethanone, 1-(3-butyloxiranyl)-(CAS)	7,482	1173783	7,87									
Diazene, cyclohexylmethyl-, 1-oxide, (E)-(CAS)	8,105	567716	3,81									
Benzene, methyl- (CAS)				4,285	631896	9,31						
Methyl stearate										26,147	38875	12,55

Tabela 11- Identificação dos três principais componentes presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma harzianum* (proveniente do produto comercial Ecotrich) extraídos com quatro solventes: hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) (min), a unidade área (UA) e a área (%)

NOMENCLATURA IUPAC	HEXANO			ACETATO ETILA			METANOL			ETANOL		
	TR (min)	UA	Área (%)	TR (min)	UA	Área (%)	TR (min)	UA	Área (%)	TR (min)	UA	Área (%)
OXIDRILAS												
2-Hydroxy-gamma-butyrolactone							3,857	65334	9,88	3,854	81793	7,94
Acetate, 2-butenyl-4-hydroxy-3-methyl							10,177	48420	7,32	10,178	56343	5,47
Guanosine (CAS)							11,645	547393	82,79			
Xanthosine (CAS)										11,755	589371	57,21
OUTROS COMPOSTOS												
Ethanone, 1-(3-ethyloxiranyl)- (CAS)	7,024	1806026	8,70									
3-BUTENYL HEXYL ETHER	7,467	1556089	7,50									
Hexacosane (CAS)	45,419	1002567	4,83									
Hexadecanoic acid, methyl ester				32,386	6111171	7,02						
8-Hexadecenal, 14-methyl-, (Z)				39,300	5814583	6,68						
2-Butyl-3-methyl-5-(2-methylprop-2-enyl)cyclo				40,205	4820079	5,54						

4.2 ENSAIOS *IN VIVO*

4.2.1 Atividade biológica de filtrado de cultura e organismo vivo de *Trichoderma* spp. sobre plântulas de feijoeiro

Na atividade biológica de organismo vivo e filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. sobre a germinação de sementes e plântulas de feijoeiro (Tabela 12), ambos os isolados do antagonista, *T. harzianum* e *T. virens* (TF1), e suas formas, organismo vivo ou filtrado de cultura, não foram capazes de afetar significativamente a primeira contagem de germinação (PC) e germinação final (G). É importante salientar que o lote de sementes utilizado apresentou germinação e vigor altos, e dessa forma os tratamentos podem não ter interferido significativamente nesses caracteres.

Tabela 12- Atividade biológica de organismo vivo e filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. sobre germinação de sementes e plântulas de feijoeiro

Tratamento	PC (%)	G (%)	CPA (cm)	CR (cm)	MSPA (g)	MSR (g)
Organismo vivo de <i>T. virens</i> (TF1)	90,00	90,00	4,20 d*	6,46 c	0,17 d	0,06 c
Filtrado de cultura de <i>T. virens</i> (TF1)	89,75	90,00	5,16 c	8,13 b	0,22 c	0,06 c
Organismo vivo de <i>T. harzianum</i>	90,50	90,50	5,95 b	10,39 a	0,24 c	0,10 b
Filtrado de cultura de <i>T. harzianum</i>	91,75	91,75	6,82 a	11,46 a	0,27 b	0,11 a
Testemunha	92,50	92,50	6,60 a	11,10 a	0,31 a	0,11 a
CV (%)	4,57	4,49	8,87	10,19	10,98	12,87

*Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

T. virens (TF1): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich.

PC: Primeira contagem; G: Germinação final; CPA: Comprimento de parte aérea; CR: Comprimento de raiz; MSPA: Massa seca de parte aérea; MSR: Massa seca de raiz.

Acredita-se também que não houve efeito significativo, em função do tempo inadequado em que o antagonista esteve em contato com as sementes, bem como a concentração de esporos utilizada para permitir uma ação efetiva. O ambiente (papel germitest) não proporcionou a condição de seu habitat natural, que na maioria das vezes é o solo, colonizando as raízes das plantas, e em alguns casos, também as partes aéreas da planta ou então, o seu interior como endófitos (GUZMÁN-GUZMÁN et al., 2019). Sendo assim, o sucesso de bioprodutos formulados à base de *Trichoderma* spp. é afetado tanto pelos fatores bióticos locais (organismos vivos presentes) como fatores abióticos (tipo de solo, umidade,

pH e temperatura) (LUCON, 2009). Cadore et al. (2018) concluíram que as formas de tratamento, formulação líquida, pó e restrição hídrica, bem como, o tempo de contato do antagonista com as sementes de soja interferem significativamente na emergência e crescimento inicial da cultura.

Em relação às demais variáveis analisadas de comprimento de parte aérea (CPA) e raiz (CR) e as massas secas, tanto de parte aérea (MSPA) quanto de raiz (MSR), pôde-se observar que a maior parte dos tratamentos com *Trichoderma* spp. provocou efeitos negativos a elas. Outros estudos evidenciaram resultados semelhantes, em que *Trichoderma*, por ser um fungo habitante de solo, ao ser submetido a condições fora de seu habitat natural, pode acabar agindo como apodrecedor de sementes (ETHUR et al., 2012). *T. virens* (TF1) foi o que provocou efeitos negativos mais significativos ao crescimento das plântulas, demonstrando que isolados de *Trichoderma* spp. em algumas situações podem atuar negativamente no vigor e desenvolvimento de plântulas (HAJIEGHRARI, 2010).

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

Não houve interação entre patógeno e *Trichoderma* spp. no que diz respeito a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) (Tabela 13), mas pôde-se perceber que a maioria dos tratamentos onde o antagonista foi aplicado, tanto na forma de organismo vivo como filtrado de cultura de *Trichoderma* spp., controlaram a podridão cinzenta do caule, diferenciando-se estatisticamente dos tratamentos em que se inoculou somente o patógeno.

Metabólitos produzidos por isolados de *Trichoderma* podem estar ligados a indução da expressão de genes relacionados a respostas sistêmicas de defesa da planta (VINALE et al., 2008). O efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *M. phaseolina*, já foi relatado tanto pelo antagonista agir indiretamente sobre o patógeno, ativando as respostas de defesa nas plantas, como também de forma direta, agindo sobre o crescimento do patógeno (KHALEDI e TAHERI, 2016). Sarrocco et al. (2017) também comprovaram a ação de *T. virens* em induzir mecanismos de resistência sistêmica em tomateiro contra *Botrytis cinerea*, por meio da expressão de genes de endopoligalacturase que são utilizados pelos fungos fitopatogênicos na penetração no hospedeiro, desencadeando reações de defesa da planta para quando vir a entrar em contato com o patógeno.

Tabela 13- Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) na cultura do feijoeiro, cultivar IPR Graúna, tratada com organismo vivo e filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. no controle da podridão cinzenta do caule causada por *M. phaseolina*

<i>Trichoderma</i>	Patógeno					Média
	2101 (A)	2101 (S)	PEL (A)	PEL (S)	AP	
AT	75,00	81,25	31,25	90,00	10,00	57,50 a
THF	78,75	45,00	22,50	70,00	10,00	45,25 a
THV	25,00	48,75	18,75	21,25	10,00	24,75 b
TFF	30,00	61,25	17,50	58,75	10,00	35,50 b
TFV	16,25	66,25	17,50	57,50	10,00	33,50 b
Média	45,00 a	60,50 a	21,50 b	59,50 a	10,00 c	
CV (%)	21,47 ¹					

*Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

¹Os dados foram transformados em $(X+1)^{0,5}$.

AT: Ausência de *Trichoderma*; THF: Filtrado de cultura de *T. harzianum*; THV: Organismo vivo de *T. harzianum*; TFF: Filtrado de cultura de *T. virens* (TF1); TFV: Organismo vivo de *T. virens* (TF1); 2101 (A): inoculação via substrato-2101; 2101 (S): inoculação via semente-2101; PEL (A): inoculação via substrato- PEL; PEL (S): inoculação via semente-PEL; AP: Ausência do patógeno.

Pôde-se observar que o isolado patogênico 2101 mostrou-se mais agressivo, causando maior severidade da doença nas plantas em que foi inoculado. Almeida et al. (2003) relatam que há variações genéticas entre e dentro das populações brasileiras de *M. phaseolina*, que refletem diretamente na ausência de resistência entre os genótipos comerciais de soja. Do mesmo modo, a inoculação do patógeno via contato direto com a semente (S) também se mostrou mais eficiente em causar sintomas mais severos na planta, tanto para o isolado 2101 como para o isolado PEL. Estudos também relataram que este método de inoculação do patógeno foi responsável em desenvolver sintomas mais precoces em plantas de soja (CRUCIOL e COSTA, 2018). Em alguns casos, devido a severidade dos danos, esses tratamentos interferiram diretamente na germinação da semente, através do retardamento da germinação ou apodrecimento da semente. Esse método de inoculação também provocou, em outros estudos, redução na emergência e desenvolvimento de plântulas de feijoeiro (SILVA et al., 2016).

No que diz respeito ao Índice de Doença (ID), esse foi verificado aos 10 e 20 dias após a semeadura. Em relação aos 10 dias após a semeadura, houve interação entre patógeno e *Trichoderma* spp., podendo-se observar que os tratamentos com organismo vivo de *T. harzianum* apresentaram o menor Índice de doença, e conseqüentemente o controle da

doença, especialmente nos tratamentos que mantiveram o contato direto entre patógeno e semente, e que causaram os maiores sintomas na ausência de *Trichoderma* spp. (Tabela 14).

Tabela 14- Índice de doença (ID) aos 10 dias após a semeadura da cultura do feijoeiro cultivar IPR Graúna, tratada com organismo vivo e filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. no controle da podridão cinzenta do caule causada por *M. phaseolina*

<i>Trichoderma</i>	Patógeno				
	2101 (A)	2101 (S)	PEL (A)	PEL (S)	AP
AT	12,50 Ba*	22,22 Aa	5,56 Ca	25,00 Aa	2,78 Ca
THF	15,28 Aa	8,33 Bb	4,17 Ba	15,28 Ab	2,78 Ba
THV	2,78 Ab	8,33 Ab	4,17 Aa	5,56 Ab	2,78 Aa
TFF	6,94 Bb	16,67 Aa	2,78 Ba	9,72 Ab	2,78 Ba
TFV	2,78 Bb	15,28 Aa	2,78 Ba	13,89 Ab	2,78 Ba
CV (%)	28,46				

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

¹Os dados foram transformados em $(X+1)^{0,5}$.

AT: Ausência de *Trichoderma*; THF: Filtrado de cultura de *T. harzianum*; THV: Organismo vivo de *T. harzianum*; TFF: Filtrado de cultura de *T. virens* (TF1); TFV: Organismo vivo de *T. virens* (TF1); 2101 (A): inoculação via substrato-2101; 2101 (S): inoculação via semente-2101; PEL (A): inoculação via substrato- PEL; PEL (S): inoculação via semente-PEL; AP: Ausência do patógeno.

Por se tratar de organismo vivo, vários mecanismos podem estar atuando conjuntamente, dentre eles os metabólitos voláteis. Esses por sua vez apresentam vantagem sobre os metabólitos não voláteis, presentes nos filtrados de cultura, pois estes têm a capacidade de difusão em interstícios, bem como na solução do solo, quando solúveis em água, podendo atingir micro-organismos fisicamente distantes, já os metabólitos não voláteis, estão sujeitos à adsorção e biodegradação e seu efeito ser altamente restrito, especialmente se o metabólito ter baixa solubilidade em água (LOBO JUNIOR e ABREU, 2000).

A capacidade de inibição da produção de estruturas de resistência pode ter sido uma medida utilizada para o controle do patógeno, sendo essa uma importante peculiaridade de isolados de *Trichoderma* spp., pois é um mecanismo de controle que pode atuar preventivamente, eliminando-se propágulos do patógeno que servem como inóculo inicial (NASCIMENTO et al., 2016), este contudo, não é observado quando realizada a utilização de alguns fungicidas químicos (ZANCAN et al., 2012).

Dessa forma, ressalta-se a importância do controle das doenças de forma preventiva, bem como, a efetividade dos isolados nesse primeiro momento, para se ter um bom estabelecimento da cultura no campo. Condições adequadas de água, nutrientes, radiação

solar, bem como, sementes de alta qualidade também são fundamentais para se obter um bom estabelecimento inicial da cultura no campo, garantindo melhor capacidade competitiva a fatores como doenças, plantas daninhas e condições ambientais que podem vir a interferir na sua produtividade (MONDO; NASCENTE; NETO, 2016).

Em relação aos 20 dias após a semeadura, o Índice de doença foi maior nos tratamentos com a ausência de *Trichoderma* spp. (AT) e tratados com o filtrado de cultura de *T. harzianum* (THF) diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 15). O isolado PEL inoculado via substrato apresentou menor agressividade (7,22) quando comparado a sua inoculação via contato direto com a semente e ao isolado 2101, independente do tratamento com *Trichoderma* spp. Assim, foi possível observar a ação do *Trichoderma* independente dos isolados e formas de inoculação do patógeno, em que, em sua maioria, tanto o organismo vivo quanto o filtrado de cultura foram eficientes no controle, apresentando menor Índice de doença nos tratamentos em que foram utilizados.

Tabela 15- Índice de doença (ID) aos 20 dias após a semeadura da cultura do feijoeiro cultivar IPR Graúna, tratada com organismo vivo e filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. no controle da podridão cinzenta do caule causada por *M. phaseolina*

<i>Trichoderma</i>	Patógeno					Média
	2101 (A)	2101 (S)	PEL (A)	PEL (S)	AP	
AT	23,61	23,61	9,72	25,00	2,78	16,94 a*
THF	25,00	13,89	9,72	20,83	2,78	14,44 a
THV	8,33	15,28	5,56	6,94	2,78	7,78 b
TFF	9,72	18,06	5,56	19,44	2,78	11,11 b
TFV	6,94	19,44	5,56	16,67	2,78	10,28 b
Média	14,72 a	18,06 a	7,22 b	17,78 a	2,78 c	
CV (%)	31,77 ¹					

*Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

¹Os dados foram transformados em $(X+1)^{0,5}$.

AT: Ausência de *Trichoderma*; THF: Filtrado de cultura de *T. harzianum*; THV: Organismo vivo de *T. harzianum*; TFF: Filtrado de cultura de *T. virens* (TF1); TFV: Organismo vivo de *T. virens* (TF1); 2101 (A): inoculação via substrato-2101; 2101 (S): inoculação via semente-2101; PEL (A): inoculação via substrato- PEL; PEL (S): inoculação via semente-PEL; AP: Ausência do patógeno.

Nessa avaliação destaca-se a importância do controle prévio para que não ocorra o progresso da doença e essa seja controlada, especialmente se tratando de patógenos habitantes do solo. Assim como outros patógenos desse tipo, *M. phaseolina* possui uma gama de hospedeiro e capacidade em se adaptar a condições adversas, especialmente por produzir microescleródios, estruturas de resistência do patógeno formado pela compactação das hifas e

de coloração escura pela produção de melanina, que garantem uma grande diversidade genética dentro da espécie o que dificulta as medidas de controle (ISHIKAWA et al., 2018; SÁNCHEZ et al., 2017).

Em relação a atividade biológica do organismo vivo e filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. sobre as plantas de feijoeiro, pôde-se verificar que apenas no comprimento das raízes se obteve uma promoção de crescimento, de 28,72 cm e 28,52 cm para os tratamentos com organismo vivo e filtrado de cultura de *T. virens* (TF1), respectivamente, diferenciando-se do tratamento testemunha em que o crescimento foi de 25,95 cm (Tabela 16). O crescimento das raízes promovido por *T. virens* (TF1) pode ter ocorrido, por *Trichoderma* spp. produzir metabólitos que interferem no índice mitótico, estimulando a divisão celular das raízes, e assim, promover o crescimento das mesmas (AGUIAR et al., 2015). Além disso, Contreras-Cornejo et al. (2009) observando em estudo a indução do crescimento de raízes laterais e aumento do acúmulo de biomassa de *Arabidopsis* pela utilização de *T. virens*, associaram esse efeito a produção de enzimas vegetais ou regulação da expressão gênica de auxina, interagindo especialmente com receptores de auxina.

Tabela 16- Atividade biológica de organismo vivo e filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. sobre plantas de feijoeiro

Tratamento	CPA (cm)	CR (cm)	MSPA (g)	MSR (g)
Organismo vivo de <i>T. harzianum</i>	33,92	24,90 b*	0,57 b	0,34 b
Filtrado de cultura de <i>T. harzianum</i>	34,45	25,10 b	0,66 a	0,42 b
Organismo vivo de <i>T. virens</i> (TF1)	32,65	28,72 a	0,61 b	0,50 a
Filtrado de cultura de <i>T. virens</i> (TF1)	30,50	28,52 a	0,58 b	0,40 b
Testemunha	32,38	25,95 b	0,70 a	0,52 a
CV (%)	8,18	10,72	13,94	26,89

*Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 20% de probabilidade de erro.

PC: Primeira contagem; G: Germinação final; CPA: Comprimento de parte aérea; CR: Comprimento de raiz; MSPA: Massa seca de parte aérea; MSR: Massa seca de raiz.

T. virens (TF1): *Trichoderma* isolado de solo rizosférico de feijoeiro; *T. harzianum*: *Trichoderma* proveniente do produto comercial Ecotrich.

Em comparação com o controle da doença, observou-se que o isolado *T. harzianum* teve uma menor ação no crescimento das plantas, possivelmente por esse isolado estar agindo com maior intensidade na indução de resistência da planta e menor na promoção de crescimento.

No comprimento de parte aérea (CPA) não houve efeito significativo do tratamento com os isolados do antagonista. Na massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz

(MSR) observou-se que os tratamentos com os isolados e formas de *Trichoderma* spp. não diferiram estatisticamente da testemunha e em alguns casos causaram efeitos negativos sobre essas variáveis. Esse efeito pode ser resultante de metabólitos secundários semelhantes a auxina produzidos pelos micro-organismos, que possuem efeito positivo em baixas concentrações, porém, pode apresentar efeito inibitório em maiores concentrações (VINALE et al., 2014). No entanto, alguns isolados de *T. harzianum* apresentaram efeito negativo no crescimento de raízes, mas outros promoveram o crescimento da parte aérea de feijoeiro (CARVALHO, et al., 2011). Pesquisas apontam que efeitos mais significativos do fungo podem ser observados em plantas tratadas em condições estressantes (LUCON, 2009).

5 CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes em controlar o crescimento micelial de *M. phaseolina* tanto no pareamento de culturas como por metabólitos voláteis.

Ambos os isolados de *Trichoderma* spp. produziram quitinase e apenas *T. harzianum* produziu β -1,3-glucanase.

Isolados de *Trichoderma* spp. cultivados em meio líquido produziram oxidrilas e ácidos graxos descritos na literatura com potencial fungicida e de indução de respostas de defesa em plantas.

A aplicação de *Trichoderma* spp., na forma de organismo vivo ou de filtrado de cultura, via tratamento de sementes, foi capaz de controlar a doença podridão cinzenta do caule, causada por *M. phaseolina* em feijoeiro.

Trichoderma virens possui efeito positivo no crescimento das raízes de feijoeiro.

REFERÊNCIAS

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, maio/junho, 2015. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/23292/16484>>. Acesso em: 27 dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v31n3a2015-23292>.

Associação Brasileira de Sementes e Mudanças (ABRASEM). **Anuário Abrasem 2016**. Brasília/DF: ABRASEM, 2016. 124p. Disponível em: <http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2013/09/Anuario_ABRASEM_2016_SITE.pdf>. Acesso em: 3 out. 2017.

ALMEIDA, Á. MR et al. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 279-285, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582003000300009>. Acesso em: 10 jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582003000300009>.

AMORIM, L. Sobrevivência do inóculo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. v.1, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. Cap. 13, p.246-267.

BARBOSA, R. J. F.; MEZA, C. L. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* em maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa) del municipio zona Bananera Colombiana. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, vol. 62, n°1, Medellín, jan./jun., 2009. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100001>. Acesso em: 5 abr. 2018.

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/transferecia/informacoestecnicas/publicacoesonline/seriedocumentos_272.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2018.

BEVILAQUA, G. A. P. et al. **Indicações Técnicas para Produção de Sementes de Feijão para a Agricultura Familiar**. Embrapa Clima Temperado-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2013, 16 p.

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.

BOMFIM, M. P. et al. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.61-67, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052010000100011>. Acesso em: 14 jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052010000100011>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. 1 ed. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BROETTO, L. et al. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v.13, n.4, p.310-317, 2014. Disponível em: <<http://saber.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/viewFile/7893/7957>>. Acesso em: 14 dez. 2018. DOI: 10.18188/1983-1471/sap.v13n4p310-317.

CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 48, n. 2, p. 154-155, 2006. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062p.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

CADORE, L. da S. et al. Avaliação do crescimento inicial da soja utilizando formulações de *Trichoderma*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer- Goiânia, v. 15, n.27, p.170, 2018. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2018a/agrar/avaliacao%20do%20crescimento%20inicial.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2018. DOI: 10.18677/EnciBio_2018A16.

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

CARDOSO, J. E. **Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo**. Goiânia: EMBRAPA- CNPAF, 1990. 30p.

CARDOSO, J. E. Podridão cinzenta do caule. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (EE.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.143-150.

CARVALHO, D. D. C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* “in vitro” e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n.1, p.28-34, 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/36873/1/tpp.pdf>>. Acesso em: 3 jan. 2019.

CARVALHO, J. J. et al. Manejo da irrigação no feijoeiro, cultivado em semeadura direta e convencional. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v.8, n.1, p.52-63, 2014. Disponível em: <http://www.inovagri.org.br/revista/index.php/rbai/article/view/198/pdf_159>. Acesso em: 13 dez. 2018. DOI: 10.7127/rbai.v8n100198.

CASA, R. T. et al. Podridão radicular em feijão no sistema plantio direto. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 10, n.1, p. 37-43, 2011. Disponível em: <<http://revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5268/3478>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

CHAGAS, L. F. B. et al. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 4, n. 3, p. 97-102, jul./set. 2017. Disponível

em: <<http://periodicosonline.uems.br/index.php/agrineo/article/view/1529/1563>>. Acesso em: 3 mai. 2018.

CHAIBUB, A.A. et al. Defence responses in rice plants in prior and simultaneous applications of *Cladosporium* sp. during leaf blast suppression. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, n.21, p.21554-21564, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-016-7379-5>>. Acesso em: 4 jan. 2019. DOI: 10.1007 / s11356-016-7379-5.

COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. 2.ed. Florianópolis: Epagri, 2012. 157p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Acompanhamento da safra Brasileira: grãos**. Oitavo levantamento, Brasília, v.4, n.8, 2017, p. 1-144.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Acompanhamento da safra Brasileira: grãos**. Primeiro levantamento, Brasília, v. 1, n.1, 2018a, p. 1-129.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Acompanhamento da safra Brasileira: grãos**. Terceiro Levantamento, Brasília, v. 6, n.3, 2018b, p. 1-127.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.149, n.3, p.1579-1592, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2649400/>>. Acesso em: 16 jan. 2019. DOI: 10.1104 / pp.108.130369.

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: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v44n1/0100-5405-sp-44-1-0032.pdf>>. Acesso em: 2 mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2185>.

DAS, M. M.; HARIDAS, M.; SABU A. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctoniasolani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 17, p. 177-183, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818118304742>>. Acesso em: 4 jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.021>.

DJONOVIC, S. et al. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing β -1, 3-and β -1, 6-glucanase genes. **Molecular Plant Pathology**, v.8, n.4, p.469-480, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1364-3703.2007.00407.x>>. Acesso em: 25 jan. 2019. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00407.x>.

DOMINGUES L. S. et. al. Metodologias de análise de adaptabilidade e de estabilidade para a identificação de linhagens de feijão promissoras para o cultivo no Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n.3, p. 1065-1076, maio/jun. 2013. Disponível em:

<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/983235/1/IrajaestabilidadeLucasSemina.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2018. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n3p1065.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados conjunturais da produção de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* L.) no Brasil (1985 a 2011): área, produção e rendimento**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2017. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 12 out. 2017.

ESTEFANI, R. C. C.; MIRANDA FILHO, R. J.; UESUGI, C. H. Tratamento térmico e químico de sementes de feijoeiro: eficiência na erradicação de *Curtobacterium flaccumfaciens* sp. *flaccumfaciense* efeitos na qualidade fisiológica das sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.5, Brasília, Set./Out, p. 434- 438, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582007000500011&%20lng=%20pt&nrm=iso>. Acesso em: 22 fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000500011>.

ETHUR, L. Z. et al. *Trichoderma asperellum* na produção de mudas contra a fusariose do pepineiro. **Scientia Agraria Paranaensis**. v.11, n.4, p.73-84, 2012. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/5347/5757>>. Acesso em: 7 dez. 2018.

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: 4 mar. 2018.

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.

FURLANI, A. C. F. A. et al. Atividade de células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. Como bioagentes de controle de *Colletotrichum acutatum*. **Científica**, Jaboticabal, v. 35, n.2, p. 196-200, 2007. Disponível em: <<http://cientifica.org.br/index.php/cientifica/article/viewFile/199/120>>. Acesso em: 4 jul. 2017.

GUIMARÃES, G. R. et al. Caracterização morfológica de isolados de *Trichoderma harzianum*. **Cultura Agronômica**, Ilha Solteira, v.25, n.2, p.131-136, 2016. Disponível: <<http://ojs.unesp.br/index.php/rculturaagronomica/article/view/2328/1761>>. Acesso: 9 jan. 2019.

GUZMÁN-GUZMÁN, P. et al. *Trichoderma* Species: Versatile Plant Symbionts. **Phytopathology**, v.109, n.1, p.6-16, 2019. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW?fbclid=IwAR3GOQ0AatY3jy2Q1tq3RBPV2P9Bu7ukSjvK9KnOqb8pXtQhvZGo8rJDciQ>>. Acesso em: 10 jan. 2019. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>.

HADDAD, P. E. et al. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.12, p.1140-1148, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100->

204X2017001201140&script=sci_arttext>. Acesso em: 24 jan. 2019.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017001200002>.

HAIJEGHRARI, B. Effects of some Iranian *Trichoderma* isolates on maize seed germination and seedling vigor. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.9, n.28, p.4342-4347, 2010. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/82658/72815>>. Acesso em: 2 jan. 2019.

ISAIAS, C.O. et al. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.1, p.34-41, 2014. Disponível em:
 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052014000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 13 dez. 2018.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052014000100005>.

ISHIKAWA, M. S. et al. Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*). **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, Botucatu, Jan./Mar., 2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v44n1/0100-5405-sp-44-1-0038.pdf>>. Acesso em: 2 jan. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/178653>.

JUNGES, E. **Indução de resistência à antracnose em feijoeiro por *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis***. 2016. 63 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Produção Vegetal). Universidade Federal de Santa Maria, Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Santa Maria, 2016.

KHALEDI, N.; TAHERI, P. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 56, n. 1, p. 21-31. 2016. Disponível em:
 <https://www.researchgate.net/publication/298904550_Biocontrol_mechanisms_of_Trichoderma_harzianum_against_soybean_charcoal_rot_caused_by_Macrophomina_phaseolina>. Acesso em: 4 jan. 2019. DOI: 10.1515 / jppr-2016-0004.

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.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840767>>. Acesso em: 3 jan. 2019. DOI: 10.1016 / j.chembiol.2012.06.004.

LEMONS, L. B.; MINGOTTE, F. L. C.; FARINELLI, R. Cultivares. In: ARF, O. et al. (EE.). **Aspectos gerais da cultura do feijão**. Botucatu: FEPAF, 2015. p.181-207.

LIMA, F. B. et al. *Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*. **Biological Control**, v.106, p.99-109, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964417300038>>. Acesso em: 18 jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.003>.

- LOBO JUNIOR, M; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.521-526, abr./jun., 2000.
- LOBO JUNIOR, M.; BRANDÃO, L. T. D.; MARTINS, B. E. de M. Testes para avaliação da qualidade de sementes de feijão comum. **Embrapa Arroz e Feijão-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2013.
- LOBO JUNIOR, M. Controle Biológico de Patógenos de Solo. In: HALFELD-VIEIRA, B. et al. (EE). **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 1 ed. 2016. p.81-100.
- LOUZADA, A. de S. et al. Relações entre testes com metabólitos e seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.14, n.1, p.9-14, jan./mar., 2016. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3191>>. Acesso em: 4 jan. 2019.
- LUCON, C.M.M. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. **Infobibos, Informações Tecnológicas**.2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm>. Acesso em: 28/12/2018.
- MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2012000100026>. Acesso em: 7 abr. 2018.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962. Disponível em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/2/2/CS0020020176>>. Acesso em: 5 mar. 2018.<http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>.
- 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.
- MARCO, J. L. de; FELIX, C. R. Purification and characterization of a beta-Glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 21-29, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132007000100003&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 10 jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132007000100003>.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A. Controle biológico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife-PE, 2005. p. 303-322.
- MARINO, R. H. et al. Incidência de fungos em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. provenientes do estado de Sergipe. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.3, n.1,

p.26-30, jan/mar, 2008. Disponível em:

<<https://www.redalyc.org/html/1190/119017261005/>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. de. Organic compound solubility. **Química Nova**, v.36, n.8, p.1248-1255, 2013. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000800026>. Acesso em: 15 jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000800026>.

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. 195-218, 1923. Disponível em: <<https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43967086/PDF>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

MEDEIROS, F. H. V.; MONTEIRO, F. P. Perspectivas do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: KUHN, O. J. et al. (Orgs.). **Ciências Agrárias: Tecnologias e Perspectivas**. Marechal Cândido Rondon: Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2015. p.182-187. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/profile/Andre_Battistus2/publication/301676190_Uso_de_bacterias_diazotroficas_no_Oeste_do_Parana_eficiencia_agronomica_de_bacterias_promotoras_de_crescimento_de_plantas_dos_generos_Azospirillum_e_Herbaspirillum_em_gramineas/links/57210ace08aea92aff8b2394/Use-de-bacterias-diazotroficas-no-Oeste-do-Parana-eficiencia-agronomica-de-bacterias-promotoras-de-crescimento-de-plantas-dos-generos-Azospirillum-e-Herbaspirillum-em-gramineas.pdf#page=190>. Acesso em: 12 jan. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.12702/978-85-68205-03-7.9>.

MELLO, S. C. M.; REIS, A.; SILVA, J. B. T. **Manual de Curadores de Germoplasma-Micro-organismos: Fungos Filamentosos**. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011, 25 p.

MILAN, M. D. et al. Light regimes used for producing *Trichoderma harzianum* conidia to control white mold in common bean plants. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 4, p. 434-439, 2015. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632015000400434>. Acesso em: 4 dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v4537755>.

MILANESI, P. M. et al. Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 347-356, 2013a. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2013000300010>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MILANESI, P. M. et al. Detecção de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e antagonismo de *Trichoderma* sp. em soja sob plantio direto. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.6, p.3219-3234, 2013b. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/html/4457/445744137009/>>. Acesso em: 14 jan. 2019. DOI 10.5433/1679-0359.2013v34n6Sup1p3219.

MIRANDA, B. A. de; LOBO JÚNIOR, M.; CUNHA, M. G. Reação de cultivares do feijoeiro comum às podridões radiculares causadas por *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp. phaseoli. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.4, p. 221-226, 2007. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/pat/article/view/3080/3124>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

MONDO, V. H. V.; NASCENTE, A. S.; NETO, M. O. C. Common bean seed vigor affecting crop grain yield. **Journal of Seed Science**, vol.38, n.4, Londrina Oct./Dec., 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372016000400365>. Acesso em: 14 dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v38n4166814>.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W.; PAULA JÚNIOR, T. J. Controle biológico de doenças de plantas. In: ZAMBOLIM, L. JESUS JÚNIOR, W. C.; RODRIGUES, F. Á. (EE). **O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, DFP, 2014, cap. 7, p.175-234.

MUNSELL SOIL COLOR CHARTS. Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporation, 2009.

NASCIMENTO, S. R. C. et al. Sobrevivência de estrutura de resistência de *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em solo tratado biologicamente. **Revista Agro@mbiente Online**, v. 10, n. 1, p. 50-56, 2016. Disponível em: <<https://revista.ufr.br/agroambiente/article/view/2947>>. Acesso em: 17 jan. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v10i1.2947>.

NETO, A. A. de O. (Org.). **Evolução dos custos de produção de feijão no Brasil e sua rentabilidade safra 2010/2011 a 2015/16**. Brasília: Compêndio de Estudos Conab/Companhia Nacional de Abastecimento, v.5, 2017, 22 p.

OLIVEIRA, A. G. et al. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró-RN, v. 7, n. 3, p. 149-155, jul-set, 2012. Disponível: <<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/1338/1283>>. Acesso em: 20 dez 2018.

PANDIAN, R. T. P.; RAJA, M.; SHARMA, P. Characterization of Three Different Chitinase Genes from *Trichoderma asperellum* Strain Ta13. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, India, v.88, n.4, p.1661–1668, 2018. Disponível: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40011-017-0910-8>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

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: 15 abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012001100005>.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L. de; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 3, n. 4, p. 69-72, jul. 2004. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85630404>>. Acesso em: 14 set. 2018.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, v.115, n.11, p.1138-1150, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614611001425?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.07.008>.

PFEFFERLE, C. et al. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 135-142, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165600002492?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 jan. 2019. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00249-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00249-2).

POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: A review. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. 1 ed. Formatex: 2011. p. 61-71.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. da S. Controle Biológico com *Trichoderma* em Grandes Culturas- Uma visão Empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (EE.) **Biocontrole de Doenças de Plantas: Usos e Perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 239-244.

POTASH & PHOSPHATE INSTITUTE (PPI). **Manual internacional de fertilidade do solo**. Tradução e adaptação de Alfredo Scheid Lopes. 2 ed., rev. e ampl. Piracicaba: POTAFOS, 1998. 177 p. Título original: International Soil Fertility Manual.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, 28, p. 123-130, mar./abr. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/fb/v28n2/a01v28n2.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. dos S.; SAND, S. T. V. D. Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.20, n.1/2, p.97-107, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/281006622_Caracterizacao_de_isolados_de_Trichoderma_e_seu_potencial_para_o_controle_biologicos_de_patogenos_do_feijoeiro_in_vitro>. Acesso em: 18 jan. 2019.

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.

ROMEIRO, R. da S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas- Fundamentos**. 1 ed. Viçosa: Ed. UFV., 2007, 269 p.

SAITO, L. R. et al. Aspects of the effects of the fungus *Trichoderma* spp. in biocontrol of pathogens of agricultural crops. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 2, n. 3, p. 203-216, 2011. Disponível em: <<https://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/view/1515>>. Acesso em: 4 dez. 2018. <https://doi.org/10.5777/paet.v2i3.1515>.

SALES JR., R. et al. Controle Químico de Doenças Radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (EE.). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife-PE, 2005. p. 345-366.

- SÁNCHEZ, S. et al. Genetic and biological characterization of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causing crown and root rot of strawberry. **Chilean journal of agricultural research**, v.77, n.4, Chillán, 2017. Disponível em: <<https://scielo.conicyt.cl/pdf/chiljar/v77n4/0718-5839-chiljar-77-04-00325.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2018. DOI:10.4067/S0718-58392017000400325.
- SÁNCHEZ LÓPEZ, V. et al. Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. **Revista Mexicana de Micología**, v. 36, p. 17-26, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v36/v36a4.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2019.
- SARROCCO, S. et al. The constitutive endopolygalacturonase TvPG2 regulates the induction of plant systemic resistance by *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v.107, n.5, p.537-544, 2017. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-03-16-0139-R>>. Acesso em: 17 jan. 2019. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-16-0139-R>.
- SCHOONHOVEN, A. V.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. Cali: CIAT, 1987. 54 p.
- SILVA, K. S. et al. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, out./dez. 2008. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/274655770_Atividade_antagonica_in_vitro_de_isolados_de_Trichoderma_spp_ao_fungo_Phytophthora_citrophthora>. Acesso em: 15 fev. 2018. DOI: 10.5433/1679-0359.2008v29n4p749.
- SILVA, R. N. O. da et al. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia bataticola* (taub.) (*Macrophomina phaseolina* (tassi) goid) em sementes de feijão. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.11, n. 4, p. 07-11, 2016. Disponível em: <<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/4252>>. Acesso em: 20 jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.18378/rvads.v11i4.4252>.
- SILVA, F. F. da et al. Emergence and ultrastructural analysis of soybean seedlings inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* under the effect of *Trichoderma harzianum* application. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 1, p. 41-45, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052017000100041&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2212>.
- SILVA, M. G. Implantação da cultura. In: ARF, O. et al. (EE.). **Aspectos gerais da cultura do feijão**. Botucatu: FEPAF, p. 163-180. 2015.
- SILVA, O. F. da; WANDER, A. E. O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro. (Embrapa Arroz e Feijão. **Documentos**, 287). Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 63 p.
- SOARES, P. L. M. et al. Controle Biológico de Fitonematoides com Fungos Nematófagos. In: HALFELD-VIEIRA, B. et al. (EE). **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 1 ed. 2016. p.177-213.

SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C. Effectiveness of *Fusarium* spp. in controlling bacterial wilt in beans. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 79-82, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052018000100079>. Acesso em: 20 dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/168402>.

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://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052017000300199>. Acesso em: 2 dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2202>.

SOUSA, C. da S. et al. Actinobactérias no controle do mal das folhas em mudas de seringueira. **Cadernos de Agroecologia**, v.13, n.1, jul., 2018.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v.16, n.4, p.345-351, 2014. Disponível em: <<http://www.pgsskroton.com.br/seer/index.php/JHealthSci/article/view/393/370>>. Acesso em: 3 jan. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.17921/2447-8938.2014v16n4p%25p>.

TARSITANO, M. A. A.; SANT'ANA, A. L.; TARSITANO, R. A. Aspectos sociais e econômicos da produção de feijão. In: ARF, O. et al. (EE.). **Aspectos gerais da cultura do feijão**. Botucatu: FEPAF, 2015, p. 15-28.

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 fev. 2018.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.72, p.80-86, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576508000568>>. Acesso em: 17 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>.

VINALE, F. et al. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/264264987_Trichoderma_Secondary_Metabolites_Active_on_Plants_and_Fungal_Pathogens>. Acesso em: 17 dez. 2018. DOI: 10.2174 / 1874437001408010127.

ZANCAN, W. L. A. et al. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience journal**, Uberlândia, v.28, n.5, p.782-789, Set./Out. 2012. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/13909/10559>>. Acesso em: 29 dez. 2018.