



REGIANE ALVES BELIZARIO

**ESPECIFICIDADE DE *Trichoderma* spp. NO PARASITISMO
DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS PRODUTORES DE
ESCLERÓDIOS**

LAVRAS – MG

2025

REGIANE ALVES BELIZARIO

**ESPECIFICIDADE DE *Trichoderma* spp. NO PARASITISMO DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS PRODUTORES DE ESCLERÓDIOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Fitopatologia, para obtenção do
título de Mestre.

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Orientador

LAVRAS-MG

2025

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alves Belizario, Regiane.

Especificidade de *Trichoderma* spp. no parasitismo de fungos
fitopatogênicos produtores de escleródios / Regiane Alves Belizario. -
2025.

45 p. : il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2025. Bibliografia.

1. Diversidade genética. 2. *Rhizoctonia solani*. 3. *Agroathelia*
rolfsii. 4. *Sclerotinia sclerotiorum*. 5. Controle biológico. I. Teodoro
de Souza, Jorge . II. Universidade Federal de Lavras. III. Título.

REGIANE ALVES BELIZARIO

**ESPECIFICIDADE DE *Trichoderma* spp. NO PARASITISMO DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS PRODUTORES DE ESCLERÓDIOS**

**SPECIFICITY OF *Trichoderma* spp. IN PARASITISM OF SCLEROTIUM-
PRODUCING PHYTOPATHOGENIC FUNGI**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Fitopatologia, para obtenção do
título de Mestre.

APROVADO em 28/05/2025

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares

Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach

Dra. Otilia Ricardo de Farias

Documento assinado digitalmente
 **JORGE TEODORO DE SOUZA**
Data: 09/09/2025 09:09:26-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Orientador

LAVRAS – MG

2025

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pela sabedoria e discernimento. Por ser sempre meu amparo, minha luz, minha força e meu Guia. Seu amor me sustentou até aqui.

Aos meus pais Valdelucia Alves de Sousa Belizario e Marcio Expedito Belizario, pela educação e amor que me deram e por me proporcionarem muito mais do que eles tiveram, não medindo esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus irmãos Cristiane Aparecida Belizario e Marcelo Henrique Belizario, por não soltarem a minha mão e serem um dos maiores motivos dos meus esforços.

Ao meu noivo Wellington Junio Amâncio Santos, por me apoiar e acreditar em mim mais do que eu mesma.

À minha grande amiga Nathalyna Lúcia, pela amizade, apoio e por nunca me deixar desistir e nem esquecer o motivo pelo qual lutamos.

Aos meus amigos José Manuel, Brunno Cassiano, Otília Ricardo, Ananda Vieira, Rafael Coelho, Rafaela Guimarães e Luísa Reis, pela amizade construída, pelos bons momentos e por toda ajuda que me deram.

À toda minha família e amigos por estarem comigo em todos os momentos e tornarem essa jornada mais leve.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP) pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao meu orientador Jorge Teodoro de Souza pela orientação, conhecimento compartilhado, incentivo e amizade durante esses anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Alguns fungos fitopatogênicos habitantes do solo podem sobreviver saprofiticamente ou por meio de estruturas de resistência, como os escleródios, dificultando o manejo da doença causada por esses agentes. Nesse contexto, o controle biológico tem sido amplamente estudado e utilizado, sendo o gênero *Trichoderma* um dos agentes mais utilizados no controle de patógenos de solo. Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética e a especificidade no parasitismo de escleródios de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Agroathelia rolfsii* por isolados de *Trichoderma* spp., bem como seu potencial na promoção do crescimento de plantas e na supressão de *R. solani* em um bioensaio com feijoeiro. Foram realizados isolamentos a partir de plantas, serrapilheira e solos de diferentes localidades de Minas Gerais. A diversidade genética de 98 isolados foi analisada por meio da técnica de BOX-PCR. Isolados representativos dos grupos BOX-PCR foram selecionados para identificação molecular com base na amplificação do gene *tef-1α*. Dez isolados foram selecionados para avaliação da especificidade no parasitismo de escleródios de *R. solani*, *S. sclerotiorum* e *A. rolfsii*. Em seguida, esses 10 isolados foram testados em bioensaio com plantas de feijoeiro, no qual foram avaliados: primeira contagem de emergência, índice de velocidade de emergência e emergência final, comprimento da parte aérea e das raízes e a incidência da doença causada por *R. solani*. A análise por BOX-PCR revelou que os 98 isolados estavam distribuídos em 58 grupos, sendo 58,51% compostos por grupos com mais de um isolado e 41,4% por grupos de um único isolado. Dos 20 isolados representativos analisados, foram identificadas seis espécies: *T. pseudoasperelloides*, *T. zelibreve*, *T. anisohamatum*, *T. amoenum*, *T. linzhiense*, *T. subuliforme* e uma possível nova espécie. *Trichoderma pseudoasperelloides* LFM0081 e LFM0027 e *T. zelibreve* LFM001 se destacaram por parasitar e reduzir a viabilidade dos escleródios de *S. sclerotiorum* e *R. solani* e *A. rolfsii*. Os isolados *T. pseudoasperelloides* LFM0081, LFM0085 e *T. anisohamatum* LFM00102 proporcionaram aumento da porcentagem de emergência e o crescimento de plantas de feijoeiro, além de reduzirem a incidência de doença e o tombamento causados por *R. solani*, demonstrando potencial para o biocontrole. Os resultados demonstram o potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole, embora variações entre os isolados reforcem a importância de estudos complementares para validação e seleção de isolados promissores.

Palavras-chave: *Rhizoctonia solani*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Agroathelia rolfsii*; Diversidade genética; Controle biológico.

ABSTRACT

Some soil-dwelling phytopathogenic fungi can survive saprophytically or through resistance structures, such as sclerotia, making it difficult to manage the disease caused by these agents. In this context, biological control has been widely studied and used, with the genus *Trichoderma* being one of the most widely used agents in the control of soil pathogens. This study aimed to evaluate the genetic diversity and specificity in the parasitism of sclerotia of *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Agroathelia rolfsii* by isolates of *Trichoderma* spp., as well as their potential in promoting plant growth and suppressing *R. solani* in a common bean bioassay. Isolations were made from plants, leaf litter, and soils from different locations in Minas Gerais. The genetic diversity of 98 isolates was analyzed using the BOX-PCR technique. Representative isolates from the BOX-PCR groups were selected for molecular identification based on amplification of the *tef-1 α* gene. Ten isolates were selected to evaluate their specificity in parasitism of sclerotia of *R. solani*, *S. sclerotiorum* and *A. rolfsii*. These 10 isolates were then tested in a bioassay with common bean plants, in which the following were evaluated: first emergence count, emergence speed index and final emergence, shoot and root length, and the incidence of the disease caused by *R. solani*. BOX-PCR analysis revealed that the 98 isolates were distributed into 58 groups, with 58.51% consisting of groups with more than one isolate and 41.4% consisting of groups of a single isolate. Of the 20 representative isolates analyzed, six species were identified: *T. pseudoasperelloides*, *T. zelibre*, *T. anisohamatum*, *T. amoenum*, *T. linzhiense*, *T. subuliforme* and a possible new species. *Trichoderma pseudoasperelloides* LFM0081 and LFM0027 and *T. zelibre* LFM001 stood out for parasitizing and reducing the viability of the sclerotia of *S. sclerotiorum* and *R. solani* and *A. rolfsii*. The isolates *T. pseudoasperelloides* LFM0081, LFM0085 and *T. anisohamatum* LFM00102 provided an increase in the emergence percentage and growth of common bean plants, in addition to reducing the incidence of disease and damping-off caused by *R. solani*, demonstrating potential for biocontrol. The results demonstrate the potential of *Trichoderma* spp. in biocontrol, although variations among isolates reinforce the importance of complementary studies for validation and selection of promising isolates.

Keywords: *Rhizoctonia solani*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Agroathelia rolfsii*; Genetic diversity; Biological control.

INDICADORES DE IMPACTO

As doenças de plantas causadas por fungos representam um dos principais fatores de perdas na produção agrícola. Grande parte dos produtos químicos aplicados não atingem o alvo, sendo dispersos no ambiente e causando contaminação do solo, da água, de seres humanos e de animais. O uso de fungos do gênero *Trichoderma* como agentes de controle biológico, é uma importante estratégia para reduzir a utilização de produtos químicos, diminuindo, consequentemente, a contaminação ambiental e favorecendo a microbiota natural do solo. O gênero *Trichoderma* é amplamente distribuído, com centenas de espécies descritas, muitas das quais apresentam potencial para o controle biológico. O estudo da diversidade genética é fundamental na busca por espécies mais eficientes no controle de doenças, o que impulsiona avanços tecnológicos voltados à criação de novos produtos e ao desenvolvimento de tecnologias de aplicação. Além disso, a produção de bioprodutos favorece a produtividade agrícola e gera renda local. Assim, o estudo da especificidade de *Trichoderma* spp. no parasitismo de fitopatógenos, apresenta impactos ambientais, sociais e tecnológicos, contribuindo para uma agricultura mais sustentável.

IMPACT INDICATORS

Plant diseases caused by fungi represent one of the main factors in losses in agricultural production. Most of the chemicals applied do not reach their target, being dispersed into the environment and causing contamination of soil, water, humans and animals. The use of fungi of the genus *Trichoderma* as biological control agents is an important strategy to reduce the use of chemical products, consequently decreasing environmental contamination and favoring the natural soil microbiota. The genus *Trichoderma* is widely distributed, with hundreds of described species, many of which have potential for biological control. The study of genetic diversity is fundamental in the search for species that are more efficient in controlling diseases, which drives technological advances aimed at creating new products and developing application technologies. Furthermore, the production of bioproducts favors agricultural productivity and generates local income. Thus, the study of the specificity of *Trichoderma* spp. in the parasitism of phytopathogens presents environmental, social and technological impacts, contributing to more sustainable agriculture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. HIPÓTESES.....	12
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivo geral.....	12
3.2. Objetivos específicos.....	12
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
4.1. Fungos fitopatogênicos produtores de escleródios.....	13
4.2. Controle biológico de doenças de plantas.....	15
4.3. <i>Trichoderma</i> spp. como agentes de controle biológico.....	16
4.4. Identificação de <i>Trichoderma</i> spp.....	18
4.4.1. A filogenia de <i>Trichoderma</i> spp.....	20
5. METODOLOGIA.....	22
5.1. Obtenção e manutenção dos fitopatógenos e de <i>Trichoderma</i> spp.....	22
5.2. Extração de DNA dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	22
5.3. BOX-PCR para agrupamento dos isolados.....	23
5.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético.....	24
5.5. Teste de micoparasitismo de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>A. rolfsii</i>	24
5.6. Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. no biocontrole de <i>R. solani</i> em feijão	25
6. RESULTADOS.....	28
6.1. Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos.....	28
6.2. BOX-PCR, PCR e sequenciamento genético.....	28
6.3. Micoparasitismo de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>A. rolfsii</i>	30
6.4. Controle de <i>R. solani</i> em feijoeiro.....	32
7. DISCUSSÃO.....	36
8. CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO.....	45

1. INTRODUÇÃO

As doenças de plantas causadas por fungos representam um dos principais fatores responsáveis pela redução da produtividade e da qualidade dos produtos agrícolas. O controle químico ainda é a principal estratégia utilizada no campo, no entanto, segundo Gavrilescu (2005), aproximadamente 55% dos fungicidas aplicados não atingem o alvo, sendo dispersos no ambiente. Essa ineficiência, aliada ao uso intensivo de produtos químicos, pode gerar sérios impactos ambientais, como a contaminação do solo, da água e da fauna, além de aumentar os custos de produção, exercer pressão de seleção sobre os patógenos, reduzir a biodiversidade e eliminar organismos benéficos (Bettiol & Morandi, 2009).

Os fungos fitopatogênicos possuem diversas estratégias de infecção e sobrevivência, entre elas a produção de estruturas de resistência, como os escleródios. Essas estruturas, formadas por agregados compactos de hifas enriquecidos com nutrientes, podem se desenvolver no interior ou na superfície dos tecidos vegetais colonizados. Durante as práticas agrícolas, os escleródios podem ser incorporados ao solo ou disseminados a longas distâncias, inclusive por meio das sementes (Reis et al., 2011). Extremamente resistentes a condições adversas, podem permanecer viáveis no solo por até oito anos, funcionando como importante fonte de inóculo e dificultando o manejo das doenças (Mitsueda & Charchar, 1994). Dentre os principais fitopatógenos produtores de escleródios, destacam-se *Rhizoctonia* spp., *Stromatinia* spp., *Sclerotinia* spp. e *Macrophomina* spp., causadores de tombamento, podridão-branca, mofo-branco e podridão-de-carvão, respectivamente. Diante da persistência dessas estruturas no ambiente, torna-se essencial a adoção de estratégias de manejo, como o controle biológico, que pode reduzir o inóculo presente no solo e contribuir para controle da doença.

O controle biológico é uma alternativa eficaz e sustentável dentro do manejo integrado, podendo envolver o uso de microrganismos nativos ou introduzidos na área de cultivo (Bettiol & Morandi, 2009). Os agentes de biocontrole atuam por diversos mecanismos, como competição, antibiose, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de resistência no hospedeiro, sendo comum um mesmo organismo empregar múltiplas estratégias simultaneamente (Bettiol, 1991). Dentre esses agentes, os fungos do gênero *Trichoderma* destacam-se pelo amplo espectro de ação contra fitopatógenos, sendo amplamente estudados e utilizados na agricultura. Esses fungos são encontrados em diferentes ecossistemas, especialmente no solo e no interior das plantas, apresentam fácil cultivo, crescimento rápido e

elevada produção de esporos (Machado et al., 2012).

Com mais de 400 espécies descritas (Sales et al., 2020), o gênero *Trichoderma* destaca-se entre os principais agentes de biocontrole utilizados na agricultura, incluindo o uso contra fungos que produzem estruturas de resistência, como escleródios, e há diversos produtos comerciais baseados em espécies como *T. harzianum* e *T. viride* (Bettiol et al., 2019). Nesse contexto, destaca-se a importância de explorar a diversidade de espécies de *Trichoderma* em diferentes ambientes, a fim de identificar isolados com potencial de parasitismo sobre estruturas de resistência como escleródios, bem como sua capacidade de promover o crescimento de plantas e controle da doença.

2. HIPÓTESES

Isolados do gênero *Trichoderma* oriundos de diferentes locais e substratos (plantas, solo e serrapilheira) em Minas Gerais abriga diversas espécies com potencial antagônico diferente contra fitopatógenos de solo formadores de escleródios, como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Agroathelia rolfsii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a diversidade genética e a especificidade no parasitismo de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Agroathelia rolfsii* por isolados de *Trichoderma* spp., bem como seu potencial na promoção do crescimento de plantas e na supressão de *R. solani* em um bioensaio com feijoeiro.

3.2. Objetivos específicos

Estudar a diversidade genética de isolados de *Trichoderma* spp. por BOX-PCR;

Realizar a identificação molecular de isolados representativos de cada grupo BOX por meio do sequenciamento de um fragmento do gene *tef1-α*;

Avaliar a especificidade no parasitismo de escleródios de *R. solani*, *S. sclerotiorum* e *A. rolfsii* por isolados de *Trichoderma* spp.;

Avaliar o efeito de isolados de diferentes grupos BOX na promoção do crescimento de plantas e na supressão de *R. solani* em um bioensaio com feijoeiro.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. Fungos fitopatogênicos produtores de escleródios

Alguns fungos fitopatogênicos desenvolveram estratégias para sua infecção, o estabelecimento na planta e sua sobrevivência fora dela. Os patógenos que habitam o solo causam importantes doenças como podridões de caules, raízes e bulbos, murchas, mofo e o tombamento (damping-off), representando grande impacto econômico. O controle desses patógenos é dificultado por sua elevada capacidade de competição saprofítica e, principalmente, pela formação de estruturas de resistência, como escleródios, que consistem em massas de hifas condensadas e recobertas por melanina. Essas estruturas são produzidas quando as condições ambientais não favorecem a germinação ou na ausência de um hospedeiro compatível (Garcia et al., 2012), podendo sobreviver no solo por anos, mesmo sem a presença da planta hospedeira e tornando-se a principal fonte de inóculo (Meyer et al., 2019). Os escleródios permanecem viáveis por longos períodos e são altamente resistentes a produtos químicos, condições ambientais adversas e degradação biológica (Rembinski et al., 2022). A germinação normalmente ocorre de forma miceliogênica, gerando hifas que se desenvolvem em micélios. No entanto, em algumas espécies, sobretudo as espécies da família *Sclerotiniaceae*, os escleródios podem também germinar de forma carpogênica, dando origem a corpos de frutificação macroscópicas, conhecidas como apotécios (Reis et al., 2011). Dentre os principais fitopatogênicos produtores de escleródios, destacam-se *Rhizoctonia* spp., *Stromatinia* spp., *Sclerotinia* spp. e *Macrophomina* spp.

A espécie *Rhizoctonia solani* caracteriza-se por ser um patógeno habitante do solo que pode sobreviver saprofiticamente, colonizando a matéria orgânica, ou na forma de escleródios por pelo menos um ano (Ajayi-Oyetunde et al., 2017; Lewis, 2001; Les et al., 2020). Essa espécie causa diversos sintomas em culturas como soja, feijão e hortaliças, incluindo podridão da raiz e da base da haste, podridão de vagens, morte em reboleira, tombamento e mela ou requeima (Abbas et al., 2017; Embrapa, 1999). A infecção ocorre por meio de ferimentos, aberturas naturais ou pela penetração direta do micélio na epiderme da planta (Guerrero-González et al., 2011). Enquanto as hifas causam necrose nos tecidos, continuam se expandindo e colonizando o tecido e se agregando para formar os escleródios (Reça, 2022). Como o micélio

de *R. solani* é estéril e não produz esporos assexuados, os escleródios tornam-se sua principal estrutura de sobrevivência e disseminação.

Outro fungo de grande importância é *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo-branco, uma das principais doenças de solo que acomete culturas como soja, feijão, algodão e batata, entre outras. A doença caracteriza-se por podridão úmida coberta por um micélio algodinoso e pela formação de escleródios (Cardoso, 1990). A germinação dos escleródios é favorecida por condições de alta umidade, sombreamento do solo e temperaturas entre 15 e 20 °C, originando micélios ou ascósporos, que são as estruturas responsáveis pelo início da infecção (Meyer et al., 2019). A reprodução sexuada de *S. sclerotiorum* ocorre pela germinação carpogênica dos escleródios, produzindo apotécios e a partir deles, os ascósporos. A reprodução assexuada não ocorre, mas os escleródios germinam, colonizam e originam novos escleródios (Aldrich et al., 2015).

Agroathelia rolfsii, pertencente ao filo *Basidiomycota*, é um patógeno necrotrófico que infecta mais de 500 espécies vegetais, causando sintomas como podridão radicular, murcha e tombamento (Punja, 1985). A doença, conhecida como podridão-do-colo ou podridão-de-escleródio, foi inicialmente observada em tomate e, posteriormente, em outras culturas como feijão, soja, batata e pimenta, resultando em expressivas perdas econômicas. O fungo forma micélios brancos abundantes e numerosos escleródios de 0,5 a 2 mm de diâmetro sobre o caule, raiz ou superfície do solo, permitindo sua sobrevivência por longos períodos. Sua capacidade saprofítica dificulta ainda mais o controle (Guerra et al., 2015; Beute et al., 1981). Além disso, *A. rolfsii* produz ácido oxálico e enzimas hidrolíticas como poligalacturonases, que, com auxílio do ácido oxálico, formam oxalato de cálcio e reduzem o pH, facilitando a infecção (Punja, 1985). A doença é favorecida por temperaturas elevadas, entre 27 e 30 °C, e alta umidade, enquanto a formação de escleródios é estimulada pela presença de luz e oxigênio (Blum et al., 2003).

Os fungos fitopatogênicos habitantes do solo são, na maioria das vezes, cosmopolitas, polípagos e necrotróficos, com a capacidade de produzir estruturas de resistência que sobrevivem no ambiente por anos em condições adversas e ausência do hospedeiro, com isso, o manejo das doenças causadas por esses agentes representa um grande desafio para a agricultura (Bueno, 2007). Além disso, o uso intensivo e inadequado de fungicidas químicos representa riscos à saúde humana e ambiental, além de favorecer o surgimento de resistência nos patógenos (Ghini & Kimati, 2000). Nesse contexto, o controle biológico surge como uma estratégia promissora e sustentável, seja por meio do aproveitamento da microbiota natural do solo, seja pela introdução de agentes de controle biológico com eficácia comprovada.

4.2. Controle biológico de doenças de plantas

Historicamente, o controle de doenças fúngicas em plantas esteve fortemente baseado no uso de produtos químicos, o que resultou em diversos problemas ambientais e de saúde humana. A contaminação do solo, da água e dos alimentos, a intoxicação de agricultores, o surgimento de patógenos resistentes aos princípios ativos dos fungicidas, o desequilíbrio biológico e a eliminação de microrganismos benéficos são algumas das consequências desse uso inadequado e intensivo de produtos sintéticos na agricultura (Boechat & Bettiol, 2009). Atualmente, o cenário tem mudado significativamente. A crescente preocupação com os impactos dos agrotóxicos no meio ambiente, a exigência por alimentos mais seguros e a ampla disseminação de informações têm contribuído para a conscientização sobre a importância do manejo integrado de doenças. Essa abordagem combina diferentes estratégias de controle, de forma mais sustentável e menos dependente de produtos químicos e outros insumos energéticos (Bettiol & Ghini, 2003). Dentre essas estratégias, destaca-se o controle biológico.

O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades da doença provocadas por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem” (Cook & Baker, 1983). De forma resumida, consiste no uso de organismos ou microrganismos não patogênicos para o controle de outros organismos patogênicos. Esse processo resulta da interação entre o patógeno, a planta hospedeira e outros microrganismos não patogênicos presentes no sítio de infecção, sob influência das condições ambientais e do homem (Amorim et al., 2018).

Diversos mecanismos de ação estão envolvidos no controle biológico, incluindo antibiose, competição, parasitismo, indução de resistência e promoção de crescimento de plantas. A antibiose refere-se à produção de uma ou mais moléculas com ação direta sobre o crescimento ou metabolismo dos fitopatógenos, sendo comum que um único microrganismo produza diferentes compostos bioativos (Ariza et al., 2012). A competição envolve a maior capacidade de crescimento ou colonização do agente de controle biológico em relação ao patógeno, podendo ocorrer disputa por espaço e por nutrientes essenciais (Sharma et al., 2009). Já o parasitismo se caracteriza pela colonização direta das estruturas do patógeno, geralmente associada à produção de enzimas hidrolíticas que degradam sua parede celular. Em alguns casos, os microrganismos atuam como predadores, capturando e digerindo o patógeno (Khan & Kim, 2005). A indução de resistência, por sua vez, é um mecanismo indireto, no qual o agente

de controle biológico estimula respostas de defesa nas plantas hospedeiras. Isso ocorre por meio da produção de moléculas sinalizadoras que são conhecidas por receptores específicos na planta, desencadeando uma cascata de sinalização que leva à expressão de genes relacionados à defesa ou a alterações morfofisiológicas que limitam a infecção (Medeiros et al., 2010). A promoção de crescimento é outro mecanismo importante, com efeito direto na planta hospedeira, favorecendo a absorção de água e nutrientes, além da produção de hormônios, que melhoram o vigor da planta e sua tolerância a estresses abióticos (Nadeen et al., 2014). É importante destacar que um mesmo organismo de biocontrole pode atuar por mais de um mecanismo simultaneamente.

Dentre os diversos microrganismos estudados e utilizados como agentes de controle biológico, destaca-se o gênero *Trichoderma*, amplamente conhecido por sua eficácia no manejo de inúmeras doenças de plantas, especialmente aquelas causadas por fungos habitantes do solo que produzem estruturas de resistência, como escleródios, clamidósporos e microescleródios, capazes de permanecer viáveis por longos períodos no ambiente.

4.3. *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico

O gênero *Trichoderma* é um fungo filamentoso amplamente estudado por sua capacidade como agentes de biocontrole de fitopatógenos e por seus efeitos benéficos no crescimento vegetal (Woo et al., 2023). *Trichoderma* utiliza múltiplas estratégias para o controle de fitopatógenos e, além de serem oportunistas, capazes de parasitar diversos substratos, também produzem estruturas de resistência, como clamidósporos e microescleródios, que favorecem sua sobrevivência em condições adversas (Monte et al., 2019). A eficácia dos mecanismos de ação depende do isolado utilizado, do patógeno-alvo, da cultura hospedeira e de fatores ambientais como temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes.

Os mecanismos de ação normalmente envolvidos no controle biológico são a antibiose (Martini et al., 2014; Farias et al., 2020), parasitismo (Santos et al., 2012); competição (Benítez et al., 2004) e indução de resistência (Abdelrahman et al., 2016). Também apresentam propriedades bioestimulantes, contribuindo para o crescimento vegetal por meio da promoção do desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, maior absorção de nutrientes e água, além de aumento da tolerância a estresses abióticos (Carvalho et al., 2011).

A antibiose ocorre por meio da produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana, como peptaibóis, poliquetídeos, pironas, terpenos e peptídeos não

ribossômicos, que atuam alterando a permeabilidade de membranas celulares, inibindo a atividade ribossômica e o crescimento das hifas do patógeno (Saldaña-Mendoza et al., 2023). Diversos isolados de *Trichoderma* são capazes de produzir inúmeros compostos, distribuídos em mais de 120 estruturas moleculares distintas, o que torna esse gênero uma das maiores fontes de diversidade metabólica do reino *Fungi* (Hermosa et al., 2014).

A competição entre *Trichoderma* e outros microrganismos ocorre por espaço, nutrientes, oxigênio, luz, nicho ecológico e outros recursos. Algumas espécies possuem tolerância às espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas na rizosfera, conferindo-lhes vantagem competitiva (Monte et al., 2019), além de apresentarem resistência a metabólitos fungistáticos produzidos pelas plantas (Moreno-ruiz et al., 2020).

Pelo menos 75 espécies de *Trichoderma* já foram relatados como capazes de parasitar fungos fitopatogênicos. O micoparasitismo ocorre em etapas: inicia-se com a detecção do patógeno por meio da ligação dos carboidratos de sua parede celular às lectinas de *Trichoderma*. Estudos apontam que o agente pode perceber a presença do fitopatógeno antes da interação e proliferar-se na direção dele. Ao percebê-lo, são emitidas exoquitinases que estimulam a formação de parede celular no fitopatógeno, isso culmina em uma interação com receptores presentes na parede celular ou membrana plasmática de *Trichoderma*, desencadeando a expressão de enzimas degradadoras de parede celular antes que o contato real entre os fungos seja feito. O passo seguinte é uma ação física com o desenvolvimento de apressórios, envolvimento e penetração das estruturas do alvo. As células fúngicas, compostas principalmente por β -1,3-glucano e quitinas são hidrolisadas pelas enzimas β -1,3-glucanases e quitinase que irão formar galerias, facilitando a penetração do apressório e o processo de micoparasitismo. Além disso, enzimas como α 1,3-glucanase e β 1,6-glucanase degradam proteínas das paredes dos conídios e micélio do fitopatógeno. Há ainda a inativação de enzimas essenciais ao fitopatógeno na colonização do tecido vegetal e a emissão de antibióticos fungiotóxicos, cerca de 30 genes, proteínas e metabólitos estão envolvidos no mecanismo de micoparasitismo (Sood et al., 2020).

A interação planta-*Trichoderma* é considerada simbiótica e benéfica para ambas as partes. O fungo é atraído por sinais químicos exsudados pelas raízes, e, ao se alimentar da sacarose da planta, contribui para a solubilização e absorção de nutrientes, além de promover o crescimento vegetal. Essa promoção ocorre, por exemplo, pela redução dos níveis de etileno e estímulo ao crescimento do sistema radicular, mediado pelo aumento de auxinas, o que melhora a tolerância a estresses abióticos. A resistência induzida é ativada a partir do reconhecimento dos padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) pelos receptores de

reconhecimento padrão (PRRs) da planta, desencadeando reações como deposição de calose e lignina, produção de metabólitos antimicrobianos, acúmulo de proteínas de defesa e de fitohormônios (Monte et al., 2019; Lo Presti et al., 2015; Alonso-Ramírez et al., 2014).

O estímulo ao desenvolvimento radicular, fundamental para a absorção de água e nutrientes, está relacionado à produção de fitohormônios como o ácido indol-3-acético (AIA). Além do AIA, estudos recentes demonstraram que *Trichoderma* secreta ácido antranílico, um composto que estimula o crescimento de raízes laterais (Chen et al., 2024). *Trichoderma* também promove o crescimento vegetal por meio da melhoria na absorção de nutrientes essenciais, como fósforo (P) e ferro (Fe). A disponibilidade de fósforo, frequentemente limitada em solos tropicais, é favorecida pela produção de ácidos orgânicos capazes de quelar cátions ligados ao fosfato, liberando formas disponíveis desse nutriente para as plantas, além da secreção de enzimas como fosfatases ácidas e alcalinas, que mineralizam compostos orgânicos, liberando fosfato inorgânico. Quanto ao ferro, *Trichoderma* produz sideróforos, moléculas quelantes que capturam o Fe^{3+} do ambiente e aumentam sua disponibilidade na rizosfera para as plantas e influencia positivamente a expressão de genes envolvidos no transporte de ferro nas plantas, além de modular o pH do solo, criando um ambiente mais favorável à absorção desses nutrientes (Altomare et al., 1999; Yedidia et al., 2001; Harman et al., 2004; Vinale et al., 2008; Pelagio-Flores et al., 2017). Outro efeito relevante está na mitigação de estresses abióticos, visto que estudos demonstram que a inoculação com *Trichoderma* aumenta a taxa de fotossíntese líquida, a condutância estomática, o teor de prolina e a eficiência no uso da água, além de modular o balanço hormonal em situações de estresse hídrico e salino, contribuindo significativamente para o crescimento de plantas em condições adversas (Oljira et al., 2020).

A eficiência de *Trichoderma* justifica sua ampla utilização na agricultura (Tyśkiewicz et al., 2022). Segundo Carvalho et al. (2015), os solos brasileiros apresentam alta diversidade de espécies do gênero, o que os torna promissores para a prospecção de isolados com potencial biotecnológico.

4.4. Identificação de *Trichoderma* spp.

A identificação de espécies do gênero *Trichoderma* envolve uma abordagem polifásica, utilizando características morfológicas, fisiológicas, ecológicas e moleculares. A avaliação morfológica deve considerar o cultivo em diferentes meios, sendo BDA (Batata Agar Dextrose), CMD (Corn Meal Dextrose Agar) e SNA (Synthetic Nutrient Agar) e sob temperaturas entre 20 e 25 °C e regimes de luz de 12 horas. Durante o crescimento, a colônia é observada quanto

à taxa e padrão de crescimento, coloração, produção de pigmentos e exsudados, além da emissão de conídios aéreos. A taxa de crescimento também é comparada entre diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 e 35 °C) e meios. Para a caracterização microscópica, recomenda-se a técnica de microcultivo em placas de Petri. As lâminas são preparadas de 2 a 3 dias após a incubação, utilizando-se ácido láctico a 60% ou KOH a 3%. São avaliadas medidas das fiálides, importantes marcadores morfológicos (Abreu & Pfenning, 2019), bem como conídios, clamidósporos e pústulas. Os caracteres fisiológicos baseiam-se na produção de enzimas ou metabólitos secundários específicos de determinadas espécies. Já as características ecológicas são utilizadas para avaliar a associação de espécies a nichos específicos, modos de vida e regiões geográficas (Hu et al., 2019).

Em meio de cultivo, o crescimento inicialmente é branco e cotonoso, seguido pela formação de pústulas ou círculos verdes ou amarelados de aspecto pulverulento, características marcantes do gênero. Os conidióforos apresentam arquitetura piramidal, com diferentes padrões de ramificação. As fiálides variam de ovais a subglobosas ou cilíndricas e alongadas, podendo diferir em número e na disposição ao longo do conidióforo. Os conídios, formados nas extremidades das fiálides, são unicelulares, esféricos, ovais ou alongados, geralmente verdes e se acumulam em massas compactas. Clamidósporos hialinos e intercalares também são comuns, especialmente em espécies como *T. asperellum* e *T. virens* (Meyer et al., 2019).

Devido à semelhança morfológica entre muitas espécies, o uso de técnicas moleculares é essencial para uma identificação precisa (Sales et al., 2019; Zin & Badaluddin, 2020). Diferentes marcadores permitem a distinção entre espécies diferentes, e, em alguns casos, entre isolados da mesma espécie (Muthumeenakshi et al., 1994). A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) permite amplificar segmentos de DNA por meio de primers específicos, aumentando exponencialmente a quantidade de DNA-alvo a cada ciclo (MADIGAN et al., 2016). As principais regiões genômicas utilizadas na análise filogenética incluem ITS1 e ITS2, os genes que codificam o fator de alongação da tradução 1-alfa (*tef1*), a subunidade maior da RNA polimerase II (*RPB2*) e a calmodulina (*CaM*), sendo os três últimos mais resolutivos filogeneticamente. O fragmento de *tef1*, amplificado com os primers EF1-728F (CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) e TEF1-LLErev (AACTTGCAGGCAATGTGG), tem sido amplamente utilizado na identificação e descrição de novas espécies (SALES et al., 2020). Também são utilizados os primers CAL-228F (GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC) e CAL737R (CATCTTTCTGGCCATCATGG) para amplificação do fragmento de calmodulina (Fonseca et al., 2021) e os primers FRPB2-5f (GAYGAYMGW GATCAYTTYGG) e FRPB2-7cR (CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT) para *RPB2* (Zhang et al., 2022).

Entre os principais marcadores moleculares aplicados estão RFLP, RAPD, ERIC, REP e BOX-PCR. Este último permite a comparação de padrões de bandas amplificadas com base na amplificação de sequências repetitivas conservadas, sendo útil também para análise de fungos. O primer utilizado é o BOX A1R (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG) (Alves et al., 2004; Aritua et al., 2007; Korvin et al., 2014).

4.4.1. Filogenia de *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma*, descrito por Christiaan Hendrik Persoon em 1794, pertence ao domínio *Eukaryota*, reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, subclasse *Hypocreomycetidae*, ordem *Hypocreales* e família *Hypocreaceae*. As primeiras espécies descritas foram *T. viride*, *T. aureum*, *T. nigrescens* e *T. roseum*. Em 1825, Elias Fries (Fr.) descreveu o gênero *Hypocrea* e, em 1939, os irmãos Ludovicus-Renatus Tulasne e Carolus Tulasne identificaram *T. viride* como anamorfo de *H. rufa*. Diante da dificuldade de diferenciação morfológica, Bisby propôs a utilização do nome *T. viride* para espécies com aparência típica do gênero.

Em 1969, Mien A. Rifai utilizou características morfológicas, como a disposição dos conidióforos, das fiálides e a características dos conídios, para agrupar as espécies em nove agregados: *T. aureoviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii* e *T. viride*. Posteriormente, Bisset (1984–1991) propôs uma nova classificação baseada em análises microscópicas e fisiológicas, reagrupando as espécies em cinco seções: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, *Hypocreanum*, além de linhagens solitárias, defendendo a existência de 27 espécies morfológicas (Sales et al., 2019).

Com os avanços das técnicas moleculares, a taxonomia do gênero passou por significativas transformações. Análises filogenéticas baseadas em sequências de ITS1 e ITS2, do gene 5.8S, do rRNA 28S (regiões D1 e D2), do rRNA mitocondrial, do *tef1* e um fragmento do gene que codifica a endoquitinase 42 (*ech42*), confirmaram a monofilia do gênero e das seções *Longibrachiatum* e *Trichoderma*, fornecendo bases filogenéticas para subdivisões das seções *Hypocreanum* e *Pachybasium* (Kullnig-Gradinger et al., 2002).

Druzhinina et al. (2005) propuseram o uso das regiões ITS como códigos de barras (barcodes) para identificação de espécies e desenvolveram uma plataforma on-line para esse fim. No entanto, essas regiões mostraram-se insuficientes para diferenciar espécies próximas,

especialmente diante do crescente número de novas descrições. Por isso, outras regiões genômicas foram incorporadas às análises (SALES et al., 2019).

Historicamente, para o gênero, duas nomenclaturas distintas eram utilizadas para nomeá-lo, associadas ao tipo de reprodução: *Trichoderma* para a fase assexuada (anamórfica ou imperfeita) e *Hypocrea* para a fase sexuada (teleomórfica ou perfeita) (Chaverri & Samuels, 2003; Kuhls et al., 1997). Contudo, após revisão do International Nomenclature Code (ICN), para fungos, algas e plantas, ficou estabelecido que fungos pleomórficos devem ter apenas um nome (Barrie et al., 2012). Assim, desde 2015, todas as espécies antes pertencentes a *Hypocrea* passaram a ser oficialmente reconhecidas como o gênero *Trichoderma*. Atualmente, são reconhecidas mais de 382 espécies caracterizadas molecular e morfológicamente (Cai et al., 2022). O gênero possui 10 seções/clados, que estão subdivididas em 24 subclados e 13 linhagens solitárias (Sales et al., 2019).

Nas últimas décadas, o uso de abordagens filogenéticas multilocus, aliado à análise morfológica e ao perfil metabólico, tem permitido a descrição de um número crescente de novas espécies de *Trichoderma*. Muitas dessas espécies recém-descritas têm demonstrado elevado potencial biotecnológico, com destaque para ação antifúngica. Assim, a contínua identificação e caracterização de novas espécies de *Trichoderma* não apenas contribui para organização da taxonomia do grupo, mas também amplia o número de recursos genéticos disponíveis para aplicações agrícolas e industriais.

5. METODOLOGIA

5.1. Obtenção e manutenção dos fitopatógenos e de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos de serapilheira, solo de mata, caule, folhas e raízes de espécies florestais e de videira, bem como de solo de cultivo de café. As coletas foram realizadas nos municípios de Aguanil, Caldas, Lavras, Patrocínio, Catas Altas e Itatiaia, no estado de Minas Gerais. O isolamento foi realizado por três métodos distintos. O método indireto, consistiu na desinfestação superficial do material vegetal com álcool 70% por 30 segundos, seguido por hipoclorito de sódio a 1,5% por 2 minutos e tríplice lavagem em água destilada esterilizada (Lima, 2011). O método de câmara úmida, baseou-se no acondicionamento do material vegetal em recipientes úmidos, mantidos em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por aproximadamente sete dias, com posterior plaqueamento das colônias fúngicas desenvolvidas (Bernardo et al., 2019). O método de diluição seriada, foi utilizado para as amostras de solo, sendo realizado o plaqueamento da diluição 10^{-4} em meio semisseletivo de Martin (Valadares-Inglis et al., 2017).

Após o crescimento de colônias características, estas foram purificadas e as estruturas foram observadas sob microscópio ótico na objetiva de 40x, para confirmação. Os isolados obtidos foram preservados em glicerol a 20%, a -20 °C, e em discos de micélio e de papel filtro, conforme a metodologia descrita por Challen e Elliot (1986). Os isolados dos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Agroathelia rolfsii* foram obtidos a partir da coleção do Laboratório de Fitopatologia Molecular (FitoMol), do Departamento de Fitopatologia (DF) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

5.2. Extração de DNA dos isolados de *Trichoderma* spp.

A extração de DNA fúngico foi realizada utilizando o método CTAB, conforme protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados por 2 a 3 dias em placas de Petri contendo meio BD (Batata Dextrose). Após o crescimento, os micélios foram coletados com papel filtro até secagem. Cerca de 150 mg de micélio foram transferidos para cadinhos, onde foram macerados em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. Esse material foi transferido para microtubos de 2 mL, adicionando 2 mL de tampão Sorbitol adicionado de 1% de β -mercaptoetanol, homogeneizado em vórtex por cinco segundos e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado, e os sedimentos

foram ressuspensos com 800 µL de tampão CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide), pré-aquecido a 65 °C e também contendo 1% de β-mercaptoetanol. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 30 minutos, sendo agitados por inversão a cada 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente por 5 minutos, adicionaram-se 700 µL de solução CIA (clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1), seguido de agitação em vórtex por 10 segundos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos microtubos. Adicionou-se 0,66 volumes de isopropanol gelado ao sobrenadante, misturando-se por inversão. As amostras foram mantidas a -20 °C por 1 hora e, posteriormente, centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e os microtubos foram deixados invertidos, com as tampas abertas, sobre papel toalha estéril para secagem. O pellet resultante foi lavado com 700 µL de etanol 70% e centrifugado por 1 minuto a 12.000 rpm. Após secagem, o pellet foi ressuspenso em 30 µL de água Milli-Q, incubado a 37 °C por 30 minutos e armazenado sob refrigeração até a quantificação. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%, corado com azul de bromofenol e visualizado sob luz ultravioleta.

5.3. BOX-PCR para agrupamento dos isolados

Com o objetivo de avaliar a diversidade genética da coleção de isolados e auxiliar nas análises filogenéticas, foi realizada a técnica de BOX-PCR, conforme metodologia descrita por Abbasi et al. (2016), utilizando o primer BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, em termociclador. A mistura principal foi composta por: 15,95 µL de água ultrapura estéril, 2,5 µL de tampão (10× tampão PCR) 0,3 µL Taq Polimerase (5 unidades.µL⁻¹), 0,75 µL (50 mM) de MgCl₂, 2 µL (10 µM) do primer e 3 µL (30 ng) do DNA modelo. Para o controle negativo, o DNA foi substituído por 3 µL de água ultrapura estéril. A reação ocorreu a uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min seguida de 30 ciclos de 95°C por 1 min; 55°C por 45 seg; 72°C por 1:30 min. Os ciclos foram seguidos por ciclo único a 72°C por 5 min. Os produtos do BOX-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), corado com GelRed em cuba de eletroforese a 70 V por 160 minutos e marcador de DNA Biocell de 1kb. As bandas foram visualizadas em transluminador de luz ultravioleta (UV) e os padrões de bandas registrados para cada isolado. O agrupamento dos isolados foi realizado no *software* R, utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) com base no coeficiente de similaridade de Jaccard. Os grupos BOX foram formados com perfis de 100% de similaridade.

5.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético

Foram selecionados isolados representativos, sendo um de cada grupo formado na análise de BOX-PCR que continha mais de um isolado, para identificação molecular por meio de sequenciamento genético. Foi realizada a PCR da região dos genes que codificam o fator de alongação 1α da RNA polimerase (*tef1- α*), utilizando os primers TEF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG-3') e TEF1-LLE (5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3'). As reações de PCR foram conduzidas conforme descrito por Gezgin et al. (2023), com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C 3 min, 94 °C por 30 s, 59 °C 1 min, 35 ciclos 74 °C 50 s, 74 °C 7 min 4 °C. O resultado da PCR foi quantificado em gel de agarose 0,8% com GelRed em transluminador UV e enviados para sequenciamento genético. As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis na base de dados do GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), utilizando a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para identificação das espécies com base na similaridade das sequências de nucleotídeos com espécies tipo do gênero *Trichoderma*. Além disso, foi realizado o alinhamento múltiplo entre as sequências obtidas e aquelas recuperadas dos bancos de dados, para posterior análise filogenética. A reconstrução filogenética foi conduzida com o método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood), utilizando o programa MEGA X.

5.5. Teste de micoparasitismo de escleródios de *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *A. rolfsii*

Os escleródios utilizados nos ensaios foram produzidos em laboratório. Para a obtenção de estruturas de *R. solani*, discos miceliais foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e incubados em BOD a 25 °C por aproximadamente 15 dias. A produção de escleródios de *S. sclerotiorum* e *A. rolfsii* seguiu a metodologia descrita por Garcia et al. (2012). Para *S. sclerotiorum*, foram autoclavados 100 g de feijão umedecido, acrescidos de 20 g de fubá e 15 mL de água. No dia seguinte, foram adicionados discos miceliais do patógeno, e os frascos foram incubados a 25 °C por cerca de 25 dias, com agitação nos primeiros dias. Para *A. rolfsii*, foram utilizados frascos contendo 100 g de cenoura com casca esterilizada, aos quais foram adicionados discos miceliais, mantendo-se a incubação a 25 °C por 30 dias. As estruturas formadas em substratos vegetais foram lavadas em água corrente e submetidas à desinfestação

superficial em álcool 70% por 30 s, hipoclorito de sódio a 1,5% por 2 min e três lavagens subsequentes em água estéril. Posteriormente, os escleródios foram secos em papel filtro.

Nos testes de micoparasitismo, foram distribuídos 10 escleródios de cada patógeno por placa de Petri contendo papel filtro estéril umedecido. Sobre cada escleródio, foi aplicada uma gota ($\sim 8 \mu\text{L}$) da suspensão de *Trichoderma* spp. padronizada para $1,0 \times 10^7$ conídios mL^{-1} . As testemunhas receberam apenas água destilada esterilizada. As placas foram incubadas a 25°C por 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas. Cada experimento foi composto por 10 tratamentos e quatro repetições, totalizando 10 escleródios por repetição. Os tratamentos foram constituídos de 10 isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 1).

Após o período de incubação, os escleródios foram submetidos à desinfestação superficial, pressionados com auxílio de pinça estéril e transferidos para placas contendo meio BDA (*R. solani*) e meio Neon-S (*S. sclerotiorum* e *A. rolfsii*), conforme descrito por Meyer et al. (2019) e Napoleão et al. (2006). As placas foram incubadas a 25°C , sob fotoperíodo de 12 horas, por 5 dias, visando à análise da colonização micelial fúngica e à viabilidade dos escleródios.

5.6. Avaliação de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *R. solani* em feijão

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando vasos de 700 mL preenchidos com uma mistura de solo e substrato comercial (1:1). O solo foi previamente infestado com *R. solani* na proporção de 5 g de arroz colonizado por litro de solo, conforme Patricio et al. (2000). O tratamento controle não recebeu a adição do patógeno. Após 24 horas da infestação, foram semeadas cinco sementes de feijão comum previamente desinfestadas (Brasil, 2009) por vaso. Os tratamentos consistiram na aplicação de 1 mL da suspensão de *Trichoderma* spp. (1×10^7 conídios mL^{-1}) diretamente sobre cada semente no momento da semeadura. O delineamento experimental contou com 10 isolados de *Trichoderma* spp., um controle positivo (com patógeno, sem tratamento de sementes) e um controle negativo (sem patógeno e sem tratamento de sementes), totalizando 12 tratamentos (Tabela 1), com oito repetições e cinco plantas por repetição, totalizando 40 plantas por tratamento.

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento de controle de *Rhizoctonia solani* em feijoeiro por *Trichoderma* spp.

Código	Espécie
CP	Solo infestado com <i>R. solani</i> , sem tratamento de sementes
CN	Solo não infestado com <i>R. solanj</i> , sem tratamento de sementes
LFM0066	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0044	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0013	<i>T. zelobreve</i>
LFM00102	<i>T. anisohamatum</i>
LFM0027	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM005	<i>T. zelobreve</i>
LFM0077	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0081	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM008	<i>T. amoenum</i>
LFM0085	<i>T. pseudoasperelloides</i>

A partir do quinto dia após a semeadura (DAS), foi realizado a avaliação da porcentagem de emergência das plântulas e da incidência de sintomas. Aos 12 DAS, foi realizada a mensuração do comprimento da parte aérea e do sistema radicular, bem como a avaliação da severidade da doença. A severidade foi estimada por meio da escala de notas proposta por Goulart (2022), considerando os seguintes graus de infecção: 0 = plântulas saudias; 1 = lesão leve (única lesão, $\leq 0,5$ cm, no coleto, coloração marrom-avermelhada, alongada e deprimida, pequena); 2 = lesão moderada (0,5–2 cm, uma ou mais, no hipocótilo e/ou raiz, coloração marrom-avermelhada, lesões alongadas e deprimidas); 3 = lesão severa (≥ 2 cm, extensa, com constrição, afetando hipocótilo e raiz, coloração marrom-avermelhada). Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do índice da doença/severidade, adotando-se a fórmula proposta por McKinney, 1923:

$$ID(\%) = \sum ((fx \ v)) / ((n \ x \ X)) \times 100$$

Onde:

ID = índice de doença; f = número de plantas com determinada nota; v = grau de infecção (nota); n = número total de plantas avaliadas; x = nota máxima da escala empregada.

Para estimar a incidência da doença foi realizada a leitura do número de plantas doentes na primeira e na última avaliação e calculado o índice de velocidade de incidência (IVI) adotando-se a fórmula de Magüire (1962):

$$IVI = (I1/N1) + (I2/N2) + \dots + (IN/Nn)$$

Onde:

IVI= Índice de velocidade de incidência; N1 = número de dias para a primeira contagem; I1 = número de plântulas com sintomas na primeira contagem; N2 = número de dias para a segunda contagem; I2 = número de plântulas com sintomas na segunda contagem; Nn= número de dias para a última contagem; IN = número de plântulas com sintomas na última contagem (De Medeiros Câmara et al., 2019).

Da mesma maneira, foram observadas o número de plantas emergidas na primeira e última avaliação e feito o cálculo do índice de velocidade de emergência (IVE) utilizando a fórmula de Magüire, 1962:

$$IVE = (E1/N1) + (E2/N2) + \dots + (EN/Nn)$$

Onde:

IVE= Índice de velocidade de emergência; N1 = número de dias para a primeira contagem; E1 = número de plântulas emergidas na primeira contagem; N2 = número de dias para a segunda contagem; E2 = número de plântulas emergidas na segunda contagem; Nn = número de dias para a última contagem; EN = número de plântulas emergidas na última contagem (De Medeiros Câmara et al., 2019).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o *software* estatístico R (R Core Team, 2013).

6. RESULTADOS

6.1. Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos

Foram obtidos 98 isolados de *Trichoderma* spp. Do total, 42 isolados foram coletados de áreas de produção de café na cidade de Patrocínio e cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA; 23 isolados foram extraídos de solo durante a estação seca e chuvosa, também do município de Patrocínio; 14 isolados foram obtidos de plantas de videira na EPAMIG Enologia e Viticultura, em Caldas; 12 isolados foram de áreas de mata da UFLA; 5 isolados foram do município de Aguanil (Anexo 1).

6.2. BOX-PCR, PCR e sequenciamento genético

Os 98 isolados de *Trichoderma* spp. foram reunidos em 58 grupos BOX com base em nove bandas polimórficas. Do total, 58,51% pertenciam a grupos com mais de um isolado e 41,4% a grupos de um único isolado (Figura 1).

Foram selecionados 20 isolados representativos de *Trichoderma* spp. dos diferentes grupos BOX. Esses isolados foram obtidos de diferentes fontes de isolamento, abrangendo os municípios de Patrocínio, Lavras e Caldas. A identificação molecular, baseada em análises de sequências do gene *tef-1 α* , revelou seis espécies distintas entre os isolados: *T. pseudoasperelloides*, *T. zelobreve*, *T. anisohamatum*, *T. amoenum*, *T. linzhiense*, *T. subuliforme*. Dentre essas, duas são possíveis novas espécies, *T. pseudoasperelloides* e *T. linzhiense*, pois os valores de indentidade foram inferiores a 99% (Tabela 2). *Trichoderma pseudoasperelloides* foi a espécie mais frequente, sendo 13 dos 20 isolados, obtidos de diferentes tipos de solo e condições de cultivo. Os resultados evidenciam não existir relação entre os grupos BOX e a origem dos isolados (Tabela 2).

Figura 1. Diversidade genética de 98 isolados de *Trichoderma* por meio de análise de BOX-PCR com 18 bandas polimórficas. O DNA foi extraído, amplificado com o primer BOX-AR1, visualizado em gel de agarose e as bandas foram transformadas em uma matriz de presença e ausência. A análise de agrupamento foi feita pelo método de UPGMA e distância de Jaccard.

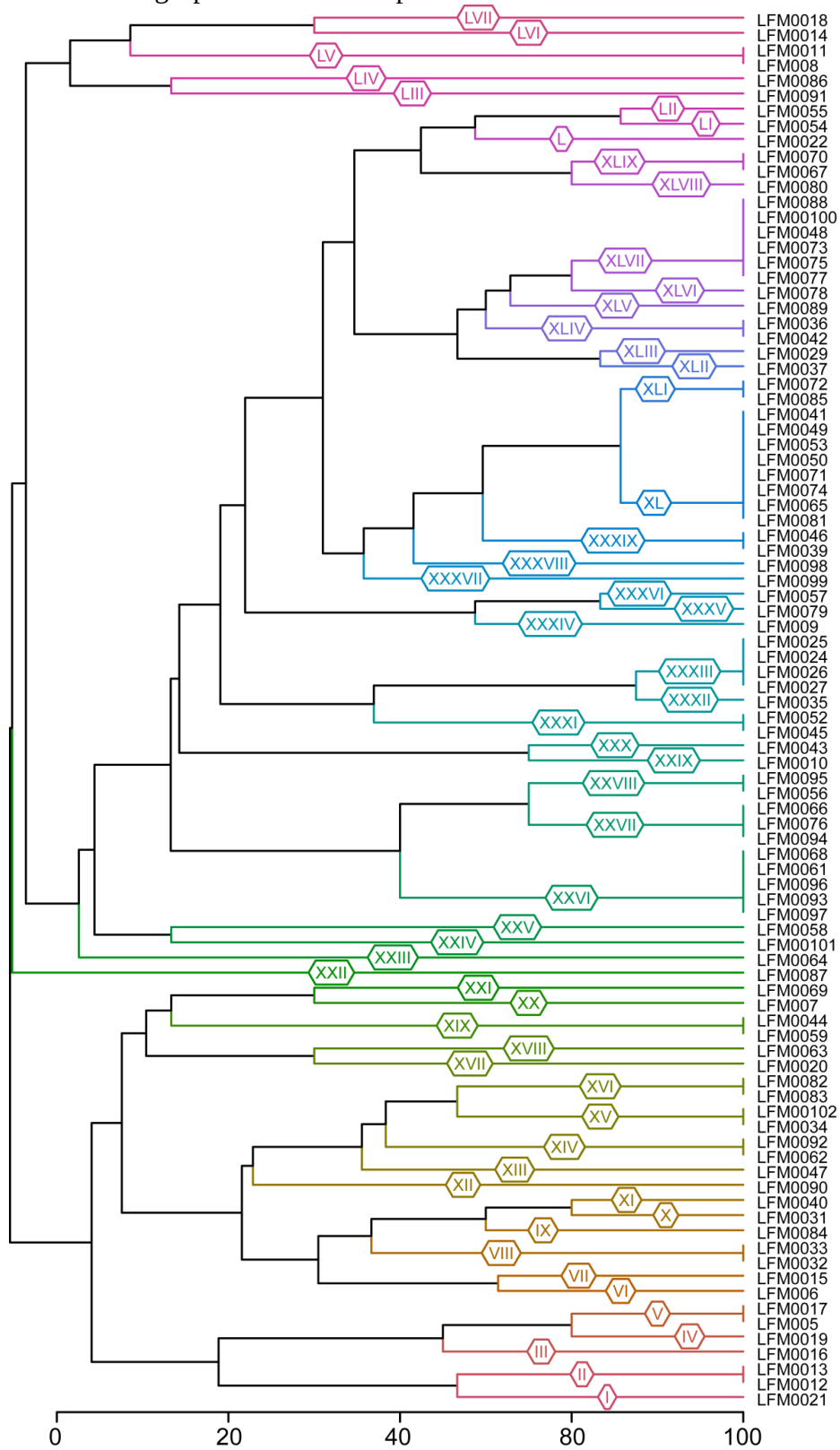


Tabela 2. Identificação ao nível de espécie de isolados de *Trichoderma* representantes de 20 grupos BOX com base na análise de sequências do gene *tef-1α*.

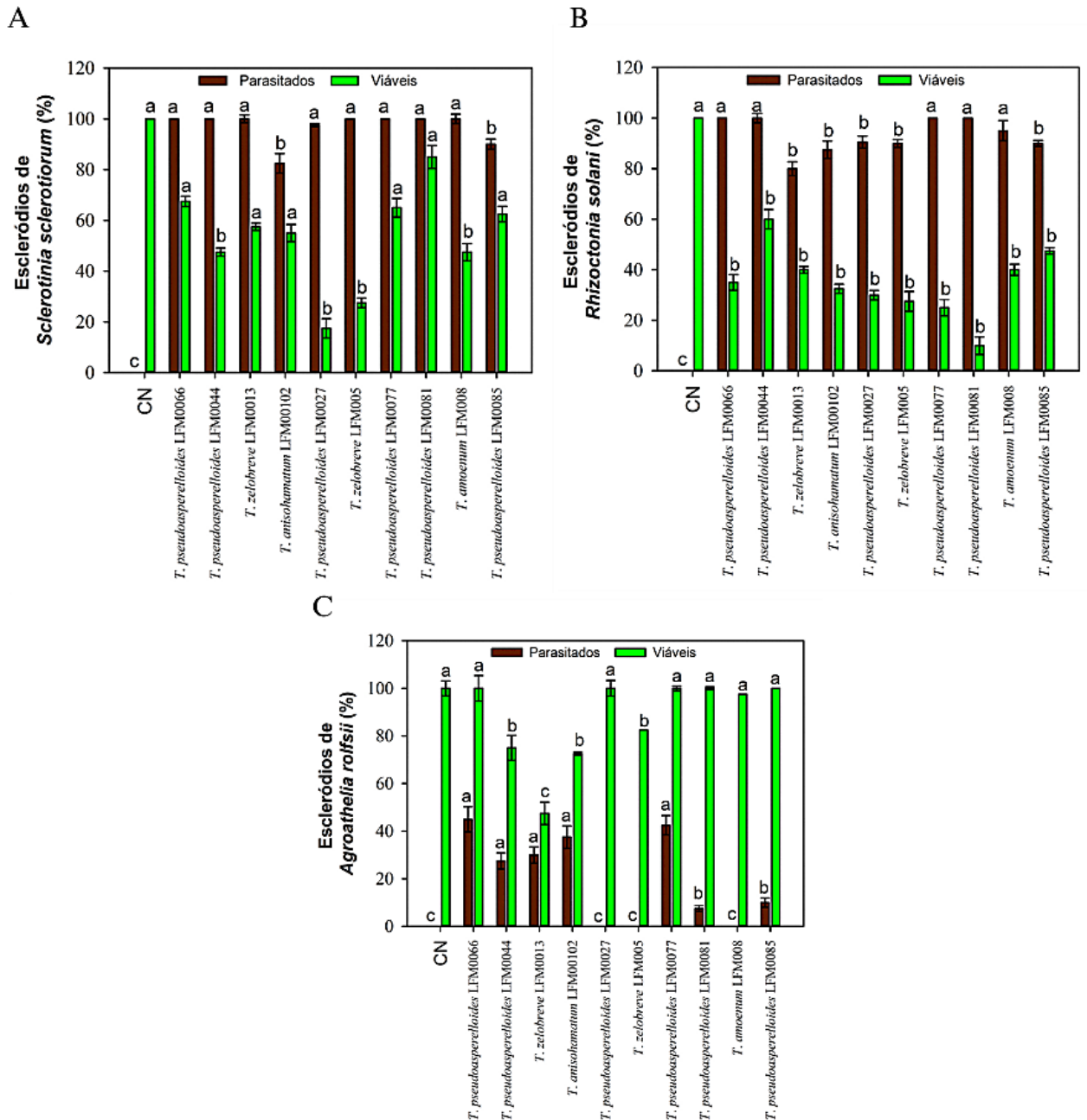
Código	Fonte de isolamento	Local de origem	Identidade (%)	Grupo BOX	Espécie
LFM0066	Solo/café convencional	Patrocínio/MG	98,74	27	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0044	Solo/estação seca	Patrocínio/MG	98,74	19	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0013	Solo/mata	Lavras/MG	99,75	2	<i>T. zelibreve</i>
LFM00102	Solo/café convencional	Caldas/MG	99,59	15	<i>T. anisohamatum</i>
LFM0027	Planta/videira	Caldas/MG	98,74	33	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM005	Casca/espécie florestal	Lavras/MG	99,75	5	<i>T. zelibreve</i>
LFM0077	Solo/café convencional	Patrocínio/MG	98,88	47	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0081	Solo/café orgânico	Lavras/MG	98,88	20	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM008	Cascas/eucalipto	Lavras/MG	99,17	55	<i>T. amoenum</i>
LFM0085	Solo/café convencional	Patrocínio/MG	98,88	41	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0062	Solo/café orgânico	Caldas/MG	99,59	14	<i>T. anisohamatum</i>
LFM0032	Planta/videira	Patrocínio/MG	98,62	8	<i>T. linzhiense</i>
LFM0083	Solo/café orgânico	Patrocínio/MG	99,30	16	<i>T. subuliforme</i>
LFM0042	Solo/estação seca	Patrocínio/MG	98,88	44	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0096	Solo/café orgânico	Patrocínio/MG	98,88	26	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0045	Solo/estação chuvosa	Patrocínio/MG	98,74	31	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0039	Solo/estação chuvosa	Patrocínio/MG	98,74	39	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0056	Solo/estação seca	Patrocínio/MG	98,74	28	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0067	Solo/café orgânico	Patrocínio/MG	98,74	49	<i>T. pseudoasperelloides</i>
LFM0089	Mata/café orgânico	Patrocínio/MG	98,74	45	<i>T. pseudoasperelloides</i>

6.3. Micoparasitismo de escleródios de *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *A. rolfsii*

Todas as espécies de *Trichoderma* testadas foram capazes de parasitar escleródios de *S. sclerotiorum*, com percentuais de parasitismo variando entre 82,5% e 100%. Em relação à viabilidade desses escleródios após o tratamento, observou-se uma redução considerável, destacando-se *T. pseudoasperelloides* LFM0027, com apenas 17,5% de viabilidade (Figura 2A). Para *R. solani*, o parasitismo também foi elevado, variando de 80% a 100%, com destaque para *T. pseudoasperelloides* LFM0081, que apresentou 100% de parasitismo e viabilidade reduzida a 10% (Figura 2B). Quanto aos escleródios de *A. rolfsii*, os percentuais de parasitismo foram mais baixos em comparação aos outros patógenos, variando de 0% a 45%. A viabilidade apresentou valores mais baixos em resposta aos tratamentos quando comparada com o

parasitismo. As taxas de viabilidade variaram entre 47,5% e 100% e *T. zelibreve* LFM0013 apresentou os reduziu a viabilidade para 47,5% (Figura 2C).

Figura 2. Percentagem de parasitismo e da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (A) *Rhizoctonia solani* (B) e *Agroathelia rolfsii* (C) em resposta à inoculação com diferentes espécies de *Trichoderma* spp.



6.4. Controle de *R. solani* em feijoeiro

Os resultados da Tabela 3 indicam diferenças significativas entre os tratamentos com relação à primeira contagem de emergência (PCE), índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência final (E%) de plântulas de feijão cultivadas em solo infestado com *R. solani* e tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. Os valores de PCE variaram de 10% a 42,5%, com destaque para *T. pseudoasperelloides* LFM0081 e *T. anisohamatum* LFM00102, com médias de 42,5% e 40%, respectivamente. O índice de velocidade de emergência (IVE) variou de 0,45 a 0,90, sendo as maiores médias observadas com tratamento de *T. pseudoasperelloides* LFM0085, *T. pseudoasperelloides* LFM0081 e *T. anisohamatum* LFM00102. A porcentagem final de emergência (E) também apresentou variação expressiva, com valores entre 55% e 95%. Os isolados de *T. anisohamatum* LFM00102 e *T. pseudoasperelloides* LFM0085 apresentaram os melhores desempenhos, com média de 85% e 95% de emergência final, respectivamente. De modo geral, entre os isolados testados, destacaram-se *T. pseudoasperelloides* LFM0081 e *T.*

Tabela 3. Primeira contagem de emergência (PCE), índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência (E) de plântulas de feijão comum cultivadas em solo previamente infestado com *Rhizoctonia solani* e tratadas com diferentes espécies de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	PCE (%)	IVE	E (%)
CP	12,5c	0,55b	67,5b
CN	60a	0,88a	95a
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0066	25b	0,65b	75b
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0044	22,5b	0,45b	55c
<i>T. zebrevae</i> LFM0013	32,5b	0,66b	75b
<i>T. anisohamatum</i> LFM00102	40a	0,74a	85a
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0027	37,5b	0,66b	77,5b
<i>T. zebrevae</i> LFM0005	32,5b	0,62b	72,5b
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0077	22,5b	0,60b	72,5b
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0081	42,5a	0,77a	87,5a
<i>T. amoenum</i> LFM0008	30b	0,65b	75b
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0085	10c	0,90a	95a

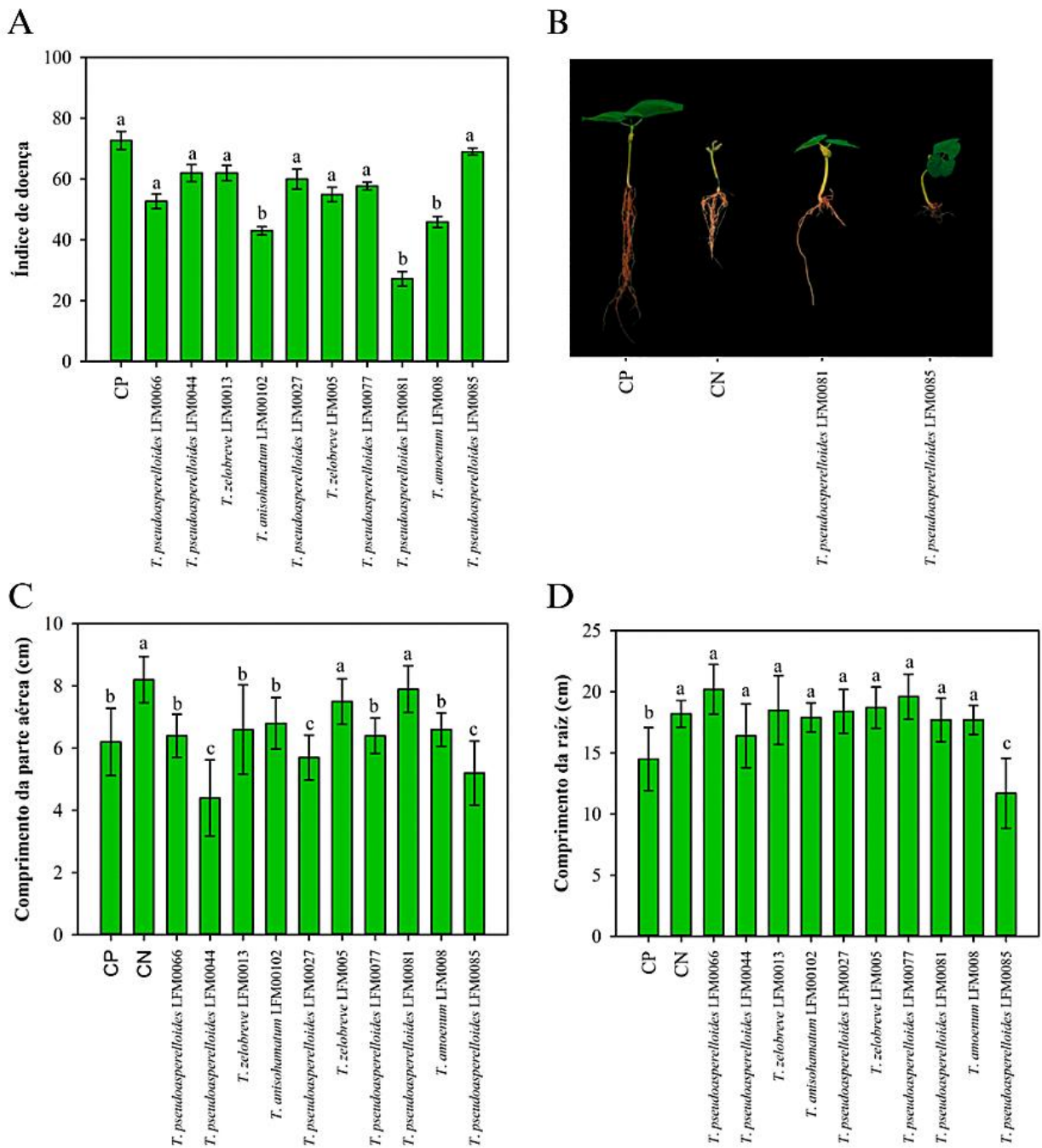
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade.

CP: Controle positivo (solo infestado com *R. solani*, sem tratamento com *Trichoderma* spp.); CN: Controle negativo (solo não infestado com *R. solani*).

anisohamatum LFM00102, os quais também apresentaram valores significativamente elevados de PCE (42,5% e 40%, respectivamente), IVE (0,77 e 0,74) e emergência (87,5% e 85%).

A avaliação do índice de doença por meio da escala de notas de Goulart, 2022, destacou *T. pseudoasperelloides* LFM0081, *T. anisohamatum* LFM00102 e *T. pseudoasperelloides* LFM008 como os melhores tratamentos, com valores de 27,2; 43 e 45,9%, respectivamente. Todos os demais tratamentos não diferiram do controle positivo (Figura 3A). Visualmente os efeitos dos tratamentos sobre o desenvolvimento das plântulas confirmou esses resultados (Figura 3B). Os tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. influenciaram significativamente o comprimento da parte aérea das plântulas de feijão cultivadas em solo infestado com *R. solani*. Os isolados *T. pseudoasperelloides* LFM0081 e *T. zebreviae* LFM005 proporcionaram as maiores médias de crescimento da parte aérea, com valores de 7,9 cm e 7,5 cm, respectivamente. (Figura 3C). Com relação ao comprimento da raiz, com exceção do isolado *T. pseudoasperelloides* LFM0085, todos os demais tratamentos apresentaram desempenho superior ao do controle positivo (solo infestado com *R. solani*, sem tratamento com *Trichoderma* spp.), com médias variando de 16,4 cm a 20,2 cm (Figura 3D).

Figura 3. Índice de doença (A), aspecto visual das plantas (B), comprimento da parte aérea (C) e da raiz (D) de feijoeiro tratadas com diferentes espécies de *Trichoderma* no controle de *R. solani*.



Para primeira contagem de incidência (PCI), os menores valores foram observados nos tratamentos com *T. pseudoasperelloides* LFM0085 e *T. zelobreve* LFM0013, ambos com 0%. Para o índice de velocidade de incidência (IVI) e incidência final (IF), os tratamentos apresentaram valores semelhantes ao controle positivo, com exceção de *T. pseudoasperelloides*

LFM0081, que apresentou menor incidência final (25%), demonstrando maior eficácia no controle da doença ao longo do tempo (Tabela 4).

Quanto a primeira contagem de tombamento (PCT), com exceção de *T. pseudoasperelloides* LFM0027 que apresentou 2,5%, todos os demais tratamentos não apresentaram tombamento (0%), sugerindo efeito protetor desses isolados. Na porcentagem de tombamento final (PT), *T. pseudoasperelloides* LFM0085 destacou-se por apresentar 0% de tombamento nas amostras analisadas, seguido de *T. zelibreve* LFM005 e *T. pseudoasperelloides* LFM0077 (ambos com 2,5%), valores significativamente inferiores ao CP (17,5%). Para o índice de velocidade de tombamento (IVT), não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Primeira contagem de incidência (PCI), índice de velocidade de incidência (IVI) e incidência final (IF), primeira contagem de tombamento (PCT), índice de velocidade de tombamento (PCT) e porcentagem de tombamento (PT) em plantas de feijão tratadas com diferentes espécies de *Trichoderma* spp. e submetidas à inoculação com *Rhizoctonia solani*.

Tratamentos	PCI (%)	IVI	IF (%)	PCT (%)	IVT	PT (%)
CP	2,5b	0,43a	60a	2,5b	0,13a	17,5a
CN	0c	0c	0c	12,5a	0,14a	15a
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0066	7,5b	0,32a	42,5a	0c	0,10a	15a
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0044	20a	0,33a	40a	0c	0,13a	17,5a
<i>T. zelibreve</i> LFM0013	0c	0,35a	47,5a	0c	0,12a	17,5a
<i>T. anisohamatum</i> LFM00102	15a	0,33a	35a	0c	0,07a	10a
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0027	15a	0,54a	62,5a	2,5b	0,10a	12,5a
<i>T. zelibreve</i> LFM005	5b	0,42a	50a	0c	0,01a	2,5b
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0077	2,5b	0,26a	42,5a	0c	0,02a	2,5b
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0081	2,5b	0,17b	25b	0c	0,10a	15a
<i>T. amoenum</i> LFM008	2,5b	0,30a	40a	0c	0,15a	22,5a
<i>T. pseudoasperelloides</i> LFM0085	0c	0,37a	42,5a	0c	0a	0c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade.

CP: Controle positivo (solo infestado com *R. solani*, sem tratamento com *Trichoderma* spp.); CN: Controle negativo (solo não infestado com *R. solani*).

7. DISCUSSÃO

O gênero *Trichoderma*, com mais de 300 espécies descritas, é cosmopolita e normalmente encontrado em madeira e cascas mortas, outros fungos, no solo e e como endófito em raízes, caules e folhas de plantas saudáveis (Cai & Druzhinina, 2020; Mukherjee et al., 2013). Na presente pesquisa, a obtenção de 98 isolados de *Trichoderma* spp. coletadas de amostras de solo, madeira e material vegetal de diferentes localidades de Minas Geras demonstra a ampla distribuição e diversidade desses microrganismos nos solos agrícolas e naturais. A formação de 58 perfis genéticos distintos pelo BOX-PCR indica elevada variabilidade genética entre os isolados, mesmo em amostras obtidas de uma mesma localidade, reforçando a importância de abordagens moleculares para seleção de isolados com potencial biotecnológico. A identificação molecular com base no gene *tef-1α* revelou 6 espécies, sendo *T. pseudoasperelloides* a mais frequente e composta tanto por isolados oriundos de amostras de solo quanto endofíticos. Zheng et al. (2021) descreveu a espécie isolando-a de amostras de folhas vivas de *Myriophyllum spicatum* e da rizosfera de plantas de tabaco na província de Yunnan na China. As espécies *T. zebrevae* e *T. anisohamatum* também foram frequentes entre os isolados. Essas espécies foram descritas a partir de isolados obtidos de corpos de frutificação de *Lentinula* e de solo, respectivamente (Gu et al., 2020; Zheng et al., 2021). No entanto, neste estudo, ambas também foram encontradas como endófitas em plantas saudáveis. Esses resultados evidenciam a diversidade, adaptabilidade e ampla distribuição das espécies de *Trichoderma*.

Trichoderma pseudoasperelloides e *T. linzhiense* são possíveis novas espécies, pois as porcentagens de identidade foram consideradas baixas. No entanto, o sequenciamento de outras regiões deve ser feito no futuro para confirmar essa hipótese.

Nos ensaios de micoparasitismo, os isolados de *T. pseudoasperelloides* obtiveram bons resultados, especialmente no parasitismo de escleródios de *R. solani* e *S. sclerotiorum*. Para *A. rolfsii*, *T. zebrevae* LFM0013, destacou-se por promover maior inviabilidade dos escleródios, quando comparado aos demais tratamentos. Esses resultados são compatíveis com os encontrados por Nouriam et al. (2024), que evidenciaram o potencial de *T. zebrevae* no controle de *Diplodia bulgarica*. Além disso, Bhagat et al. (2014) demonstraram que *T. viride*, pertencente ao mesmo clado de *T. zebrevae*, apresentou atividade volátil contra sete fungos fitopatogênicos, incluindo *A. rolfsii*, inibindo o crescimento micelial em 40,68% e a produção de escleródios em 48,1%. Além disso, os resultados confirmaram a hipótese inicial de que *Trichoderma* apresenta especificidade em sua capacidade de parasitar escleródios de fungos de

diferentes espécies. Enquanto, de modo geral, os isolados testados apresentaram índices de parasitismo de escleródios relativamente altos para *S. sclerotiorum* e *R. solani*, o parasitismo de escleródios de *A. rolfsii* foi baixo. Essas diferenças de especificidade provavelmente se devem à conformação morfológica dos escleródios formados por diferentes espécies de fungos. Os escleródios de *R. solani* apresentam uma estrutura menos compacta e uma menor concentração de melanina quando comparados com os escleródios de *S. sclerotiorum* e de *A. rolfsii*. Apesar de *S. sclerotiorum* e *A. rolfsii* apresentarem uma camada de melanina visível e serem aparentemente resistentes, os isolados de *Trichoderma* mostraram menores índices de parasitismo em escleródios de *A. rolfsii*. Esses baixos índices comparativos podem ser explicados pela estrutura mais compacta de escleródios dessa espécie, quando comparada com *S. sclerotiorum* (Benhamou & Chet, 1996; Silva et al., 2022; Rembinski et al., 2022).

Nos ensaios *in vivo*, observou-se que isolados como *T. pseudoasperelloides* LFM0081 e *T. anisohamatum* LFM00102 promoveram maior emergência e crescimento das plântulas de feijão em solo infestado com *R. solani*. Esses dados indicam que, além do efeito antagonista, esses isolados atuam também como bioestimulantes, possivelmente via produção de metabólitos promotores de crescimento, como auxinas e sideróforos, já descritos para o gênero (Meyer et al., 2019). A redução do tombamento e da incidência final da doença nesses tratamentos indica ação eficiente na proteção das plantas, o que é essencial para o estabelecimento da cultura. O destaque de *T. pseudoasperelloides* LFM0085, que apresentou 0% de tombamento final, reforça seu potencial como agente de biocontrole.

Apesar de serem escassos os estudos sobre *T. pseudoasperelloides*, a espécie pertence ao clado *Longibrachiatum*, conhecido por compreender diversas espécies produtoras de enzimas celulolíticas e alta capacidade de degradação de substratos celulósicos (De Abreu et al., 2019; Bezerra et al., 2018). Além disso, são capazes de crescer rapidamente, esporular a temperaturas elevadas (até 40°C) e atuar como patógenos oportunistas em indivíduos com imunossupressão (Druzhinina et al., 2008, Sandoval-Denis et al., 2014). O clado compreende espécies produtoras de metabólitos antimicrobianos que induzem resistência nas plantas (Mukherjee; Horwitz; Kenerley, 2012). Ainda segundo Druzhinina et al., 2018, estudos ecofisiológicos demonstram que todas as espécies de *Trichoderma*, em maior ou menor grau, são eficazes no parasitismo de fungos fitopatogênicos e oomicetos.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo não apenas confirmam a eficácia de isolados de *Trichoderma spp.* no controle de patógenos de solo, como também revelam espécies promissoras e pouco exploradas, capazes de atuar em múltiplos mecanismos de ação contra a doença e promoção do crescimento vegetal.

8. CONCLUSÕES

Os estudos de diversidade genética mostraram que 98 isolados de *Trichoderma* spp. estão distribuídos em 58 grupos BOX. A identificação molecular de 20 isolados representativos revelou seis espécies: *T. pseudoasperelloides*, *T. zelobreve*, *T. anisohamatum*, *T. amoenum*, *T. linzhiense* e *T. subuliforme*. Possivelmente, os isolados de *T. linzhiense* e *T. pseudoasperelloides* representam novas espécies.

Trichoderma apresentou especificidade no parasitismo de escleródios de diferentes espécies, com menores índices de parasitismo em escleródios de *A. rolfsii*. *Trichoderma pseudoasperelloides* LFM0081 e LFM0027 e *T. zelobreve* LFM0013 se destacaram por parasitar e reduzir a viabilidade dos escleródios de *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *A. rolfsii*.

Os isolados *T. pseudoasperelloides* LFM0081, LFM0085 e *T. anisohamatum* LFM00102 proporcionaram aumento da porcentagem de emergência e o crescimento de plântulas de feijão, além de reduzirem a incidência de doença e o tombamento causados por *R. solani*, demonstrando potencial para o biocontrole.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, S. et al. Biocontrol activities of gamma induced mutants of *Trichoderma harzianum* against some soilborne fungal pathogens and their DNA fingerprinting. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 14, n. 4, p. 260, 2016.
- ABBAS, A. et al. *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani*. *J Plant Pathol Microbiol*, v. 3, pág. 1-9, 2017.
- ABREU, L. M; PFENNING, L. H. O Gênero *Trichoderma*. In: MEYER, M. C. *Trichoderma: uso na Agricultura*. Brasília, 2019.p. 163-176.
- AGRAWAL, S. C.; KHARE, M. N.; AGRAWAL, P. S. Biological control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil [India]. *Indian Phytopathology*, 1978.
- AJAYI-OYETUNDE, O. O; BRADLEY, C. A *Rhizoctonia solani*: taxonomia, biologia populacional e manejo da doença de mudas de rhizoctonia da soja. *Plant pathology*, v. 67, n. 1, p. 3-17, 2018.
- ALDRICH-WOLFE, L.; TRAVERS, S.; NELSON J. R, Berlin D. Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* from multiple crops in the North Central United States. *PLoS One*, v. 10, n. 9, p. e0139188, 2015.
- ALONSO-RAMÍREZ, A.; POVEDA, J.; MARTÍN, I.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; NICOLÁS, C. Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Molecular Plant Pathology*, v. 15, n. 8, p. 823-831, 2014.
- ALVES A, HENRIQUES I, FRAGOEIRO S, SANTOS C, PHILLIPS A. J. L, CORREIA A. Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting to molecular discrimination of members of the genera *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*. *Plant Pathol*. 53(5):629–634, 2004.
- AMIN, M.; TADELE, S.; THANGAVEL, S. White rot (*Sclerotium cepivorum* Berk)-an aggressive pest of onion and garlic in Ethiopia: An overview. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, v. 6, n. 1, p. 6-15, 2014.
- AMORIM, L. et al. *Manual de fitopatologia*. 2016.
- ARITUA V, NANYONJO A, KUMAKECH F, TUSHEMERIRWE W. 2007. Rep-PCR reveals a high genetic homogeneity among Ugandan isolates of *Xanthomonas campestris* pv *musacearum*. *Afr J Biotechnol*. 6(3):179–183.
- ARIZA, Yesid; SÁNCHEZ, Ligia. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, v. 10, n. 18, p. 149-155, 2012.

- BAIYEE B, PORNSURIYA C, ITO S, SUNPAPAO A (2019) *Trichoderma Spirale* T76–1 exibe atividade de biocontrole contra manchas foliares em alface (*Lactuca sativa* L.) causada por *Corynespora cassiicola* ou *Curvularia aeria*. *Controle Biol* 129:195–200.
- BENHAMOU, N., CHET, I. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*, 86(4), 405-416.
- BERNARDO, Janaina Tauil 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. 3, p. 263-270, 2019.
- BETTIOL, Wagner et al. *Controle biológico de doenças de plantas*. 1991.
- BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo AB. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, 2009.
- BETTIOL, Wagner et al. *Produtos comerciais à base de Trichoderma*. Meyer, MC; Mazaro, SM; Silva, JC *Trichoderma: uso na agricultura*. Brasília: Embrapa, p. 45-160, 2019.
- BEUTE, M. K., RODRIGUES-KABANA, R. 1981. Effect of soil moisture, temperature, and field environment of survival of *Sclerotium rolfsii* in Alabama and North Carolina. *Phytopathology* 71:1293-96.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI et al. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3. ed. São Paulo: Agronômica ceres, v. 2, p. 397, 1997.
- BUENO, César Júnior; AMBRÓSIO, Márcia Michelle de Queiroz; SOUZA, Nilton Luiz de. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. *Summa Phytopathologica*, v. 33, p. 47-55, 2007.
- BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C. V. T.; ARIOLI, C. J.; GUIMARÃES, L.S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P.; SCHEIDT, F. R. 2003. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 96-100.
- CARDOSO, J.E. Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1990. 30p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 30).
- CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution*, v. 67, n. 10, p. 2823-2837, 2013.
- COLEY-SMITH, J. R.; MITCHELL, C. M.; SANSFORD, C. E. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathology*, v. 39, n. 1, p. 58-69, 1990.

- CONAB, Boletim Logístico – Mercado de fretes e conjuntura de exportação, v. abril 2023, p. 1, 2023. Disponível em: < https://www.conab.gov.br/info-agro/analisesdomercadoagropecuarioeextrativista/boletimlogistico/item/download/47164_b5076b42603dc099a058046e97a1c99e>. Acesso em: 14 de set, 2023.
- CHALLEN, M.; ELLIOTT, T. J. Polypropylene straw ampoules for the storage of microorganisms in liquid nitrogen. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 5, p. 11-23, 1986.
- CHEN, K.; ZHUANG, W. Y. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-37, 2017.
- DE MEDEIROS CÂMARA¹, Francisco Mickael et al. Emergência de sementes de soja com diferentes porcentagens de infestação de manchas púrpura. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 1, pág. 18-22, 2019.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. *Transactions British Mycological Society*, v. 57, p. 363-369, 1971.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, p. 11-15, 1987.
- EMBRAPA Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 1999/2000. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 226p. (Documentos, 132)
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELO, D. R.; ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.30, p.127-133, 2005.
- FONSECA, Paula Luize Camargos et al. Investigando o mitogenoma de *Trichoderma harzianum*: evolução, perfil transcricional e mecanismos regulatórios. 2021.
- FUGA, Cícero Augusto Guimarães. Prospecção de microrganismos e substâncias de origem vegetal para o controle de *Sclerotium cepivorum*. 2013.
- GARCIA, R. A. Caracterização biológica e fisiológica de populações de *Sclerotinia sclerotiorum* e avaliação da resistência genética em cultivares de soja. 2014. 15 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/449>>. Acesso em: 15 de out., 2023.
- GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, v.5, n.6, p.497-526, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elsc.200520098/pdf>>. Acesso em: 13 de set., 2023.
- GHINI, Raquel; KIMATI, Hiroshi; KIMATI, HIROSHI. Resistência de fungos a fungicidas. 2000.

- GUERRERO-GONZÁLEZ, M. L.; RODRÍGUEZ-KESSLER, M.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; SIMPSON, J.; SANCHEZ, F.; JIMÉNEZ-BREMONT, J. F. Differential expression of *Phaseolus vulgaris* genes induced during the interaction with *Rhizoctonia solani*. *Plant Cell reports*, v. 30, n.8, p.1465 -1473, 2011.
- GUERRA, Y.L.; OLIVEIRA, T.A.S.; LARANJEIRA, D.; LIMA, L.M.; MELO FILHO, P.A.; SANTOS, R.C. 2015. Control of *Sclerotium rolfsii* in peanut by using *Cymbopogon martinii* essential oil. *African Journal of Microbiology Research*, 9: 1684-169.
- HENNING, Ademir Assis et al. Manual de identificação de doenças de soja. 2014.
- KORVIN D, GRAYDON C, MCNEIL L, MROCZEK M (2014) Banding profile of Rep-PCR experiments differs with varying extension times and annealing temperatures. *JEMI* 18:146–149.
- LES, N. et al. Control of *Rhizoctonia solani* with biological products in the seed treatment in soybean. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 12, p. 99919-99935, 2020.
- LEWIS JA, LUMSDEN RD (2001) Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop Prot* 20: 49-56.
- LIMA, M. L. P. Práticas em microbiologia: Isolamento e repicagem de fungos. 2011.
- MURASHIGE, Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- LO PRESTI, L.; LANVER, D.; SCHWEIZER, G.; TANAKA, S.; LIANG, L.; TOLLOT, M.; ZUCCARO, A.; REISSMANN, S.; KAHMANN, R. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, v. 66, p. 513-545, 2015.
- LOUZADA, Gisele Angélica de Souza et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota neotropica*, v. 9, p. 145-149, 2009
- MACHADO, Daniele Franco Martins et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MADIGAN, Michael T. et al. Engenharia Genética e Biotecnologia. In: *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Artmed Editora, 2016.p. 317-320
- MAGÜIRE, J. D. Seeds of germination and selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science, Madison*, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MAUDE, R. B. Onion diseases. In: *The Epidemiology of Plant Diseases*. Springer, Dordrecht, p. 491-520, 2006.

- MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, Washington, v.26, p.195-218, 1923.
- MEYER, M. C., MAZARO, S. M., & DA SILVA, J. C. (2019). *Trichoderma*: uso na agricultura.
- MITSUEDA, T.; CHARCHAR, MJ d'A. Modo de ocorrência do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em feijoeiro irrigado na região dos cerrados. 1994.
- MONTE, BETTIOL & HERMOSA, 2019. Cap. 14 Livro *Trichoderma: Uso na Agricultura*.
- MONTOYA, Quimi Vidaurre et al. Desvendando espécies de *Trichoderma* no ambiente de formigas Attine: descrição de três novos táxons. *Antonie van Leeuwenhoek* , v. 633-651, 2016.
- MORENO-RUIZ D, LICHIOUS A, TURRÀ D et al (2020) Ensaio de quimiotropismo para simbiose de plantas e triagem de compostos relacionados ao micoparasitismo em *Trichoderma atroviride* . *Microbiol Frontal* 11:1–17.
- NAPOLÃO, Reginaldo et al. Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. *Summa Phytopathologica*, v. 32, p. 180-182, 2006.
- OLIVEIRA, Amanda Cabral Corrêa de et al. Metodologias de inoculação de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 992-995, 2008.
- PATRICIO, Flávia RA; KIMATI, Hiroshi; BARROS, Benedito C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 2, p. 223-229, 2001.
- PUNJA, Zamir K. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual review of Phytopathology**, v. 23, n. 1, p. 97-127, 1985.
- REÇA, Bruna. *Trichoderma* spp. no controle de doenças causadas por *Rhizoctonia solani* KÜHN. 2022.
- REIS, Erli Melo et al. Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 10, n. 2, p. 145-150, 2011.
- REIS, E. M.; CASA, R. T.; GAVA, F.; MOREIRA, E. N.; SACHS, C. Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.10, p.145-150, 2011.
- REMBINSKI, J. et al. 2022. Using *Trichoderma* to manage sclerotia-producing phytopathogenic Fungi. In: Juliatti (Ed). *Trichoderma-Technology and Uses*. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.102426>
- ROSSMAN, A. Y.; SEIFERT, K. A.; SAMUELS, G. J.; MINNIS, A. M.; SCHROERS, H. J.;

- LOMBARD, L.; GEISER, D. M. Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection. *IMA Fungus*, v. 4, n. 1, p. 41-51, 2013.
- SALDAÑA-MENDOZA SA, CHAVEZ-GONZÁLEZ ML, AGUILAR GONZALEZ CN (2023) Protocolo para produção de esporos de trichoderma para utilização como agente de controle biológico através da revalorização de resíduos agroindustriais. In: Aguilar Gonzalez CN, Gómez-García R, Kuddus M (eds) Conversão de resíduos alimentares. Métodos e protocolos em ciência de alimentos. Humana, Nova York, NY.
- SALDAÑA-MENDOZA, SA, PACIOS-MICHELENA, S., PALACIOS-PONCE, AS et al. Trichoderma como agente de controle biológico: mecanismos de ação, benefícios para as culturas e desenvolvimento de formulações. *World J Microbiol Biotechnol* 39, 269 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03695-0>
- SALES, Lucas S. et al. Diversidade Taxonômica e Identificação de Trichoderma. *Tópicos em Microbiologia Agrícola* (pp.187-217), 2020.
- SILVA, L. G. et al (2022). Dual functionality of Trichoderma: Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and biostimulant of cotton plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 983127.
- SILVA, Lincon Rafael et al. Idade da colônia de Trichoderma azevedoi altera o perfil de compostos orgânicos voláteis e a capacidade de suprimir *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijão. *The Plant Pathology Journal* 2023;39(1):39-51. Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2022/06/1794212>>. Acesso em: 31, agosto de 2023.
- SRIVASTAVA, MADHU PRAKASH; GUPTA, SHASHI; SHARM, Y. K. Detection of siderophore production from different cultural variables by CAS-agar plate assay. *Asian J. Pharm. Pharmacol*, v. 4, p. 66-69, 2018.
- SOOD, MONIKA et al. Trichoderma: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent. *Plants*, v. 9, n. 6, p. 762, 2020.
- SUN, RUI-YAN et al. Trichoderma biodiversity in China. *Journal of applied genetics*, v. 53, p. 343-354, 2012.
- VALADARES-INGLIS, Maria Cleria et al. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 330. 2017.
- WU, B. M.; DAVIS, M.; TURINI, T. Developing New Integrated Strategies for Controlling White Rot in Garlic. 2010.
- ZERAY S, Mohammed Y (2013) Pesquisa e avaliação de opções de manejo econômicas da podridão branca do alho (*Sclerotium cepivorum* Berk) em Tigray, norte da Etiópia. *J Plant Pathol Microb* 4:189.
- ZHANG, Guang-Zhi et al. Cinco novas espécies de Trichoderma de solos úmidos na China. *MycoKeys*, v. 87, p. 133, 2022.

ANEXO

Anexo 1. Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos para estudo.

Código	Local	Fonte de isolamento
LFM005	Lavras/MG	Cascas/ espécie florestal
LFM006	Lavras/MG	Cascas eucalipto
LFM007	Lavras/MG	Cascas secas
LFM008	Lavras/MG	Cascas eucalipto
LFM009	Lavras/MG	Cascas secas
LFM0010	Lavras/MG	Madeira decomposta
LFM0011	Lavras/MG	Cascas/ espécie florestal
LFM0012	Lavras/MG	Folhas decompostas
LFM0013	Aguanil/MG	Solo mata
LFM0014	Aguanil/MG	Madeira decomposta
LFM0015	Aguanil/MG	Cascas/ espécie florestal
LFM0016	Lavras/MG	Cascas secas
LFM0017	Aguanil/MG	Raízes bananeira
LFM0018	Aguanil/MG	Raízes/ espécie florestal
LFM0019	Lavras/MG	Cascas de pinheiro
LFM0020	Lavras/MG	Solo floresta pinheiro
LFM0021	Lavras/MG	Solo floresta pinheiro
LFM0022	Caldas/MG	Videira
LFM0023	Caldas/MG	Videira
LFM0024	Caldas/MG	Videira
LFM0025	Caldas/MG	Videira
LFM0026	Caldas/MG	Videira
LFM0027	Caldas/MG	Videira
LFM0028	Caldas/MG	Videira
LFM0029	Caldas/MG	Videira
LFM0030	Caldas/MG	Videira
LFM0031	Caldas/MG	Videira
LFM0032	Caldas/MG	Videira
LFM0033	Caldas/MG	Videira
LFM0034	Caldas/MG	Videira
LFM0035	Caldas/MG	Videira
LFM0036	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0037	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0038	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0039	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0040	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0041	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0042	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0043	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0044	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0045	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0046	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0047	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0048	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0049	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0050	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0051	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0052	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0053	Patrocínio/MG	Solo de estação seca

LFM0054	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0055	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0056	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0057	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0058	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0059	Patrocínio/MG	Solo de estação seca
LFM0060	Patrocínio/MG	Solo de estação chuvosa
LFM0061	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0062	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0063	Patrocínio/MG	Mata café convencional
LFM0064	Patrocínio/MG	Mata café convencional
LFM0065	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0066	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0067	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0068	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0069	Patrocínio/MG	Mata café convencional
LFM0070	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0071	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0072	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0073	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0074	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0075	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0076	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0077	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0078	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0079	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0080	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0081	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0082	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0083	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0084	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0085	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0086	Itatiaia/MG	Solo de mata
LFM0087	Catas Altas/MG	Solo de mata
LFM0088	Patrocínio/MG	Mata café biológico
LFM0089	Patrocínio/MG	Mata café biológico
LFM0090	Patrocínio/MG	Mata café biológico
LFM0091	Patrocínio/MG	Mata café biológico
LFM0092	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0093	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0094	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0095	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0096	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0097	Patrocínio/MG	Solo café biológico
LFM0098	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM0099	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM00100	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM00101	Patrocínio/MG	Solo café convencional
LFM00102	Patrocínio/MG	Solo café convencional
