



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

**CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL**

**CURSO DE AGRONOMIA COM ÊNFASE EM AGROECOLOGIA**

**MAEVI FORNAZARI**

**OBTENÇÃO DE ISOLADOS NATIVOS DE *Trichoderma* DE LARANJEIRAS DO  
SUL - PR E AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO INIBITÓRIO SOBRE *Sclerotinia  
sclerotiorum***

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2023**

**MAEVI FORNAZARI**

**OBTENÇÃO DE ISOLADOS NATIVOS DE *Trichoderma* DE LARANJEIRAS DO  
SUL - PR E AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO INIBITÓRIO SOBRE *Sclerotinia*  
*sclerotiorum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Agronomia linha de formação em  
Agroecologia da Universidade Federal da  
Fronteira Sul (UFFS) - *Campus* Laranjeiras do  
Sul, como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2023**

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Fornazari, Maevi

OBTENÇÃO DE ISOLADOS NATIVOS DE Trichoderma DE LARANJEIRAS DO SUL - PR E AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO INIBITÓRIO SOBRE Sclerotinia sclerotiorum / Maevi Fornazari. -- 2023.

30 f.:il.

Orientador: Professor Dr. Gilmar

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2023.

1. Controle Biológico. 2. Controle de doenças em plantas. 3. Efeito antagonista de Trichoderma spp.. 4. Controle de Sclerotinia sclerotiorum. 5. Método de produção sustentável. I. Gilmar, , orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

**MAEVI FORNAZARI**

**OBTENÇÃO DE ISOLADOS NATIVOS DE *Trichoderma* DE LARANJEIRAS DO  
SUL - PR E AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO INIBITÓRIO SOBRE *Sclerotinia*  
*sclerotiorum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Agronomia linha de formação em  
Agroecologia da Universidade Federal da  
Fronteira Sul (UFFS) - *Campus* Laranjeiras do  
Sul, como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Agronomia.

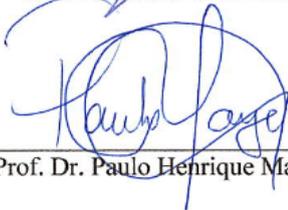
Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 05/12/2023.

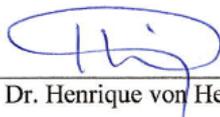
BANCA EXAMINADORA



Pro. Dr. Gilmar Franzener



Prof. Dr. Paulo Henrique Mayer



Prof. Dr. Henrique von Hertwig Bittencourt

Dedico à minha avó Olira Batista Garcia (*in memoriam*), minha maior inspiração, que em vida se dedicou incansavelmente à educação, sendo exemplo de mulher forte e batalhadora. Olira, símbolo de amorosidade, apoiou ao máximo minha formação, me incentivando a não desistir frente aos obstáculos. À ela, todo meu amor e gratidão.

“Ninguém nasce feito, é experimentando-nos no mundo que nós nos fazemos”.

(Paulo Freire)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que me permitiu seguir firme na caminhada e ultrapassar todos os obstáculos que surgiram ao longo da trajetória acadêmica.

Aos meus pais Marcelo Fornazari e Neri Terezinha Garcia Fornazari que sempre me deram forças e incentivo e, mesmo com a distância física, se fizeram presentes com seu amor incondicional.

Às minhas irmãs Roberta e Amanda Fornazari pelo apoio constante e absoluto.

Aos meus avós Olira Batista Garcia (*in memoriam*), Admar Fornazari e Francisca D. R. Fornazari, por não medirem esforços, prestando toda assistência e me ajudando das mais diversas formas para que me fosse possível chegar até aqui.

Às minhas tias Cleuzi, Glaci, Elda, Edelci, Erlene e Arlete Garcia, e aos meus padrinhos Luis Carlos Ferreira e Luiz Antônio Garcia por fazerem o possível para que meu processo de formação se concluísse.

Aos amigos incríveis que cruzaram meu caminho, em especial ao Charles Carvalho do Bomfim, Marcos Paulo Bertolini, Telmar Moraes, Ágatha Trindade, Gislaine Ribeiro Gomes, Matheus dos Santos Machado, Marcos Machado, Kauane Amaral Pare, Luana Antonowicz Souza, Alan Douglas Telles, Jeferson Vieira, Junior Vieira, Carla Santos, Anne Bien-aime, Patricia Krupa, Luis Fernando Petters, João Pedro Olkoski, Bruna Luiza, Pedro H. Giroto, Leonardo Antonowicz, Michael Ribeiro, Mateus Batista, Osmarino Miranda, Tiago Gabriel, Anny Caroline Ritter, Aquilis Novaes, Thais Pigatto, Mabel Araújo, Suelin Daiana, Maria Eduarda Rodrigues, Bruna Cordeiro, Jaine Amaral Pare, Nilton Kurupyra, Leila Laís, Indiamara Colla, e a todos os outros que fizeram parte da minha trajetória, agradeço por todo companheirismo, pelas conversas, risadas e por me ajudarem a resistir aos momentos de tribulação.

Ao meu orientador Gilmar Franzener, por todos os ensinamentos, e acima de tudo pelo auxílio e paciência durante a produção deste trabalho.

À Universidade Federal da Fronteira Sul e a todos os professores e servidores pelo empenho e dedicação exclusiva, oferecendo, desta forma, um ensino superior de excelência.

Meus sinceros agradecimentos a todos!!!

## RESUMO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é agente causal do mofo branco, uma doença de grande importância em muitas espécies de plantas cultivadas. É um patógeno de difícil controle, e que forma estruturas de resistência (escleródios), capazes de permanecer na área por muitos anos. Buscando métodos mais sustentáveis de controle dessa doença, destaca-se o controle biológico, como, por exemplo, com o fungo antagonista *Trichoderma*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a presença e o efeito inibitório de isolados de *Trichoderma* nativos da região de Laranjeiras do Sul/PR, sobre *Sclerotinia Sclerotiorum*. Foram realizados diferentes bioensaios para avaliação do efeito dos isolados sobre *S. sclerotiorum in vitro* e também no efeito protetor *in vivo* em plantas de alface. Foi realizada a identificação de três isolados *Trichoderma* que promoveram significativa inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, bem como na formação de escleródios *in vitro*. Os isolados também promoveram redução na severidade do mofo branco em plantas de alface. Os resultados obtidos demonstram a ocorrência natural de isolados de *Trichoderma* em Laranjeiras do Sul com expressivo efeito no controle de *S. sclerotiorum*.

**Palavras chave:** Mofo branco; escleródios; controle biológico; microbiota.

## ABSTRACT

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is the causal agent of white mold, a disease of great importance in many species of cultivated plants. It is a pathogen that is difficult to control and forms resistance structures (sclerotia), capable of remaining in the area for many years. Seeking more sustainable methods of controlling this disease, biological control stands out, such as, for example, with the antagonistic fungus *Trichoderma*. The present work aimed to evaluate the presence and inhibitory effect of *Trichoderma* isolates native to the region of Laranjeiras do Sul/PR, on *Sclerotinia Sclerotiorum*. Different bioassays were carried out to evaluate the effect of the isolates on *S. sclerotiorum* *in vitro* and also the protective effect *in vivo* on lettuce plants. Three *Trichoderma* isolates were identified that promoted significant inhibition of the mycelial growth of *S. sclerotiorum*, as well as the formation of sclerotia *in vitro*. The isolates also promoted a reduction in the severity of white mold on lettuce plants. The results obtained demonstrate the natural occurrence of *Trichoderma* isolates in Laranjeiras do Sul with significant effect on the control of *S. sclerotiorum*.

**Keywords:** White Mold; sclerotia; biological control; microbiota.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>
<b>6. APÊNDICE.....</b>	<b>30</b>
<b>APÊNDICE A - Crescimento micelial <i>Trichoderma</i> sp. sobre o arroz durante processo de captura em área de mata nativa.....</b>	<b>30</b>
<b>APÊNDICE B - Crescimento dos isolados TH1, TH2 e TH3 de <i>Trichoderma</i> sp. em meio de cultura BDA.....</b>	<b>30</b>
<b>APÊNDICE C - Atividade de isolado de <i>Trichoderma</i> sp. (coloração esverdeada) inibindo e sobrepondo a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em teste de pareamento em meio de cultura BDA.....</b>	<b>30</b>
<b>APÊNDICE D - Desenvolvimento dos fungos conforme escala de Bell et al. (1982).....</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. é um dos mais importantes agentes que afetam plantas cultivadas, causando a doença conhecida como mofo branco (RODRIGUES et al. (2006). Segundo os autores Agrios (2005) e Krause-Sakate et al. (2016) este agente patogênico é bastante agressivo e age infectando várias partes da planta hospedeira incluindo folhas, flores, caule e frutos. Temperaturas amenas que variam entre 10° e 20°C associadas a alta umidade são ideais para o desenvolvimento do fungo e aceleram o progresso da doença.

Um dos fatores que dificulta o controle do mofo-branco é o fato do fungo *S. sclerotiorum*, na sua fase assexuada, formar estruturas de resistência que podem permanecer no solo por até 10 anos. Estas estruturas são chamadas de escleródios e são constituídas por um aglomerado de hifas. Os escleródios são caracterizados por apresentarem forma arredondada, alongada, e por vezes, irregular que podem ser vistas a olho nu, pois seu tamanho varia de 20 a 30 mm. A coloração é preta devido à presença de melanina, substância responsável por garantir a proteção do fungo contra quaisquer condições ambientais adversas capazes de afetar seu desenvolvimento (KRAUSE-SAKATE et al., 2016).

Os sintomas do mofo-branco incluem a formação de micélio branco espesso sobre as partes atingidas da planta, normalmente de 10 a 15 cm acima do solo. O tecido da planta é necrosado, e então ocorre o apodrecimento e morte da planta. Quando frutos, tubérculos e raízes tuberosas são atacadas também há o apodrecimento, seguido do crescimento de um mofo branco sobre eles, associado à formação de escleródios. A doença pode ser transmitida para todas as plantas existentes na área, e o fungo pode permanecer no solo por muito tempo (REIS et al., 2007).

Dentre as diferentes espécies que podem ser afetadas pelo mofo-branco está a alface (*Lactuca sativa* L.), planta da família Asteraceae, de origem asiática, é considerada a hortaliça folhosa de maior comércio no Brasil, se destacando por apresentar em sua composição alta quantidade de vitaminas, especialmente vitamina A, bem como, de sais minerais (FERNANDES et al., 2002). A hortaliça é ainda bastante conhecida por sua alta suscetibilidade às doenças, sejam elas causadas por bactérias, fungos, nematóides ou vírus (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2010).

O controle do mofo-branco é difícil. Embora largamente utilizado, o controle químico pode ter eficiência limitada no controle do mofo-branco, além de possíveis efeitos negativos ao ambiente e à saúde humana. Neste contexto, destaca-se a busca por métodos que visem o controle efetivo das doenças em plantas, e que ao mesmo tempo, estejam em harmonia com a natureza, e priorizem a qualidade dos alimentos, assim como, a saúde do consumidor e produtor. Um dos métodos de controle que vêm se destacando no manejo fitossanitário é o controle biológico, pelo uso de microrganismos que realizam o controle de outros organismos que afetam negativamente as plantas.

Um dos microrganismos mais conhecidos e utilizados no controle biológico de doenças em plantas cultivadas é o *Trichoderma*, gênero de fungos caracterizados por apresentarem vida livre e que se reproduzem assexuadamente. *Trichoderma* é um fungo de solo, mas também pode ser encontrado em madeira na sua forma sexual (gênero *Hypocrea*). De acordo com Harman et al. (2004), o ciclo sexual de muitas linhagens de *Trichoderma* ainda não é conhecido. Esse fungo geralmente tem abundante esporulação, com formação de conídios em células conidiogênicas (KRUGER e BACCHI, 1995).

Espécies de *Trichoderma* tendem a apresentar facilidade de cultivo e rápido crescimento nos mais variados tipos de substratos. Além disso, o fungo pode ser encontrado em ambientes distintos e não apresenta patogenicidade para plantas superiores (PAPAVIZAS, LEWIS e ABD-ELMOITY, 1982). Em relação aos mecanismos de ação do antagonista, estudos comprovam que existem vários, e de acordo com Harman (2000), provavelmente muitos outros ainda não conhecidos. Um dos mecanismos do *Trichoderma* é o hiperparasitismo, explicado por Melo (1996), como a relação onde o organismo hiperparasita tem a capacidade de identificar e localizar hifas vulneráveis que se desenvolvem, e vão em sua direção, respondendo a estímulos químicos. Desta forma, o hiperparasita forma estruturas parecidas com apressórios que após enrolarem-se fortemente na hifa, a digerem. Para Harman (2000), este fenômeno é chamado de micoparasitismo, e representa uma forma de biocontrole de extrema importância.

Outro mecanismo de controle que o fungo possui é a competição, relatada por Melo (1996), como sendo a interação entre dois ou mais organismos que têm o mesmo objetivo, ou seja, ambos competem pelos fatores essenciais à sobrevivência, como água, nutrientes, oxigênio, espaço, entre outros. Há ainda a antibiose, definida por Stadnik e Bettiol (2000) como a interação onde um organismo produz metabólitos secundários que prejudicam o outro. Constatou-se que muitas espécies de *Trichoderma* já conhecidas produzem metabólitos tóxicos capazes de impedir o desenvolvimento e a sobrevivência de fungos fitopatogênicos.

Dentre essas substâncias existem antibióticos e enzimas líticas, algumas voláteis e outras não. Além disso, o fungo *Trichoderma* é capaz de inativar enzimas de patógenos (HARMAN, 2000).

O uso do *Trichoderma* na agricultura é conhecido devido à sua atuação como agente de controle de fitopatógenos e também como promotor de crescimento em plantas. O antagonista vem sendo tema de muitas pesquisas, entretanto, mesmo com a ampla gama de estudos realizados por cientistas do mundo todo, ainda são reduzidos os usos com biocontrole na agricultura comercial (HARMAN, 2000). De acordo com Bernardo et al. (2019), esse fungo é comercializado pelas empresas como biopesticida, promotor de crescimento, biofertilizante e até como indutor de resistência, no entanto, pode ser encontrado naturalmente em solos de mata e lavouras, visto que, além de possuir estruturas que garantem sua resistência às adversidades ambientais, ele também coloniza rapidamente os mais variados tipos de substrato, bem como, apresenta reduzida exigência nutricional.

De acordo com Júnior et al. (2018), os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados devem ser nativos das regiões onde serão utilizados, desta forma garantindo maior eficiência. Neste sentido, Fipke et al. (2015) reforça a importância da eficácia, e que, aliado a isso, o microrganismo esteja adaptado às mesmas condições ambientais do patógeno. Além disso, o antagonista escolhido deve demonstrar alta capacidade no confronto com o fitopatógeno, e ao mesmo tempo, não causar prejuízos na agricultura.

O Brasil apresenta potencial para se tornar um grande produtor de produtos à base de *Trichoderma*, entretanto, algumas limitações relacionadas às dificuldades de registro dos produtos junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA impedem o desenvolvimento do mercado (AGROFIT, 2019).

O objetivo do presente trabalho foi obter o efeito inibitório de isolados nativos do fungo *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, em testes in vitro e também em plantas de alface.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado na Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, *Campus* Laranjeiras do Sul - PR, BR-158, s/n - Zona Rural, localizado a 25°26'43"S e 52°26'33"O, a uma altitude de 841m. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da UFFS e área de mata nativa da UFFS.

O patógeno *S. sclerotiorum* foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Fitopatologia da UFFS. O referido patógeno foi proveniente de material sintomático de plantas de alface, obtido no município de Laranjeiras do Sul/PR. O agente patogênico foi cultivado em placas de petri e meio BDA, em escuro a 25 oC.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos de área de mata nativa localizada na UFFS através do método de captura de microrganismos eficientes (EM), conforme Caderno dos Microrganismos Eficientes (EM) - 2ª edição, organizado por Bonfim et al. (2011). Para tanto, utilizou-se 700g de arroz branco cozido sem adição de sal e óleo, que foi distribuído em bandejas de plástico. Cada bandeja foi coberta com um fragmento de gaze, para evitar o contato direto do arroz com o solo.

As bandejas foram distribuídas em área de mata nativa da UFFS, localizada dentro do *campus*, próxima ao Restaurante Universitário, em quatro pontos distintos, através da metodologia de caminhar aleatório. Todas as bandejas foram enterradas com auxílio de uma pá de bico, utilizada para cavar e retirar a serrapilheira existente no local, material este, que posteriormente foi utilizado para cobrir as bandejas. As mesmas foram retiradas da mata após 15 dias da implantação. Após esse período verificou-se a presença do *Trichoderma* spp. em todas as bandejas, visto que, o fungo é caracterizado por apresentar esporos de coloração verde, o que torna possível sua visualização a olho nu.

Em seguida os microrganismos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), devidamente autoclavado e homogeneizado. Estas foram dispostas em estufa BOD (Biological Oxygen Demand), onde permaneceram incubadas por seis dias, em escuro e temperatura controlada de 26 °C, até a primeira repicagem. Após o período de incubação foi possível selecionar três isolados de *Trichoderma* com base nas características de crescimento e coloração da colônia. Os isolados foram nomeados como TH1, TH2, TH3. Para auxiliar na identificação foram preparadas lâminas semi-permanentes e observação de características morfológicas em microscópio óptico.

A confirmação da identificação dos isolados e indicação de espécies foi realizada pela empresa Neopropecta através da extração e sequenciamento de DNA, e análise de bioinformática das sequências de 16S e ITS (ITS1-5.8S-ITS2) obtidas com o sequenciador Minion (*reads*) e tratadas por um *pipeline* composto pelas seguintes etapas: *basecalling*, seleção de *reads* de tamanhos específicos, demultiplexação, remoção de primers, clusterização, classificação taxonômica.

Foram conduzidos diferentes experimentos para avaliar o efeito dos isolados sobre o fungo *S. sclerotiorum*. Constituíram tratamentos os isolados de *Trichoderma* e uma

testemunha sem *Trichoderma*. Todos experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições.

Para melhor caracterização dos isolados foi inicialmente conduzido experimento para avaliar a taxa de crescimento micelial das colônias. Para tanto, placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA receberam no centro um disco de micélio de 7 mm de diâmetro e foram incubadas a 26°C, em escuro. Após 24h e 48h foram realizadas medições do diâmetro médio das colônias, através de duas medidas perpendiculares. O cálculo da taxa de crescimento dos fungos foi realizada aplicando a fórmula adaptada por Lilly e Barnett (1951):

$$\text{Taxa de crescimento} = (C2 - C1)/(T2 - T1) \quad \text{[Equação 1]}$$

Onde C1 é crescimento no tempo T1 (24 h), C2 é o crescimento no tempo T2 (48 h):

Para avaliar o efeito direto dos isolados de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* foi conduzido experimento de pareamento direto. Discos de cultura com sete dias do patógeno e do isolado de *Trichoderma* foram dispostos a 0,5 cm de distância da borda da placa de Petri em extremidades opostas (ETHUR, 2006). O tratamento testemunha continha apenas o fungo *S. sclerotiorum*. A avaliação foi realizada com uma medição após 48 horas do raio da colônia de *S. sclerotiorum*, e após 14 dias foi avaliado o desenvolvimento dos fungos através de escala de Bell et al. (1982), onde as notas podem variar de 1 a 5: **(Tabela 1)**

NOTA	AVALIAÇÃO VISUAL
1	<i>Trichoderma</i> spp. cresce por toda a placa
2	<i>Trichoderma</i> spp. cresce e ocupa 2/3 da placa
3	<i>Trichoderma</i> spp. e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crescem até o meio da placa
4	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> cresce e ocupa 2/3 da placa
5	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ocupa toda a placa

Também foi determinada a produção de escleródios (estruturas de resistência do patógeno) pela contagem do número em cada placa. A contagem de escleródios foi realizada aos 14 e aos 23 dias após a implantação do experimento.

Em outro experimento foi analisado o efeito de exsudatos de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (ISAIAS et al., 2014). Para tanto, os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em frascos erlenmeyer contendo 250 mL de meio BD (Batata-dextrose), mantidos sob agitação. Após sete dias de cultivo, o meio foi filtrado em papel de filtro quantitativo e em membrana 0,45 µm de diâmetro de poro, para remoção de todos fragmentos do micélio do fungo. Em seguida foi aferido o pH e adicionado 4% de ágar bacteriológico, seguida de autoclavagem a 120°C por 20 min. O meio foi vertido em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e no centro de cada placa foi adicionado um disco de 7 mm de micélio de *S. sclerotiorum*, seguida de incubação em BOD para posterior avaliação do diâmetro médio das colônias.

O teste visando analisar os efeitos dos compostos voláteis de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* foi realizado com base no método de Bharat et al. (1980), no qual o meio de cultura BDA foi adicionado tanto na tampa quanto na base de cada uma das placas de Petri. Um disco de micélio (7 mm) de *S. sclerotiorum* foi colocado sobre o meio no centro da tampa da placa e um disco de micélio de *Trichoderma* sobre a base da placa, e em seguida vedando as duas ao final transferindo-as para a incubadora a 26 °C, em escuro. A avaliação realizou-se 24h e 48h após a incubação. Com auxílio de uma régua milimetrada realizou-se a medição do diâmetro da colônia fúngica formada na placa. Esta avaliação teve o objetivo de analisar se apenas o efeito volátil do antagonista sobre patógeno seria suficiente para realizar o controle, considerando que ambos os fungos não estavam em contato direto. Ao final do experimento também foi realizada a contagem dos escleródios formados por *S. sclerotiorum*.

O experimento *in vivo* foi realizado em plantas de alface, cultivar Elisa. Inicialmente as mudas foram produzidas em bandejas de 200 células, contendo substrato comercial para mudas. Após 30 dias as mudas foram transplantadas para copos plásticos de 300 mL contendo substrato orgânico a base de substrato para mudas e húmus de minhoca 1:1 v/v. Após três dias foi realizada a inoculação através da incorporação de 0,5 g de inóculo (representado por grãos de arroz colonizados com *S. sclerotiorum*) em lados opostos a aproximadamente 1 cm do colo da planta. Após a inoculação do fungo, o solo foi umedecido visando proporcionar um ambiente favorável ao desenvolvimento do patógeno. Para aplicação dos tratamentos inicialmente preparou-se a suspensão de esporos através de raspagem da colônia micelial de cada um dos isolados de *Trichoderma* (TH1, TH2 e TH3)

com auxílio da alça de Drigalski, seguida de filtração em gaze. A concentração do inóculo foi ajustada em  $1 \times 10^6$  esporos por mL, com auxílios e câmara de Neubauer. Na testemunha foi aplicado somente água destilada. Em seguida foi realizada a aplicação dos tratamentos por aspersão. Em um grupo de plantas a aplicação foi realizada na parte aérea, mantendo o solo protegido, com auxílio de um borrifador. Já em outro grupo de plantas a aplicação foi realizada somente sobre o solo. A severidade da doença foi avaliada aos 7, 10 e 12 dias após a inoculação com o patógeno através de uma escala de notas entre 0 e 4, onde 0 representa ausência de sintomas e 4 representa a presença de sintomas severos.

Os resultados de severidade foram utilizados para calcular a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), calculada por meio da fórmula adaptada por Campbell & Madden (1990):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(x_i + x_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)] \quad \text{[Equação 2]}$$

Onde: n é o número de avaliações, x é a proporção da doença e  $(t_{i+1} - t_i)$  é o intervalo de tempo entre avaliações.

Os tratamentos e testemunha foram aplicados na parte aérea das plantas e no solo onde as mesmas foram cultivadas. A AACPD foi calculada a partir dos dados de severidade obtidos em três avaliações realizadas aos 7, 10 e 12 dias após a inoculação do patógeno.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2008). Inicialmente foi avaliado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo realizada a transformação dos dados para raiz  $x+0,5$  quando pertinente. Em seguida realizou-se a análise de variância (ANOVA), com teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **Isolamento e identificação de *Trichoderma***

A partir da metodologia utilizada para obtenção de *Trichoderma* de área de mata foi possível observar o crescimento e realizar o isolamento de três isolados distintos de *Trichoderma*, com base em características de crescimento e coloração. A partir da análise genética da região 16S e ITS dos isolados foi confirmada a identificação a nível de gênero,

mas não foi possível definir a espécie para os três isolados. Na Tabela 1 são mencionadas possíveis espécies respectivas a cada isolado. Isso se deve possivelmente às espécies dos isolados apresentarem características muito próximas nas regiões estudadas do genoma, sendo necessário ampliar o sequenciamento para permitir um resultado mais conclusivo a nível de espécie.

Tabela 1. Identificação de possíveis espécies de *Trichoderma* dos isolados obtidos com base em marcadores moleculares das regiões 16S e ITS (ITS1-5.8S-ITS2).

Isolado	Espécie
TH1	<i>T. koningiopsis</i> , <i>T. sulphureum</i> , <i>T. atroviride</i> , <i>T. dorotheopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. dorotheae</i> , <i>T. gamsii</i> , <i>T. ghanense</i> , <i>T. harzianum</i> ou <i>T. petersenii</i>
TH2	<i>T. harzianum</i> , <i>T. lentiforme</i> , <i>T. azevedoi</i> , <i>T. lixii</i> , <i>T. pollinicola</i> , <i>T. atrobrunneum</i> ou <i>T. austroindianum</i>
TH3	<i>T. sulphureum</i> , <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. atroviride</i> , <i>T. dorotheopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. dorotheae</i> , <i>T. gamsii</i> , <i>T. ghanense</i> , <i>T. harzianum</i> ou <i>T. petersenii</i>

### 3.1 ENSAIOS *IN VITRO*

#### **Taxa de crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum***

Os isolados de *Trichoderma* apresentaram crescimento micelial e taxa de crescimento significativamente maiores do que *S. sclerotiorum* em meio de cultura BDA (Tabela 2). O crescimento micelial dos isolados foi superior tanto no tempo de 24 como de 48 horas. Os diferentes isolados apresentaram crescimento e taxa de crescimento semelhantes entre si, embora no tempo de 24 horas tenha se destacado o isolado TH3, com crescimento superior a

TH2 (além de *S. sclerotiorum*). Na taxa de crescimento, embora não houve diferença entre os isolados, chegou a 52,9% superior a *S. sclerotiorum*, pelo isolado TH3.

Tabela 2. Crescimento micelial e taxa de crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA.

Tratamentos	Crescimento micelial (cm)		Taxa de crescimento (mm/h)
	24 horas	48 horas	
<i>S. sclerotiorum</i>	0,03 a	4,26 a	0,17 a
TH1	1,29 bc	7,07 b	0,24 b
TH2	1,07 b	6,36 b	0,22 b
TH3	1,54 c	7,87 b	0,26 b
CV%	4,47	6,02	2,12

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados comprovam o rápido e vigoroso crescimento dos isolados de *Trichoderma*, se destacando já nas primeiras horas de crescimento, fato que já é relatado em outros trabalhos que constataram a potencialidade do antagonista quando submetido a situações que exigem disputa por espaço e nutrientes, demonstrando que um dos mecanismos do fungo é a competição (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008).

Entretanto, deve-se considerar que os isolados de *Trichoderma* utilizados no experimento eram nativos da região de Laranjeiras do Sul/PR, obtidos a partir de um método de cultivo bastante conhecido e recomendado para captura do fungo, o que corrobora com a sugestão de Brito et al. (2010) que em seus estudos afirma, que isolados armazenados por longos períodos de tempo acabam perdendo a eficiência quando comparados com fungos obtidos de compostos orgânicos cultivados recentemente. Neste sentido, é importante realizar o procedimento adequado para captura do fungo, priorizando coletar espécies nativas da região onde seu uso será empregado, tendo em vista a máxima eficácia do antagonista no controle de fitopatógenos.

### **Avaliação do pareamento direto de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum***

Em relação ao pareamento direto foi possível observar que houve significativa inibição de *S. sclerotiorum* pelos isolados de *Trichoderma* (Tabela 3). Os resultados da análise mostraram que houve diferenças significativas entre os tratamentos para o crescimento micelial após 48 horas, bem como para a formação de escleródios após 14 dias e 23 dias (Tabela 3). Após 48 horas do pareamento, os isolados ainda não tinham promovido inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*, quando ainda não havia o contato entre as hifas dos fungos, embora o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* no pareamento com TH3 foi inferior ao crescimento frente TH1, demonstrando uma ação diferencial entre os isolados.

Em relação a nota de pareamento obtida através da escala de Bell et al. (1982), não houve diferença significativa entre TH1, TH2 e TH3, entretanto, houve significativa diferença entre a testemunha (sem *Trichoderma*) e os tratamentos com isolados de *Trichoderma*, mostrando que o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi significativamente inibido quando na presença dos isolados TH1, TH2 e TH3. Destaque para os isolados TH1 e TH3 que apresentaram nota média de 2,0. Os resultados atestam que as cepas de *Trichoderma* são capazes de inibir o crescimento de *S. sclerotiorum*. A formação de escleródios de *S. sclerotiorum* foi inibida quando na presença TH1, TH2 e TH3, não havendo diferenças significativas entre TH1, TH2 e TH3, demonstrando ação semelhante entre os isolados, tanto aos 14 como aos 23 dias de crescimento.

É importante ressaltar que o isolado TH2 apresentou inibição total na formação de escleródios após 14 e 23 dias. Os resultados indicam que o antagonista afeta a formação de escleródios de *S. sclerotiorum*. Como os escleródios são estruturas de resistência que podem sobreviver por vários anos no solo, são muito importantes como fonte de inóculo do patógeno e a ação de *Trichoderma* inibindo a formação dessas estruturas indica outro mecanismo importante dos isolados obtidos no controle desse patógeno .

Tabela 3. Pareamento direto de isolados de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA

Tratamentos	Crescimento	Nota pareamento	Escleródios	Escleródios
	48 horas		14 dias	23 dias
Testemunha	2,64 ab	5,0 b	35,0 b	40,2 b
TH1	3,00 b	2,0 a	2,4 a	2,6 a

TH2	2,14 ab	3,2 a	0,0 a	0,0 a
TH3	1,58 a	2,0 a	1,2 a	2,2 a
CV%	13,71	11,35	35,08	31,38

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com Cubilla-Rios et al. (2019) o *Trichoderma* é um fungo inibidor potente, que através de estratégias como por exemplo a antibiose, promove a liberação de moléculas com alto e baixo peso molecular, acionando assim seu mecanismo antifúngico e impedindo o desenvolvimento do patógeno.

O trabalho apresenta resultados positivos em relação ao pareamento direto, pois para Louzada et al. (2009) quando um isolado recebe nota menor ou igual a 3,0 é considerado eficiente em sua função como antagonista. Já Ethur (2006) reforça que para ele notas que variam de 2 a 2,5 são as que verdadeiramente representam fungos antagonistas com boa capacidade para controle de doenças.

Resultados expressivos também são observados em relação à formação de escleródios, que segundo Phillips (1989), são estruturas de resistência do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e podem permanecer no solo por muitos anos, causando enormes prejuízos. Desta forma, a importância de *Trichoderma* também está relacionada a redução do inóculo do patógeno.

#### **Avaliação de exsudatos de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum***

No experimento realizado com os exsudatos do crescimento de *Trichoderma* não houve solidificação completa do meio de cultura BDA após a adição do ágar, o que comprometeu as avaliações do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* não sendo possível a obtenção de resultados do efeito sobre o patógeno. Isso possivelmente se deve a acidificação do meio de cultura promovido pelo crescimento dos isolados de *Trichoderma*. Após o crescimento do *Trichoderma* no meio líquido BD o pH foi aferido e estava em torno de 3,5 para os diferentes isolados, enquanto que o pH no meio sem crescimento de *Trichoderma* estava em torno de 6,0. Tem sido relatado que alguns isolados de *Trichoderma* podem liberar ácidos orgânicos, o que pode levar a acidificação do meio, e assim contribuir para a solubilização de alguns nutrientes (MACHADO et al., 2016).

### **Avaliação de compostos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum***

No experimento para avaliação de possíveis compostos voláteis de *Trichoderma*, onde os isolados não entram em contato direto com o patógeno, observou-se inibição significativa de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença dos isolados de *Trichoderma*, mesmo sem contato direto (Tabela 4). Esse efeito foi observado tanto nos tempos 24 e 48 horas de incubação, com exceção para o isolado TH2 que no tempo de 48 horas não diferiu da testemunha. Os isolados também promoveram inibição total na formação de escleródios de *S. sclerotiorum*. Isso atesta que os compostos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* foram capazes de inibir efetivamente o crescimento de *S. sclerotiorum* bem como a formação de estruturas de sobrevivência.

Tabela 4. Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA em presença de compostos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	24 horas	48 horas	Escleródios formados
Testemunha	0,20 b	6,15 b	9,75 a
TH1	0,06 a	3,69 a	0,00 a
TH2	0,05 a	4,30 ab	0,00 a
TH3	0,02 a	2,98 a	0,00 a
CV%	4,48	10,68	77,74

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Corabi-Adell (2004) considera que cepas de *Trichoderma* spp. oriundas de áreas pouco antropizadas ou nativas apresentam efeito maior nas atividades de inibição de fitopatógenos em meio de cultura. O autor afirma que o percentual de eficiência é de 80%. Lopes et al. (2012), Bomfim et al. (2010) e Ávila et al. (2005) demonstraram que o fungo *Trichoderma* produz metabólitos voláteis que podem ser utilizados no controle de patógenos.

O experimento possibilitou certificar o efeito inibidor dos compostos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum* já comprovado por Lobo Junior & Abreu (2000), que em trabalhos anteriores demonstraram a capacidade que o *Trichoderma* possui de prejudicar o

desenvolvimento do fitopatógeno através de metabólitos voláteis. Ethur (2005) também corrobora com os resultados deste trabalho, quando afirma que fez o teste em 73 isolados de *Trichoderma* spp., e destes, apenas 8 não foram capazes de inibir o crescimento micelial do outro fungo.

### 3.2 ENSAIOS *IN VIVO*

#### **Avaliação do controle *in vivo* de *Sclerotinia sclerotiorum* com isolados de *Trichoderma* spp.**

No experimento em plantas de alface os resultados mais expressivos foram obtidos com aplicação na parte aérea, onde a aplicação com suspensão de esporos para os três isolados promoveram significativa redução tanto na severidade da doença como na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Tabela 5).

Tabela 5. Severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do mofo branco em plantas de alface tratadas com isolados de *Trichoderma* e inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*

Tratamentos	Aplicação			
	Parte Aérea		Solo	
	Severidade*	AACPD	Severidade* <sup>ns</sup>	AACPD
Testemunha	3,4 b	31,0 c	1,0	14,6 b
TH1	1,4 a	18,8 b	1,8	17,8 b
TH2	1,0 a	15,4 ab	0,0	0,0 a
TH3	0,2 a	8,1 a	1,4	15,4 b
CV%	23,73	16,44	43,57	46,0

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*Severidade sete dias após a inoculação. ns: não significativo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ressalta-se que os valores apresentados da severidade se referem a avaliação após sete dias dos tratamentos, enquanto que a AACPD considera toda epidemia da doença com as avaliações realizadas dos sete aos 12 dias após inoculação. Na aplicação via solo foi

observada redução significativa apenas pelo isolado TH2 na AACPD. Na aplicação de parte aérea o isolado TH3 promoveu inibição de 94,1% na severidade, aos sete dias após a inoculação, e de 73,9% na AACPD. Na aplicação no solo destacou-se o isolado TH2, no qual as plantas tratadas não apresentaram sintomas.

O fungo *Trichoderma* tem se destacado em estudos de controle biológico como um dos principais agentes para controle de fitopatógenos. Tem sido demonstrado que algumas espécies de *Trichoderma* apresentam eficiência comprovada no controle do mofo branco, tanto no cultivo *in vitro*, como em sistemas de cultivo em casas de vegetação e campo, visto que, o antagonista reduz significativamente o crescimento micelial do patógeno, bem como, a formação de escleródios (MERRIMAN, 1976).

De acordo com Rabeendran et al. (2006), estudos comprovam que a suspensão de esporos de isolados de *Trichoderma hamatum*, *T. virens* e *T. rossicum* quando incorporada em substratos de plantio, possui capacidade para controlar *S. sclerotiorum*. Além disso, o autor destaca que as espécies *T. hamatum* e *T. virens* foram capazes de reduzir a doença em 30 e 50%, o que significa que o antagonista apresenta boa capacidade de controle do mofo branco, fato constatado também por Chitrampalam (2008), que em seus estudos obteve redução na incidência da doença, em casa de vegetação, de 50%.

Os resultados obtidos sugerem que os isolados de *Trichoderma* avaliados têm potencial para serem utilizados no controle biológico do mofo branco em plantas de alface, e possivelmente também em outras culturas devido ao significativo efeito sobre *S. sclerotiorum*. Também demonstram a importância de avançar em estudos nesse sentido de forma a permitir maior compreensão de mecanismos envolvidos e formas de utilização.

#### 4. CONCLUSÃO

Foi possível obter isolados nativos de *Trichoderma* que apresentaram inibição sobre o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto por ação direta sobre o patógeno como através de compostos voláteis e na inibição da formação de escleródios. Também apresentaram efeito protetor em plantas de alface ao mofo branco, principalmente em aplicação na parte aérea.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, p. 1354-1359, 2008.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. New York: Academic Press. 2005. 922p.
- ÁVILA, Z.R. et al. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Embrapa Recursos Genéticos, Brasília, DF, 2005, 30p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 117).
- BHARAT, R. et al. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**. v.57, p.131-135, 1980.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 379-382, 1982.
- BERNARDO J. T. et al. Isolamento on farm de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 03, p. 263-270 2019.
- BOMFIM, M.P. et al. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n.1, p. 61-67, 2010.
- BRITO, F. S.; MILLER, P. R. M.; STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2010.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. 1990. 532p.
- CHITRAMPALAM, P. 2008. **Biocontrol of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in *S. minor* in desert agroecosystems**. Plant Disease, 92: 1625-1634.
- CORABI-ADELL, C. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análises ecofisiográfica**. 2004. 220 f. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 2004.

CUBILLA-RÍOS, A. A. et al. Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. **Agronomía Mesoamericana**, San José, v. 30, n. 1, p.63-77, 2019. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>.

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

ETHUR, L. Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.2, p.127-133, 2005.

FERNANDES, A. A. et al. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura brasileira**, v. 20, p. 195-200, 2002. Disponível em:<<https://www.scielo.br/j/hb/a/QXK67HKHymw6KGhH4dc9m7D/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em 08 jun. de 2023.

FERREIRA, D. F. **SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística**. Revista Symposium, Lavras, v.6, p. 36-41, 2008.

FIPKE, G. M.; DE BASTOS PAZINI, J.; ETHUR, L. Z. Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. ao *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes temperaturas. **Magistra**, v. 27, n. 1, p. 23-32, 2015.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum*T-22. **Plant Disease**, 84, 4: 376–393, 2000.

HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, 2: 43–56, 2004.

ISAIAS, C. O. et al. Ação antagonica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

JUNIOR, A. F. C. et al. Ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfii*. **Agri-environmental sciences**, v. 4, n. 2, p. 9-15, 2018. Disponível em:<<https://revista.unitins.br/index.php/agri-environmental-sciences/article/view/420/916>> Acesso em: 16 nov. de 2023.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. Doenças da alface. In: AMORIM, L. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. Volume 2. 5ª edição. Ouro Fino- MG. Agronômica Ceres. p.33-40. 2016.

KRUGER, T.L.; BACCHI, L.M.A. - Fungos. In: FILHO, A.B.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A. - **Manual de Fitopatologia. 3 ed.** São Paulo, Agronômica Ceres, 46–95. 1995.

LILLY, G.V.; BARNETT, H. L. **Physiology of the fungi.** New York: McGraw-Hill Book, 1951. 464 p. 1951.

LOBO JUNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas. **Ciências Agrotécnica**, v.24, n.2, p.521-526. 2000.

LOPES, F.A.C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, Oxford, v. 116, n. 7, p. 815-824, 2012

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface.** Brasília DF: Embrapa Hortaliças, 2010. Disponível em:<<https://core.ac.uk/download/pdf/33888838.pdf>>. Acesso em: 22 jun. de 2023.

LOUZADA, G. A. S. et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, p.145-149, 2009.

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, 2016.

MERRIMAN, P.R. Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, 8: 385-389. 1976.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 4: 261–295. 1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário (AGROFIT).** Disponível em:<[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons)>. Acesso em: 16 nov. de 2023.

REIS, A. et al. **Epidemiologia e manejo do mofo-branco em hortaliças.** 2007. Disponível em:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/781613/1/cot45.pdf>>. Acesso em: 16 nov. de 2023.

PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A.; ABD-ELMOITY, T.H. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, 72: 126-132. 1982.

PHILLIPS, A. J. L. Fungi associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in South Africa and their effects on the pathogen. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 21, n. 1, p. 135-139, 1989.

RABEENDRAN, N.; JONES, E. E.; MOOT, D. J.; STEWART, A. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minutans* and *Trichoderma hamatum*. **Biological Control**, v. 39, n. 3, p. 352-362, 2006.

RODRIGUES, E. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 124-128, 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/sp/a/tPGcs9pcVkPt9tkyzvrzNzj/>>. Acesso em: 08 jun. de 2023.

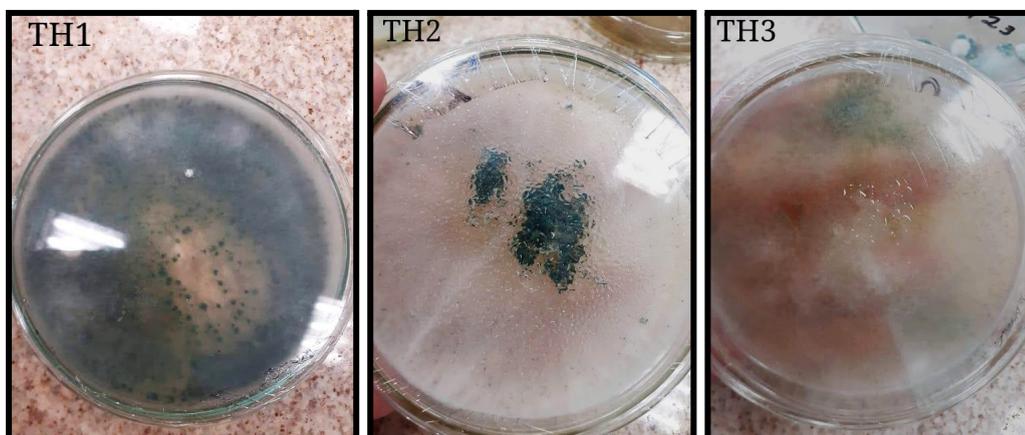
## APÊNDICE

**APÊNDICE A** - Crescimento micelial *Trichoderma* sp. sobre o arroz durante processo de captura em área de mata nativa.



Fonte: Arquivo Pessoal

**APÊNDICE B** - Crescimento dos isolados TH1, TH2 e TH3 de *Trichoderma* sp. em meio de cultura BDA.



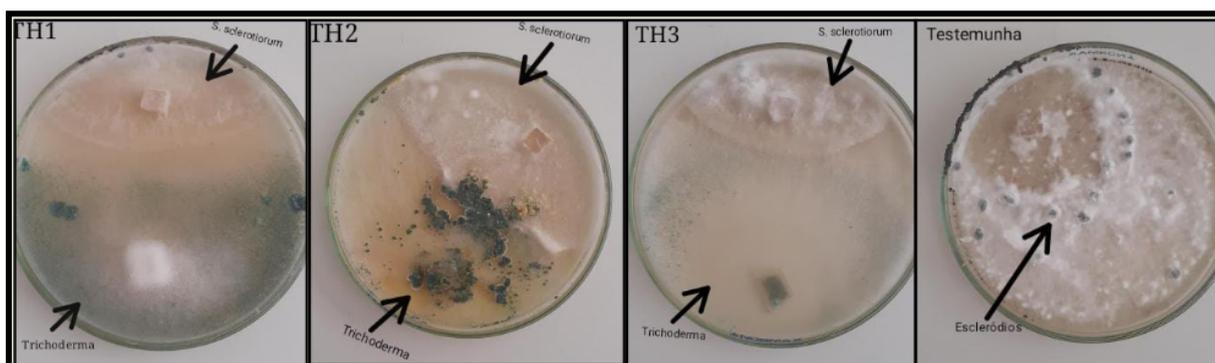
Fonte: Arquivo Pessoal

**APÊNDICE C** - Atividade de isolado de *Trichoderma* sp. (coloração esverdeada) inibindo e sobrepondo a *Sclerotinia sclerotiorum* em teste de pareamento em meio de cultura BDA.



Fonte: Arquivo Pessoal

**APÊNDICE D** - Desenvolvimento dos fungos conforme escala de Bell et al. (1982)



Fonte: Arquivo Pessoal