

Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*

Fabiano França da Silva¹; Elisa de Melo Castro¹; Silvino Intra Moreira¹; Thiago Costa Ferreira²; Amador Eduardo de Lima¹; Eduardo Alves¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 37200-000, Brasil; ² Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, Botucatu, SP, 18.610-307, Brasil.

Autor para correspondência: Thiago Costa Ferreira (ferreira_uepb@hotmail.com.)

Data de chegada: 05/07/2016. Aceito para publicação em: 15/08/2016.

10.1590/0100-5405/2212

RESUMO

Silva, F.F.; Castro, E.M.; Moreira, S.I.; Ferreira, T.C.; Lima, A.E.; Alves, E. Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. *Summa Phytopathologica*, v.43, n.1, p.41-45, 2017.

A elevada susceptibilidade da soja ao mofo-branco tem impactado negativamente a sua produtividade. Atualmente métodos de controle biológico como o uso de *Trichoderma* spp. têm proporcionado alternativas ao controle químico, com menor impacto ambiental e favorecimento do desenvolvimento vegetal. Objetivou-se avaliar os efeitos de *T. harzianum* sobre a emergência de sementes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*; além de verificar a interação entre os fungos e com a soja, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sementes de soja foram submetidas aos tratamentos: 1. Sem *S. sclerotiorum*, em BDA+Manitol; 2. Com *S. sclerotiorum*, em BDA+Manitol; 3. Com Ecotrich® WP e sem *S. sclerotiorum*, em BDA+Manitol; 4. Com *S.*

sclerotiorum e Ecotrich® WP, em BDA+Manitol. O teste de emergência foi conduzido em bandejas com areia esterilizada a 25 °C por 8 dias. Após isto foram seccionados órgãos vegetativos das plântulas emergidas para avaliar, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), o potencial de *T. harzianum* em parasitar e inibir *S. sclerotiorum*. De fato, o mofo-branco é capaz de colonizar e deteriorar todas as sementes de soja. *T. harzianum* mostra-se efetivo em colonizar o sistema radicular da soja, porém não contribui para a emergência quando comparada com a testemunha. A análise ultraestrutural permitiu evidenciar o micoparasitismo de *T. harzianum* a *S. sclerotiorum*, porém o controle do agente causal do mofo-branco não foi efetivo quanto se mostrou em outros estudos.

Palavras-chave: Controle biológico, *Glycine max*, Mofo-branco, Microscopia Eletrônica de Varredura.

ABSTRACT

Silva, F.F.; Castro, E.M.; Moreira, S.I.; Ferreira, T.C.; Lima, A.E.; Alves, E. 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.

The high susceptibility of soybean to white mold has negatively impacted its productivity. Currently, biological control methods, such as the use of *Trichoderma* spp., have provided alternatives to chemical control, as they promote less environmental impact and favor the plant growth. The aim of this study was to evaluate the effects of *T. harzianum* on the emergence of soybean seeds inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum*, besides identifying the interaction between fungi and soybeans by means of scanning electron microscopy (SEM). Soybean seeds were subjected to the following treatments: 1. Without *S. sclerotiorum*, in PDA+Mannitol; 2. With *S. sclerotiorum*, in PDA+Mannitol; 3. With Ecotrich® WP and without *S. sclerotiorum*, in PDA+Mannitol; 4.

With *S. sclerotiorum* and Ecotrich® WP, in PDA+Mannitol. The emergence test was conducted on trays with sterile sand at 25 °C for 8 days. Then, the vegetative organs of emerged seedlings were sectioned to evaluate, by scanning electron microscopy (SEM), *T. harzianum* potential to parasitize and inhibit *S. sclerotiorum*. In fact, the white mold is capable of colonizing and deteriorating all soybean seeds. *T. harzianum* is effective in colonizing the root system of soybeans but does not contribute to emergence, compared to control. Based on the ultrastructural analysis, mycoparasitism of *T. harzianum* and *S. Sclerotiorum* was evidenced, but the control of the causal agent of white mold was not as effective as shown in other studies.

Keywords: Biological control, *Glycine max*, White mold, Scanning Electron Microscopy.

A soja é a principal cultura do agronegócio brasileiro, com 31,94 milhões de hectares plantados e produção aproximada de 97 milhões de toneladas de grãos colhidos na safra de 2014/2015. O país é o segundo maior produtor e maior exportador mundial com índices de 50,8 milhões de toneladas (8). Essa expansão produtiva decorre da crescente utilização da soja na alimentação humana e animal e na produção de biodiesel.

A alta susceptibilidade a doenças e o uso de sementes com baixa qualidade, limitam a obtenção de altos rendimentos no cultivo da soja (18). Dentre estas, o mofo branco é considerado uma das doenças de maior importância na cultura, pois em condições ambientais favoráveis causa grandes perdas na lavoura (11). Estima-se que no Brasil a sua

ocorrência se deu em quase sete milhões de ha de área de cultivo de soja na safra 2013/2014 (23).

O agente causal do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* L. de Bary) tem como hospedeiros mais de 400 espécies de plantas, dentre esta a soja (3). O patógeno se associa às sementes como micélio dormente ou na forma de escleródios e reduz drasticamente o potencial germinativo, o vigor e a emergência (14).

O emprego de fungicidas químicos aplicados em sementes é amplamente utilizado na prevenção e na redução do inóculo inicial (11). Deste modo, o controle biológico tem sido utilizado como uma alternativa sustentável, por meio da aplicação de microrganismos antagonistas a patógenos habitantes do solo (22, 27, 29).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são agentes de controle biológico que exercem antagonismo a diversos fungos, inclusive *Sclerotinia sclerotiorum*, por meio de parasitismo, antibiose e/ou competição, além de contribuir na promoção de crescimento das plantas (2,13, 19, 32, 34).

A relação de *Trichoderma* spp. com a planta ocorre, em geral, na região das raízes onde o fungo coloniza a epiderme e as células do córtex, onde uma série de mecanismos bioquímicos acionam transduções de sinais de respostas de defesa da planta contra patógenos diversos (35). Lamdan et al. (17) verificaram que existem diversas proteínas secretadas por *Trichoderma virens* presentes quando em raízes de milho e ausente em sua ausência. Foi demonstrado que no secretoma estudado havia proteínas específicas importantes no diálogo molecular entre planta e fungo, as quais participam da ativação do sistema de defesa sistêmico vegetal. Yedidia et al. (33) observaram o estímulo de proteínas relacionadas à patogenicidade (RP) em resposta à presença de *T. harzianum* em plantas. Além disso, sabe-se que a promoção de crescimento da planta pode ser favorecida pela solubilização de fosfato e micronutrientes por *T. harzianum* (19).

Sua atividade antagonística pode ocorrer pela produção de metabólitos voláteis e não voláteis, como ácido harziânico, alamicinas e tricolinas, além da atividade de diversas enzimas líticas, tais como quitinases, glucanases e proteases (2, 16, 25, 26). Por fim, sua relação parasítica sobre fungos fitopatogênicos pode envolver eventos tais como localização, reconhecimento, contato direto, formação de estruturas em forma de gancho com função de apressórios, penetração, enovelamento e desenvolvimento de hifas paralelas, observados geralmente por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (1, 22, 35).

Diante do exposto objetivou-se com este trabalho conhecer, por meio de MEV, o efeito potencial de um produto à base de *T. harzianum* em inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, e estudar os efeitos de ambos os fungos na emergência de plântulas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, localizada no município de Lavras, MG.

Obtenção das sementes de soja e isolados

As sementes utilizadas neste trabalho pertencem a cultivar M7110 IPRO, Monsoy[®], com tecnologia INTACTA RR2 e susceptível a *S. sclerotiorum*. O isolado de *S. sclerotiorum*, Ref. LAPS 412 é procedente de soja cultivada no município de Patos de Minas, MG, e pertence à coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da UFPA. O agente de controle biológico *T. harzianum* é proveniente do produto comercial Ecotrich[®], pó molhável (WP).

Tratamento de sementes

Escleródios do isolado de *S. sclerotiorum* (LAPS 412) foram transferidos para oito placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA) [HIMEDIA[®]] acrescido do soluto Manitol [VETEC[®]] com potencial osmótico ajustado para -1,0 Mpa (73,04 g/L), conforme o software SPMM (24), e incubadas em câmara tipo BOD com temperatura ajustada para 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante cinco dias.

Após a completa colonização das placas de Petri pelo crescimento micelial, foram distribuídas sobre a colônia fúngica, 50g de sementes de soja, por tratamento, as quais foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (1% por 1 minuto), lavadas em água esterilizada e secas em temperatura ambiente por 24 horas, e incubadas em câmara de crescimento a 20 °C com fotoperíodo de 12 horas por um período de exposição de 48 horas em meio BDA com Manitol (10).

Após este período de 48 horas, as sementes foram submetidas aos respectivos tratamentos:

1. Testemunha (sementes sem inoculação de *S. sclerotiorum*);
2. Sementes inoculadas com *S. sclerotiorum*;
3. Sementes não inoculadas com *S. sclerotiorum*, porém tratadas com Ecotrich[®]WP;
4. Sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* e posteriormente tratadas com Ecotrich[®]WP.

O produto comercial Ecotrich[®]WP (*Trichoderma harzianum*) foi utilizado na proporção de 5g/200 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, as sementes foram secas a temperatura ambiente por 24 horas para posterior teste de emergência.

Teste de emergência em areia

O teste de emergência foi realizado em bandejas plásticas contendo como substrato areia de textura média e esterilizada em autoclave (90 minutos a 120 °C). Foram utilizadas 8 repetições de 25 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. Após a semeadura (3 cm de profundidade), as bandejas foram acondicionadas em câmara de crescimento vegetal, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas durante 8 dias. A irrigação foi realizada uniformemente sempre que necessário (10).

No oitavo dia procedeu-se a contagem (%) das plântulas normais. As plântulas foram retiradas cuidadosamente da areia, avaliadas conforme as Regras para Análise de Sementes (5). Nos tratamentos que apresentaram emergência de plântulas, coletaram-se folhas, hipocótilos e raízes para realizar a análise de microscopia eletrônica de varredura. Quando houve emergência, coletaram-se apenas as sementes.

Análise ultraestrutural de órgãos vegetativos de soja por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de tecido vegetal foram coletadas e preservadas em solução fixativa Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0% em tampão de cacodilato de sódio 0,05M, CaCl₂ 0,001M, pH 7,2) e armazenadas a 4°C por 24 horas (4).

Após a fixação as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,05 M por três vezes de 10 minutos cada e transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora. Posteriormente foram lavadas em água destilada por três vezes e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) permanecendo por dez minutos em cada concentração e três vezes de dez minutos na concentração 100%, conforme Bozzola & Russel (4).

Após, as amostras foram tratadas em aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030, onde a acetona foi substituída por CO₂. Os espécimes foram metalizadas com ouro em *sputtering* Balzers SCD 050, para observação em microscópio eletrônico de varredura Zeiss LEO EVO 40. As imagens geradas foram editadas utilizando software Corel Draw.

Delineamento experimental e análises estatísticas

Para o teste de emergência em areia, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e oito repetições. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software estatístico

Sisvar® (9), e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade (30).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de emergência em areia

O teste de emergência realizado em bandejas com areia evidenciou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. A testemunha (sem *S. sclerotiorum* e sem *T. harzianum*) apresentou maior porcentagem de emergência de plântulas normais de soja (68,88%), seguido pelo tratamento com *T. harzianum* (45,5%); com *S. sclerotiorum* e *T. harzianum* (21,13%); e apenas com *S. sclerotiorum* (0,00%).

De fato, o agente causal do mofo-branco foi muito agressivo, reduzindo drasticamente a emergência das plântulas mesmo com a presença do agente de controle biológico testado. A alta agressividade desta doença tem sido relatada por diversos autores (21, 28, 29, 32).

Nas condições utilizadas neste trabalho, o emprego do produto comercial Ecotrich® WP à base de *T. harzianum* no tratamento de sementes não favoreceu a emergência de plântulas em relação à testemunha. Ferreira 2015 (10) relata que a presença de *Trichoderma harzianum* (Trichodermil® SC 1306) e *Trichoderma asperelum* (Quality®) em sementes de soja (ambos a 100g/100kg de semente) semelhantemente não favoreceu a emergência e o índice de velocidade de emergência, em condições de casa de vegetação.

Sabe-se que o emprego de *Trichoderma* como agente de controle

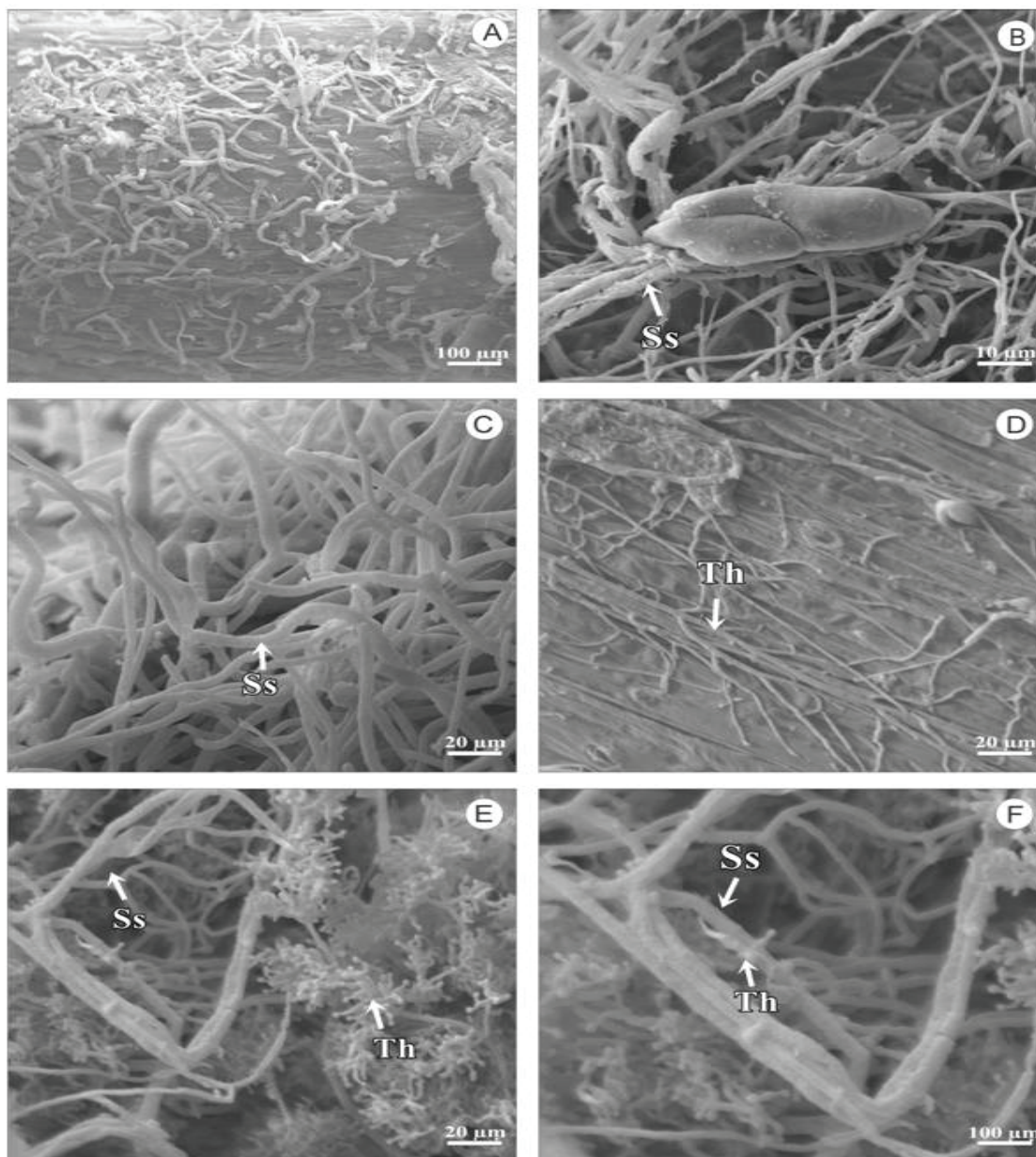


Figura 1. Eletromicrografia de varredura do estudo das interações entre *Sclerotinia sclerotiorum* e *Trichoderma harzianum* com as sementes de soja e entre si: A) Tratamento Testemunha: Fragmento de radícula de soja isenta de fungos; B e C) Tratamento com *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) apenas, colonizando semente de soja em estágio de decomposição; D) Tratamento com *Trichoderma harzianum* (Th) apenas, colonizando radícula; E e F) Tratamento *S. sclerotiorum* com posterior aplicação de *T. harzianum*: micoparasitismo de *T. harzianum* sobre *S. sclerotiorum* em semente de soja.

biológico contra patógenos de plantas é efetivo apenas em condições ambientais e em substratos favoráveis ao seu desenvolvimento e à sua atividade antagonística (10, 13, 22, 27,31). Chitrampalam et al. (7) e Zancan et al. (34) também observaram a ineficiência de *Trichoderma* spp. sob condições desfavoráveis.

Em geral, a habilidade de *Trichoderma* em promover um controle sistêmico do mofo-branco e estimular o crescimento das plantas está relacionada ao tipo de substrato, o qual ocasiona variações no grau de supressão contra o fitopatógeno. Estudo de plantas em meio enriquecido demonstraram maior efetividade de *Trichoderma* no controle de doenças foliares (7, 10, 29, 31). Smolinska et al. (31) observaram que a adição de palha de trigo e bagaço de maçã enriquecidos com *T. virens* preveniu completamente a sobrevivência de escleródios no solo. Além disso, verificaram que compostos orgânicos avaliados como veiculadores de *T. virens* promoveram efeito positivo no crescimento de plântulas de alface. Tancic et al. (32) obtiveram resultados com efeito significativamente positivo em experimentos realizados em casa de vegetação, na germinação, crescimento radicular e vigor de sementes de soja plantadas em vasos com substrato utilizando isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *S. sclerotiorum*. Gorgen et al. (13) observaram que o uso da palhada de *Brachiaria ruziziensis* favoreceu a colonização de até 84% de escleródios por *T. harzianum* 1306 em soja.

Assim, as bandejas com areia utilizadas nos ensaios proporcionaram um ambiente rizosférico pobre em matéria orgânica, com baixa umidade, e provavelmente com uma comunidade microbiana de baixa diversidade e biomassa, o que pode reduzir a ação de *T. harzianum* em exercer antagonismo à *S. sclerotiorum* e promover melhor desenvolvimento vegetativo da planta.

Análise das eletromicrografias de varredura

No tratamento testemunha observaram-se radículas de soja sem a presença de fungos (figura 1A).

Por sua vez, no tratamento com apenas *S. sclerotiorum* foi evidente a colonização micelial generalizada das sementes (figura 1B e C), o que impediu a emergência de plântulas. Este fungo é capaz não apenas em germinar e colonizar a superfície de tecidos vegetais, mas também em penetrar e colonizá-los internamente, inclusive de forma necrotrófica (12,15).

Quando as sementes foram tratadas apenas com *T. harzianum*, sua colonização sobre as raízes de soja se deu de forma efetiva (figura 1D). Chao et al. (6), Chitrampalam et al. (7) e Louzada et al. (20) afirmam que após o agente biológico desenvolver-se na esfermosfera ele acaba acompanhando o desenvolvimento do sistema radicular da planta. Benitez et al. (2) classifica a interação entre *Trichoderma* spp. e planta como de simbiose, a qual se dá pela colonização da superfície externa das raízes, estendendo-se pelo rizoplane e com capacidade de penetração na epiderme radicular.

Quanto ao tratamento onde se desenvolveram tanto o agente de controle biológico como o patógeno, foi possível identificar o micoparasitismo de *T. harzianum* sobre *S. sclerotiorum* (figura 1E e F). No presente trabalho observou-se apenas o desenvolvimento de hifas paralelas, sem a presença de envelamentos (figura 1E e F). Ao observar o antagonismo de *T. harzianum* contra *Fusarium* spp. Monteiro et al. (25) verificaram também apenas contato paralelo. Nota-se que o antagonismo ocorre não apenas por modificações morfológicas, mas também pela competição por nutrientes e pela produção de diversas enzimas hidrolíticas (2, 16, 25, 26).

O agente causal do mofo-branco é altamente agressivo, promovendo colonização e decomposição de 100% das sementes de soja quando na

ausência de *T. harzianum*.

A microbiolização de sementes com *T. harzianum* demonstra que o agente de controle biológico é capaz de colonizar sementes e raízes das plântulas de soja, no entanto não teve capacidade de promover o controle do patógeno e a emergência de plântulas nas condições do estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade Federal de Lavras, a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais/Fapemig, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Capes e a Financiadora de Estudos e Projetos/Finep.

REFERÊNCIAS

1. Abdullah, M.T.; Ali, N.Y.; Suleman, P. Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, Surrey, v.27, p.1354-1359, 2008.
2. Benitez, T.; Rincón, A. M.; Limón, M. C.; Codón, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v.7, n.4, p.249-260, 2004.
3. Bolton, M.D.; Thomma, B.P.H.J.; Nelson, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum*: Biology and Molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p.1-16, 2006.
4. Bozzola, J.J.; Russell, L.D. **Electron microscopy**. Boston: Ed. Jones and Bartlett, 1999. 67p.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ ACS, 2009. 395 p.
6. Chao, W. L.; Nelson, E. B.; Harman, G. E.; Hoch, H. C. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v.76, p.60-65, 1986.
7. Chitrampalam, P.; Figuli, P. J.; Matheron, M. E.; Subbarao, K. V.; Pryor, B. M. Biocontrol of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* in desert agroecosystems. **Plant Disease**, Saint Paul, v.92, n.12, p.1625-1634, 2008.
8. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos - SAFRA 2015/16 - Quarto levantamento. **Conab**, Brasília, v. 1, n.3, 2013.
9. Ferreira, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, 2011.
10. Ferreira, T.C. **Níveis de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* em relação à desempenho de sementes de soja tratadas com fungicidas e agentes biológicos**. 2015. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
11. Furlan, S.H. Mofo-branco. In: Lemes, E.; Castro, L.; Assis, R. **Doenças da Soja: Melhoramento Genético e Técnicas e Manejo**. Campinas: Millenium, 2015. 53-72p.
12. Garg, H.; Li, H.; Sivasithamparam, K.; Kuo, J.; Barbetti, M.J. The infection process of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of a resistant and a susceptible genotype of *Brassica napus*. **Annals of Botany**, Oxford, v.106, n.6, p.897-908, 2010.
13. Gorgen, A.C.; Silveira Neto, A.N.; Carneiro, L.C.; Ragagnin, V.; Lobo Júnior, M. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.12, p.1583-1590, 2009.
14. Hennenberg, L.; Grabicoski, E.M.G.; Jaccoud-Filho, D.S.; Panobianco, M. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.47, n.6, p.763-768, 2012.
15. Kabbage, M.; Yarden, O. Dickman, M.B. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: Switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant Science**, Ottawa, n.233, p.53-60, 2015.
16. Kim, D.J.; Baek, J.M.; Uribe, P.; Kenerley, C.M.; Cook, D.R. Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. **Current Genetics**, Göteborg, v.40, p.374-384, 2002.

17. Lamdan, N.L.; Shalaby, S.; Ziv, T.; Kenerley, C.M.; Horwitz, B.A. Secretome of *Trichoderma* Interacting With Maize Roots: Role in Induced Systemic Resistance. **Molecular & Cellular Proteomics**, Rockville, v.14, n.4, p.1054-1063, 2015.
18. Lemes, E.; Castro, L.; Assis, R. **Doenças da Soja: Melhoramento Genético e Técnicas e Manejo**. Campinas: Millenium, 2015. 363p.
19. Li, R.; Feng, C.; Pang, G.; Shen, Q.; Li, R.; Chen, W. Solubilization of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relations with the Promotion of Tomato Plant Growth. **PLOS One**, São Francisco, v.25, p.1-16, 2015.
20. Louzada, G. A. S.; Carvalho, D. D. C.; Mello, S. C. M.; Lobo Júnior, M.; Martins, I.; Braúna, L. M. Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, São Paulo, v.9, n.3, p.145-149, 2009.
21. Machado, J. C.; Oliveira, J. A.; Vieira, M. G. G. C.; Alves, M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.23, n.2, p.95-101, 2001.
22. Melo, S.C.M. Recursos genéticos de microrganismos. In: Albuquerque, A.C.S.; Silva, A.G. **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucional e políticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. v.2, p.679-700.
23. Meyer, M.C.; Campos, H.D.; Godoy, C.V.; Utiamada, C.M. **Ensaio cooperativos de controle químico de mofo-branco na cultura da soja**. Londrina: Embrapa, 2014. 100p.
24. Michel, B.E.; Radcliffe, D.A. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v.87, p.126-130, 1995.
25. Monteiro, V. N.; Silva, R. N.; Steindorff, A. S.; Costa, F. T.; Noronha, E. F.; Ricart, C. A. O. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current Microbiology**, New York, v.61, n.4, p.298-305, 2010.
26. Morán-Diez, E.; Hermosa, R.; Ambrosino, P.; Cardoza, R.E.; Gutiérrez, S.; Lorito, M.; Monte, E. The ThPG1 Endopolygalacturonase Is Required for the *Trichoderma harzianum* – Plant Beneficial Interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Palo Alto, v.22, n.8, p.1021-1031, 2009.
27. Pomella, A.W.V.; Ribeiro, R.T.S. Controle Biológico com *Trichoderma* em Grandes Culturas – Uma visão empresarial. In: Bettioli, W.; Morandi, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 239-244.
28. Reis, E. M.; Zanatta, M.; Campos, H. D.; Campos, H. D.; Meyer, M. C.; Silva, L. H. C. P.; Nunes Júnior, J.; Pimenta, C. B.; Cassetari, D.; Machado, A. Q.; Juliatti, F. C.; Utiamada, C. Critical-point Point yieldYield modelModel to estimateEstimate grainGrain yieldYield damageDamage causedCaused by *Sclerotinia sclerotiorum* in soybeanSoybean. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.5, n.1, 2011.
29. Saharan, G. S.; Mehta, N. **Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management**. New Delly: Springer Science, 2008. 550p.
30. Scott, A.; Knott, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington D.C., v.30, n.3, p.507-512, 1974.
31. Smolinska U.; Kowalska, B.; Kowalczyk, W.; Szczech, M.; Murgrabia, A. Erradication of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia from soil using organic waste materials as *Trichoderma* fungi carriers. **Journal of Horticultural Research**, Skierniewice, v.24, n.1, p.101-110, 2016.
32. Tancic, S.; Skrobonja, J.; Lalosevic, M.; Jevtic, R.; Vidic, M. Impact of *Trichoderma* spp. on Soybean Seed Germination and Potential Antagonistic Effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticides and Phytomedicine**, Belgrado, v.28, n.3, p.181-185, 2013.
33. Yedidia, I.; Benhamou, N.; Napulnik, Y.; Chet, I. Induction and accumulation of PR proteins active during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology and Biochemistry**, London, v.38, p.863-873, 2000.
34. Zancan, W. L. A.; Machado, J. C.; Sousa, B. F. M.; Matos, C. S. M. 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, 2012.
35. Zhang, F.; Ge, H.; Zhang, F.; Guo, N.; Wang, Y.; Chen, L.; Ji, X.; Li, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloee against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.100, p.64-74, 2016.