



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EDUARDO AZEVEDO LONARDONI

**LABIM-LF027: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NO CONTROLE
DE FUNGOS FITOPATÓGENOS**

Londrina – Paraná
2024

EDUARDO AZEVEDO LONARDONI

**LABIM-LF027: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NO CONTROLE
DE FUNGOS FITOPATÓGENOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves
de Oliveira Junior**

**Londrina – Paraná
2023**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

E24l Lonardoni, Eduardo Azevedo Lonardoni.
LABIM-LF027: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATÓGENOS / Eduardo Azevedo Lonardoni Lonardoni. - Londrina, 2024. 66 f. : il.

Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2024. Inclui bibliografia.

1. Clonostachys - TCC. 2. Caracterização morfológica - TCC. 3. Fermentação - TCC. 4. Controle Biológico - TCC. I. Gonçalves de Oliveira Junior, Admilton . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

EDUARDO AZEVEDO LONARDONI

**LABIM-LF027: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NO CONTROLE
DE FUNGOS FITOPATÓGENOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof . Dr . Admilton Gonçalves
de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr . Luciano Aparecido Panagio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr . Guilherme Fonseca Reis
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de maio de 2023.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à Deus, meu pais, Nivaldo e Renata, e ao meu irmão Mateus. Pai, o senhor sempre foi meu maior exemplo de persistência e dedicação, obrigado por me inspirar tanto e fazer com que eu me mantivesse sempre interessado e motivado para me tornar uma melhor pessoa. Mãe, obrigada por acreditar em meus sonhos, me apoiando durante todo meu desenvolvimento e me motivando a realizar meu sonho. Ao meu irmão Mateus, agradeço pelo companheirismo e amizade, que sempre tornaram mais leves a vida cotidiana. Obrigada por sempre acreditarem em mim, buscando fazer com que eu me tornasse não apenas um bom profissional, mas uma pessoa descente e com bom caráter. Dedico esta e todas as minhas conquistas a vocês, sem vocês nada seria possível.

Agradeço à meu orientador, Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, pela oportunidade que me permitiu desenvolver este projeto. Apesar de ter entrado de forma recente no laboratório, o senhor sempre me incentivou a fazer com que eu melhorasse meu trabalho e me permitiu adquirir conhecimentos que jamais poderia ter alcançado. Obrigada pela paciência, disposição e confiança, o senhor é um exemplo de profissional que busco alcançar e serei eternamente grato pela oportunidade que me foi concedida.

Agradeço a minha Isabella, a razão com que meus dias mais tristes se tornassem alegres. Você é minha inspiração dentro e fora da universidade, me motivando e encorajando a alcançar minhas conquistas. É um exemplo de pessoa e pesquisadora que faz com que cada dia eu me esforce para ser melhor. Espero que as nossas conquistas e experiências juntos sejam eternas.

Agradeço aos meus colegas de curso e grandes amigos Beatriz, Carlos Eduardo, Gabriele, Rafaela e Paola. Obrigado pelos bons momentos que tornaram a vida acadêmicas mais simples e divertida. Nossos momentos de risadas estarão sempre em minhas memórias e espero que todos alcancem o sucesso acadêmico que almejam.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da UEL, Ângelo, Fauzze, Guilherme, Maria Luiza, Paula, Sandrielle, Marcos Vinícius, Daniel, João Paulo, Lucas, Nathan, Roberto e Débora. Vocês foram responsáveis por tornar esse projeto possível, me guiando e auxiliando durante todo o processo.

São meus amigos que tornam todos os dias de trabalho alegres e divertidos sempre com novos aprendizados.

Agradeço também a banca examinadora, Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio e Dr. Guilherme Fonseca Reis pelo tempo dedicado e contribuição para meu aprendizado.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina pelo privilegiado ensino superior de alta qualidade. Aos professores e funcionários, minha gratidão pelo trabalho árduo e contribuições essenciais para minha formação acadêmica. À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG) e ao Departamento de Microbiologia, meu reconhecimento pelo apoio institucional.

"Tudo é teoricamente impossível, até que seja feito."
Robert A. Heinlein

Lonardoni, Eduardo Azevedo. **Labim-LF027: avaliação no controle de fungos fitopatogênicos**. 2024 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O controle biológico, utilizando microrganismos ou seus metabólitos, oferece uma alternativa sustentável ao controle de doenças em plantas. O gênero de fungos ascomicetos *Clonostachys* controla de forma eficiente diferentes fungos fitopatogênicos, destacando o potencial desses microrganismos no manejo de doenças e pragas. Estudos que avaliem a produção de metabólitos e a caracterização fúngica são cruciais para o desenvolvimento de produtos eficazes neste manejo. Nesse estudo, os objetivos foram avaliar como diferentes parâmetros podem afetar no crescimento e caracterização macroscópica de *Clonostachys* sp. LABIM-LF027 isolado na região próxima a Universidade Estadual de Londrina, sequenciar o microrganismo a nível de gênero, avaliar o potencial como agente no controle biológico de fitopatogênicos, e seu potencial na produção de conídios utilizando fermentação em estado sólido em grãos de arroz. Para isso, o isolado foi inoculado em cinco meios de culturas diferentes, incubadas a 20, 24 e 28 °C, sob presença e/ou ausência de fotoperíodo. A análise morfológica de *Clonostachys* sp. em diferentes meios de cultura demonstrou características macroscópicas variadas, além de diferenças no crescimento. O sequenciamento da região ITS indicou que o isolado está acomodado no gênero *Clonostachys*. No antagonismo, LABIM-LF027 reduziu o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos. Na produção de conídios em fermentação sólida em grãos de arroz os inóculos não apresentaram diferenças na produção total de conídios. Dessa forma, LABIM-LF027 apresentou diferentes características morfológicas, atividade antimicrobianas contra fitopatogênicos e potencial na produção de conídios. Estudos posteriores poderão ser conduzidos para aprimorar a compreensão e mecanismos desse fungo.

Palavras-chave: *Clonostachys*, Caracterização morfológica, Fermentação, Controle Biológico.

Lonardoni, Eduardo Azevedo. **Labim-LF027: evaluation in the control of phytopathogenic fungi**. 2024. p. Undergraduated Thesis (Biological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Biological control, using microorganisms or their metabolites, offers a sustainable alternative to plant disease control. The ascomycete fungi genus *Clonostachys* efficiently controls different phytopathogenic fungi, highlighting the potential of these microorganisms in disease and pest management. Studies that evaluate the production of metabolites and fungal characterization are crucial for the development of effective products for this management. In this study, the objectives were to evaluate how different parameters can affect the growth and macroscopic characterization of *Clonostachys* sp. LABIM-LF027 isolated in the region near the State University of Londrina, sequence the microorganism at genus level, evaluate its potential as an agent in the biological control of phytopathogens, and its potential in the production of conidia using solid-state fermentation in rice grains. To do this, the isolate was inoculated into five different culture media, incubated at 20, 24 and 28 °C, in the presence and/or absence of photoperiod. Morphological analysis of *Clonostachys* sp. in different culture media showed varied macroscopic characteristics, as well as differences in growth. Sequencing of the ITS region indicated that the isolate belongs to the genus *Clonostachys*. In antagonism, LABIM-LF027 reduced the growth of different phytopathogenic fungi. In the production of conidia in solid fermentation on rice grains, the inoculums showed no differences in total conidia production. Thus, LABIM-LF027 showed different morphological characteristics, antimicrobial activity against phytopathogens and potential in the production of conidia. Further studies could be conducted to improve the understanding and mechanisms of this fungus.

Keywords: *Clonostachys*, Morphological characterization, Fermentation, Biological Control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aspecto geral na folha e haste de soja infectado por <i>C. cassicola</i>	21
Figura 2 - Aspecto geral do caule e folha de soja infectado por <i>F. solani</i>	23
Figura 3 – Sintomas ocasionados por <i>C. kikuchii</i> observados na soja.	24
Figura 4 – Aspecto geral dos sintomas observados pela infecção de <i>Sclerotinea sclerotiorum</i> e de suas estruturas de resistência.	25
Figura 5 – Sintomas observados nas raízes e plantas jovens de soja.	27
Figura 6 – Sintomas causados por <i>M. phaseolina</i> em soja e escleródios presentes no caule de soja.	28
Figura 7– Aspectos gerais dos sintomas de <i>B. cinerea</i> em frutas de morango e uva	29
Figura 8 – Medidas utilizadas para o cálculo de ICR.	36
Figura 9 – Imagem das estruturas características de LABIM-LF027 encontrada nos diferentes meios.	Erro! Indicador não definido.
Figura 10 – Crescimento de LABIM-LF027 em diferentes meio e fotoperíodos em 20°C.	41
Figura 11 - Crescimento de LABIM-LF027 em diferentes meio e fotoperíodos em 24°C.	42
Figura 12 - Crescimento de LABIM-LF027 em diferentes meio e fotoperíodos em 28°C.	43
Figura 13 – Gráfico do crescimento de LABIM-LF027 em diferentes meios de cultura.	45
Figura 14 – Gráfico do crescimento de LABIM-LF027 em diferentes tempos de iluminação.	45

Figura 15 – Gráfico do crescimento de LABIM-LF027 em diferentes temperaturas..	46
Figura 16 – Valores de ICR de acordo com o tipo de inóculo de LABIM-LF027	48
Figura 17 – Controle de fitopatógenos por LABIM-LF027 em cultura dupla.	49
Figura 18 – MEV de culturas duplas de LABIM-LF027.....	50
Figura 19 – Produção de conídios em fermentação sólida em arroz.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Crescimento em cm de LABIM-LF027 nos diferentes parâmetros testados.	44
Tabela 2 – Inibição do crescimento radial utilizando 2 inóculos diferentes de LABIM-LF027.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	Ágar batata dextrose
SB	Ágar sabouraud
YES	Ágar extrato de levedura
MEA	Ágar extrato de malte
CZ	Ágar czapek
BCA	Agente de controle biológico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Gênero <i>Clonostachys</i>	17
2.1.1 <i>Clonostachys rosea</i>	17
2.1.1.2 Morfologia e Ecologia	18
2.2 Fungos fitopatogênicos	19
2.2.1 <i>Corynespora cassicola</i>	20
2.2.2 <i>Fusarium solani</i>	22
2.2.3 <i>Cercospora kikuchii</i>	23
2.2.4 <i>Sclerotinea sclerotiorum</i>	24
2.2.5 <i>Rhizoctonia solani</i>	26
2.2.6 <i>Macrophomina phaseolina</i>	27
2.2.7 <i>Botrytis cinerea</i>	29
2.3 Controle de Fitopatógenos	30
2.3.1 Métodos de controle.....	30
2.3.2 Microrganismos no controle biológico.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Manutenção dos microrganismos.....	34
3.2 Caracterização morfológica e crescimento.....	34
3.3 Extração do DNA e sequenciamento.....	35
3.4 Antagonismo contra fungos fitopatogênicos	35
3.4.1 Cultura dupla.....	35
3.4.2 Avaliação do crescimento.....	Erro! Indicador não definido.
3.5 Microscopia eletrônica de varredura.....	37
3.6 Fermentação sólida em arroz.....	37

4. RESULTADOS	38
4.1 Caracterização macro e microscópica.....	39
4.2 Avaliação do crescimento	44
4.3 Sequenciamento	46
4.4 Antagonismo contra fungos fitopatogênicos	47
4.5 Fermentação sólida em arroz.....	51
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

Doenças de plantas são responsáveis por uma perda significativa da produção mundial de culturas economicamente importantes, causando reduções de 10 a 15% de toda produção e prejuízos de bilhões de dólares (Chatterjee et al. 2016). Fungos fitopatogênicos representam um dos principais causadores relacionados a prejuízos de culturas economicamente importantes, sendo associados a diversos grupos de plantas e diferentes efeitos adversos.

Fungos de diversas espécies como *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinea sclerotiorum* são apenas alguns exemplos de fitopatógenos que podem afetar plantas como soja, milho e feijão, impactando profundamente países onde a economia está atrelada a produção dessas culturas. Assim, alternativas que resultem no controle desses fitopatógenos se fazem necessárias para que se tenha uma produção ideal (Marin-Menguiano et al., 2019).

Entre essas alternativas, o uso de produtos químicos sintéticos representa um dos principais mecanismos utilizados para o controle desses patógenos, sendo uma alternativa eficaz e necessária para a proteção de culturas economicamente importantes (Hirooka; Ishi, 2013). Apesar de sua eficiência, a utilização desses mecanismos representa um risco a saúde e meio ambiente, sendo necessário o uso e desenvolvimento de novas tecnologias para o controle de fitopatógenos (Chelinho et al., 2011).

O controle biológico representa uma alternativa sustentável para o controle de pragas. Essa tecnologia envolve o uso de microrganismos ou/e seus metabólitos para matar ou inibir o desenvolvimento de fitopatógenos (Usta, 2013). Assim, estudos envolvendo novos microrganismos, como os fungos e bactérias,

1 representam um potencial para a formação de novos produtos inovadores no
2 controle de pragas fitopatógenos (Thambugala et al., 2020)..

3 Entre os microrganismos que apresentam potencial para o controle de
4 fitopatógenos, o fungo ascomiceto *Clonostachys rosea* representa um possível
5 agente no controle de fungos como *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, entre outros. Assim,
6 esse estudo tem o objetivo de caracterizar a morfologia e avaliar a atividade
7 antagonista de um isolado de *Clonostachys* sendo relevante para o desenvolvimento
8 de novos produtos eficientes no manejo de pragas.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Clonostachys*

O gênero de fungos *Clonostachys* (anteriormente conhecido como *Gliocladium*), cujo teleomorfo é *Bionetria* (antes conhecido como *Nectria* ou *Nectriopsis*), pertence à família Bionectriaceae de Sordariomycetes em Ascomycota (Schroers, 2021). Os fungos *Clonostachys* estão distribuídos globalmente e têm diferentes modos de vida, podendo ser saprotróficos, micoparasitas destrutivos, liquenícolas, ou habitandotecidos vegetais mortos. Atualmente, existem cerca de 44 espécies no gênero *Clonostachys*, onde a espécie *C. rosea* se destaca pelo seu potencial no controle biológico (Schroers, 2021; Sutton et al., 1997).

2.1.1 *Clonostachys rosea*

2.1.1.1 Classificação

C. rosea é um fungo ascomiceto que pertence ao subfilo Pezizomycotina, à classe Sordariomycetes, à subclasse Hypocreomycetidae, à ordem Hypocreales, à família Bionectriaceae e ao gênero *Clonostachys*, sendo o anamorfo de *Nectria ochroleuca* (Schwein). Inicialmente conhecido como *Gliocladium roseum*, foi descrito pela primeira vez por Bainier em 1907. Estudos posteriores, como o de Schoroers et al. (1999), demonstraram que a morfologia, ecologia e sequenciamento de DNA de *C. rosea* diferiam daqueles encontrados em outros fungos do gênero *Gliocladium*, levando à sua reclassificação como *C. rosea*. Na literatura, são encontradas duas variantes de *C. rosea*, a forma (f.) *rosea*

1 (anteriormente *G. roseum*) e a forma (f.) *catenulata* (anteriormente *G. catenulatum*),
2 que se distinguem principalmente pela coloração de seus conídios.

3 4 2.1.1.2 Morfologia e Ecologia

5
6 As colônias do fungo são comumente observadas em tons
7 esbranquiçados, alaranjados ou salmão quando cultivadas em meios solidificados. A
8 fase teleomórfica do fungo é frequentemente encontrada em galhos de árvores
9 recém-mortas, embora também possa ser observada em tecidos jovens de plantas
10 herbáceas e em outros fungos. A produção de seus conidióforos pode ser de dois
11 tipos: verticilados e penicilados, formados a partir de hifas superficiais alocadas em
12 caules, estames e folhas. Apresenta dois tipos de esporos, sendo esses os conídios,
13 que apresentam $2,9 \pm 0,3 \times 1,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de tamanho, e clamidósporos, que
14 apresentam $5,8 \pm 0,4 \times 5,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de tamanho (Sun et al., 2018). Clamidósporos
15 desse fungo são formados quando presentes em ambientes estressantes (Sun et al.,
16 2020).

17 Esse fungo apresenta uma ecologia ubíqua, sendo observado em
18 regiões tropicais, temperadas, subárticas e até mesmo em regiões desérticas,
19 indicando uma distribuição cosmopolita (Sun et al., 2020; Sutton et al., 1997). Essa
20 distribuição pode estar relacionada ao estilo de vida generalista de *C. rosea*, que
21 inclui micoparasitismo, endofitismo, competência com a rizosfera, entre outras
22 (Shigo, 1958; Li et al., 2002; Chatterton e Punja, 2012; Saraiva et al., 2015; Maillard
23 et al., 2020). O fungo é capaz de prosperar em uma ampla faixa de pH, que varia
24 de neutro a alcalino, e já foi identificado em diferentes ambientes, tais como culturas
25 agrícolas, ambientes naturais, florestas, corpos d'água doce e solos litorâneos

1 (Sutton et al., 1997). Além disso, *C. rosea* é reconhecido por sua habilidade de
2 colonizar diversas estruturas vegetais, tais como raízes, caules, vagens e sementes
3 de soja, assim como raízes de trevo vermelho, folhas de morango e framboesa, sem
4 causar sintomas aparentes (Sutton et al., 1997). Diferentes linhagens podem ser
5 isoladas a partir do solo, fungos e estruturas de plantas (Walker e Maude, 1975;
6 Nobre et al., 2005; Mueller e Sinclair, 1986; García et al., 2003).

7 8 2.2 Fungos fitopatogênicos

9
10 A agricultura representa uma das principais atividades econômicas
11 encontradas do Brasil, onde um dos principais desafios encontrados representam as
12 doenças em plantas. Doenças de plantas representam cerca de 10 a 15% da perda
13 das principais culturas mundiais, causando bilhões de dólares de prejuízos
14 (Chatterjee et al., 2016).

15 Cerca de 70-80% das doenças das plantas são causadas por fungos
16 patogênicos, que têm efeitos negativos no crescimento e na produção das culturas
17 (Li et al., 2017). Nos últimos anos, essas doenças têm se tornado cada vez mais
18 graves, impactando significativamente a produtividade e a qualidade das culturas, e
19 representando um desafio importante para o desenvolvimento de uma agricultura
20 sustentável (Marin-Menguiano et al., 2019).

21 Fungos fitopatogênicos representam um grupo de espécies que
22 utilizam nutrientes de plantas para seu desenvolvimento, causando efeitos negativos
23 aos seus hospedeiros (Doehlemann et al, 2017). Além disso, algumas doenças
24 resultam da interação de múltiplos agentes patogênicos, em vez de serem causadas
25 por um único agente (Chatterjee et al., 2016).

1 Ao longo da história evolutiva das plantas e dos fungos patogênicos,
2 desenvolveram-se relações altamente especializadas e complexas, caracterizadas
3 por um padrão de seleção mútua e coevolução. Assim, com o surgimento de novas
4 variedades e variações de fungos patogênicos, suas interações com as plantas
5 também têm se modificado (Quintanilha Peixoto et al., 2019).

6 As infecções fúngicas são responsáveis por uma ampla variedade
7 de sintomas de doenças em plantas. Tradicionalmente, os fungos fitopatogênicos
8 são classificados em dois grupos principais: os patógenos biotróficos, que
9 estabelecem interações íntimas com as plantas, podendo persistir e se alimentar de
10 tecidos vivos, e os patógenos necrotróficos, que matam o tecido vegetal para extrair
11 nutrientes (Doehlemann et al, 2017).

12 Os hospedeiros são afetados por esses microrganismos a partir de
13 seus esporos, que podem alcançar estes a partir de diversos vetores como o vento,
14 insetos e água, podendo se fixar em várias superfícies (Doehlemann et al, 2017).
15 Com a germinação desses esporos, hifas crescem ao longo da superfície do
16 hospedeiro, sendo influenciado por fatores químicos, físicos, entre outros (Ebbole et
17 al., 2007).

18 Entre os fungos que podem causar doenças em plantas, pode ser
19 destacado: *Corynespora cassicola* (mancha-alvo), *Fusarium solani* (podridão-
20 vermelha-da-raiz/fusariose), *Cercospora kikuchii* (crestamento-foliar/mancha-púrpura),
21 *S. sclerotiorum* (mofo-branco), *R. solani* (tombamento e mela/requeima), *M. phaseolina*
22 (mofo-cinzento) e *B. cinerea* (podridão-cinzenta).

23

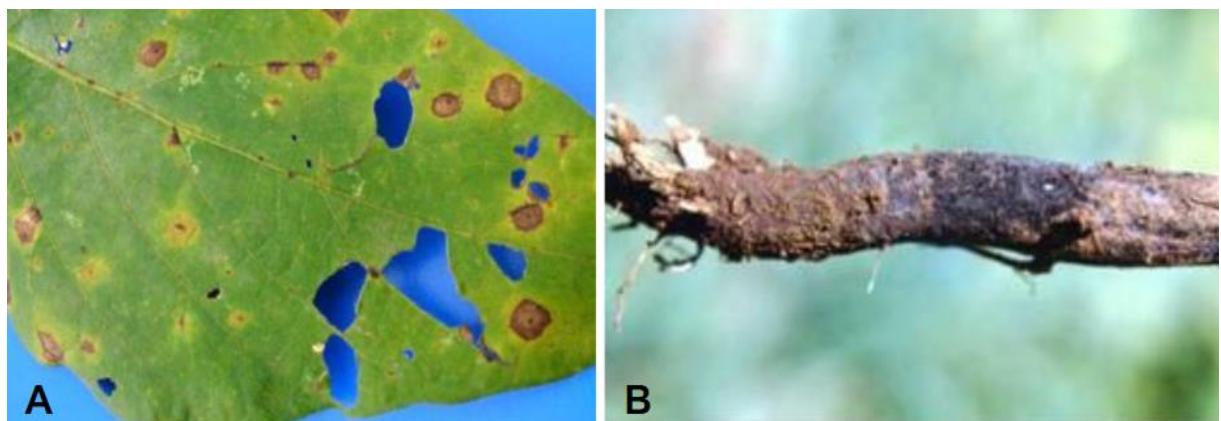
24 2.2.1 *Corynespora cassicola*

25

1 *C. cassicola*, primeiramente descrito por Berkeley e Curtis (1868), e
2 reclassificado por Wei (1950), é um fungo ascomiceto responsável por infectar mais
3 de 390 espécies de plantas (Farr e Rossman, 2018). Na soja é o agente etiológico
4 da mancha-alvo, infectando toda a parte aérea e o sistema radicular (Almeida et al.,
5 2005). Seu primeiro relato no Brasil ocorreu no Mato Grosso em 1974 e no Paraná
6 em 1976 (Almeida et al., 1976), onde infecções foram favorecidas por uma alta
7 umidade, e devido aos cultivares utilizados (Godoy et al., 2018).

8 Os sintomas característicos das doenças fúngicas começam com
9 pequenas manchas pardas nas folhas, cercadas por um halo amarelado, que
10 eventualmente se desenvolvem em manchas circulares de tonalidade marrom-claro
11 a marrom-escura (Figura 1). Essas manchas frequentemente exibem pontos no
12 centro e anéis concêntricos mais escuros. Além disso, lesões também podem ser
13 observadas em pecíolos, hastes e vagens da planta (Godoy et al., 2018).

14
15 Figura 1 – Aspecto geral na folha e haste de soja infectado por *C. cassicola*.



16
17 Legenda: A) Lesões em folhas ocasionadas por infecção por *C. cassicola*; B) Lesões ocasionadas na
18 haste soja por *C. cassicola*. Autor: Rafael M. Soares.

19
20 A mancha alvo é uma doença amplamente disseminada em diversas regiões
21 produtoras de soja no Brasil, sendo especialmente significativa no cerrado, onde sua

1 ocorrência é mais comum. Na cultura de soja, a mancha-alvo surge principalmente
2 nos ciclos finais das culturas, podendo ser altamente destrutiva em cultivares
3 suscetíveis durante períodos de alta precipitação pluvial (Phillips, 1989).

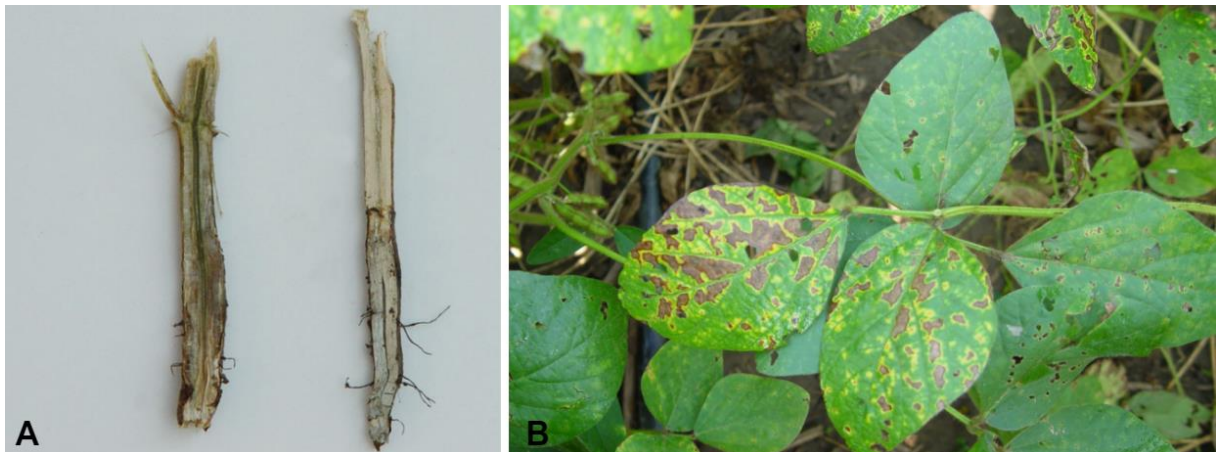
4 5 2.2.2 *Fusarium solani*

6
7 *F. solani* (Mart.) Hans é um fitopatógeno que habita os solos
8 responsável por causar a podridão vermelha de raízes (PVR) ou síndrome da morte
9 súbita (“*sudden death syndrome*”) nas plantas de soja, afetando a maior parte das
10 áreas de cultivo nos Estados Unidos, Brasil e Argentina (Hartman et al., 1999). *F.*
11 *solani* corresponde à forma anamórfica do fungo, enquanto sua forma teleomórfica
12 corresponde ao ascomiceto *Nectria haemacocca* (Abney et al., 1993).

13 Esse fungo apresenta uma ampla distribuição, podendo afetar
14 amplas áreas de produção. *F. solani* se desenvolve em temperaturas entre 25 e 28
15 °C, apresentando um melhor crescimento em solos compactados e com água livre
16 (HARTMAN et al., 1999; PICININI e FERNANDES, 2003). Os danos causados pelo
17 patógenos ocorrem devido a infecção das raízes, fazendo com que a planta
18 apresente uma menor massa e nodulação (NETO et al., 2008). OS principais
19 sintomas da doença podem ser observados na Figura 2.

20 No Brasil, os primeiros casos de PVR foram observados em São
21 Gotardo-MG, porém apenas a partir das safras de 1990/1991 e 1991/1992 a doença
22 tornou-se relevante, podendo ser encontrado em regiões como Goiás, Mato Grosso,
23 Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (YORINORI,
24 1997).

1 Figura 2 - Aspecto geral do caule e folha de soja infectado por *F. solani*.



2

3 Legenda: A) comparação das duas raízes de soja, infectada (esquerda) e saudável (direita); B) folha-
4 carijó, sintoma típico causado por PVR. Autor: Austeclínio Lopes de Faria Neto.

5

6 2.2.3 *Cercospora kikuchii*

7

8 *Cercospora* representa um dos maiores gêneros de fungos
9 responsáveis por causar diferentes doenças em plantas, onde a espécie *C. kikuchii*
10 (Tak. Matsumoto e Tomoy.) M. W. Gardner representa o agente etiológico de dois
11 sintomas na soja, a mancha-purpura, e crestamento-foliar na região foliar de plantas
12 de soja. Ambos os sintomas apresentam pequenas lesões com a coloração roxa
13 escura (KASHIWA e SUZUKI, 2021).

14 *C. kikuchii* apresenta uma distribuição global, sendo recentemente
15 encontrado nas regiões das Américas, onde seus impactos podem ser observados
16 em grandes regiões produtoras como Estados Unidos, Brasil e Argentina. No Brasil,
17 o fungo apresenta maior incidência em regiões úmidas, podendo causar perdas de
18 até 30% da produção (SOARES et al., 2015; GODOY et al., 2016). Seu
19 desenvolvimento ocorre em regiões que apresentem uma temperatura relativamente
20 alta, entre 22 e 30 °C, e alta umidade relativa do ar (KUDO, 2009).

1 As feridas que podem ser observadas ocorrem devido a produção do
 2 pigmento cercosporina pelo patógeno, conferindo uma coloração púrpura (Figura 3),
 3 e induzindo a morte celular da planta hospedeira (KUYAMA e TAMURA, 1957;
 4 YAMAZAKI et al., 1975; DAUB e HANGARTER, 1983). Esses sintomas são
 5 observados na maior parte das culturas de soja, e representam um dos principais
 6 desafios encontrados em regiões da América do Sul, como a Argentina (WRATHER
 7 et al., 2010).

8
 9 **Figura 3 – Sintomas ocasionados por *C. kikuchii* observados na soja.**



10
 11 **Legenda:** A) crestamento foliar observado em folhas de soja; B) sementes apresentando os sintomas
 12 da mancha-purpura. Autores: Cláudia V. Godoy e Austecínio Lopes de Faria Neto.

13 **2.2.4 *Sclerotinea sclerotiorum***

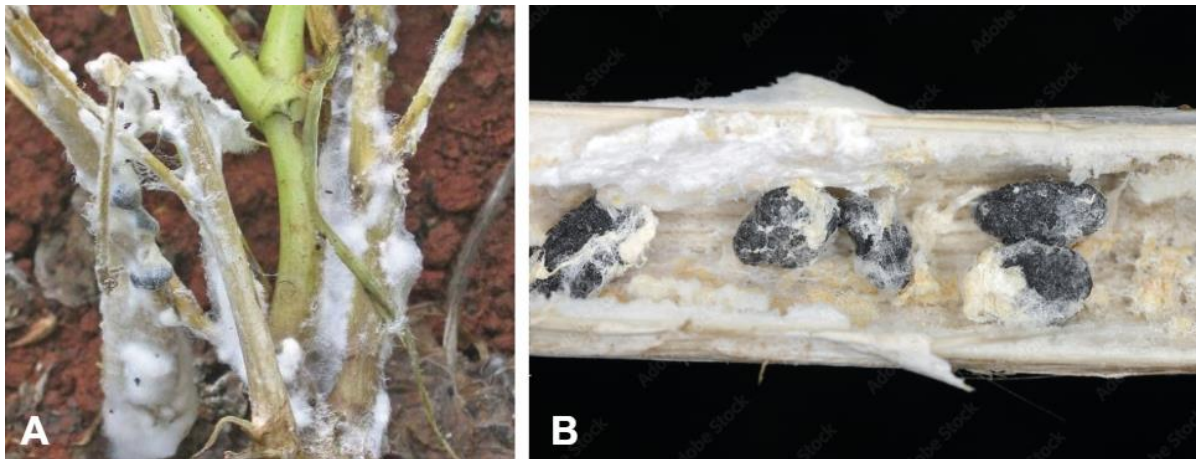
14
 15 O fungo ascomiceto *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary representa um
 16 fungo ascomiceto cosmopolita que pode afetar diversos grupos de plantas como as
 17 famílias Solanaceae, Cruciferae, Umbelliferae e Leguminosae (KOHN, 1979;
 18 WILLETS e WONG 1980; BOLAND e HALL 1994). É o agente etiológico responsável
 19 pela doença do mofo-branco ou podridão do caule de esclerotínea.

20 No Brasil, os estados mais afetados pela doença estão localizados

1 na região sul do país, que apresentam condições mais úmidas e frias, ideias para
2 seu desenvolvimento (WILLBUR et al., 2019). Esse fungo fitopatogênicos
3 representam um dos mais importantes para a cultura de soja, podendo afetar em até
4 70% o rendimento da soja (MEYER et al., 2022).

5 O controle desses microrganismos apresenta como maior desafio a
6 produção de estruturas de resistência denominadas de escleródios, que são
7 formadas a partir do condensamento de hifas (Figura 4), fazendo com que esse
8 microrganismo permaneça viável por até 12 meses em solos de regiões tropicais e
9 subtropicais (LEHNER et al., 2017; DE AZEVEDO SILVA et al., 2021; MEYER et al.,
10 2022).

11
12 Figura 4 – Aspecto geral dos sintomas observados pela infecção de *S. sclerotiorum*
13 e de suas estruturas de resistência.



14
15 Legenda: A) caule de soja infectado por *S. sclerotiorum*; B) escleródeos de *S. sclerotiorum*. Autores:
16 Murilo Lobo e Tomas Z.

17
18 O controle desses microrganismos apresenta como maior desafio a
19 produção de estruturas de resistência denominadas de escleródios, que são
20 formadas a partir do condensamento de hifas, fazendo com que esse microrganismo

1 permaneça viável por até 12 meses em solos de regiões tropicais e subtropicais
2 (LEHNER et al., 2017; DE AZEVEDO SILVA et al., 2021; MEYER et al., 2022).

3 4 2.2.5 *Rhizoctonia solani*

5
6 *R. solani* representa um fungo basidiomiceto cosmopolita descrito
7 inicialmente em 1858 por Julius Kühn. Habita o solo de diversas regiões, causando
8 uma série de danos a culturas economicamente importantes (Oyetundo e Bradley,
9 2018), podendo ser encontrado em sua forma saprófita, utilizando a matéria
10 orgânica disponível no ambiente para seu desenvolvimento, ou na forma de
11 escleródios (Ogoshi, 1987). Na soja, é o fitopatógeno responsável pela mela da soja,
12 doença que atinge a região foliar causando danos de 30 a 60% em produções
13 (Ciampi et al., 2008).

14 Esses fitopatógenos são classificados em linhagens de acordo com
15 reações de anastomose, onde linhagens compatíveis realizam fusão de hifas
16 paralelas, sendo classificados no mesmo grupo (Carling, 1996). As linhagens de *R.*
17 *solani* AG-1 representam um dos patógenos mais importantes, sendo responsáveis
18 por impactar diversas culturas economicamente importantes (Wibberg et al., 2013).

19 As infecções podem ocorrer devido a ferimentos ou pelo
20 revestimento do micélio, fazendo com que o patógeno penetre na epiderme da
21 planta (Les et al., 2020). As lesões formadas apresentam coloração marrom-
22 avermelhada, sendo observadas nas raízes ou no hipocótilo de plantas jovens
23 (Figura 5). O desenvolvimento mais agressivo do fungo ocorre em temperaturas
24 entre 15 e 18 °C e em solos úmidos (Guerrero-González et al., 2011).

1 Figura 5 – Sintomas observados nas raízes e plantas jovens de soja.



2
3 Legenda: A) raízes de soja com os sintomas típicos causados por *R. solani*; B) sintomas observados
4 em plântulas de soja. Autores: Augusto César Pereira Goulart e Madalosso.

6 2.2.6 *Macrophomina phaseolina*

7
8 *M. phaseolina* é um fungo ascomiceto generalista encontrado no
9 solo em diversas regiões do planeta, afetando mais de 500 espécies de plantas em
10 mais de 100 famílias (Marquez et al., 2021). Na soja, é o agente responsável pela
11 podridão de carvão, afetando suas raízes e caules, e em condições de altas
12 temperaturas e baixa umidade do solo, pode causar perdas substanciais de
13 produção (Kaur et al., 2012).

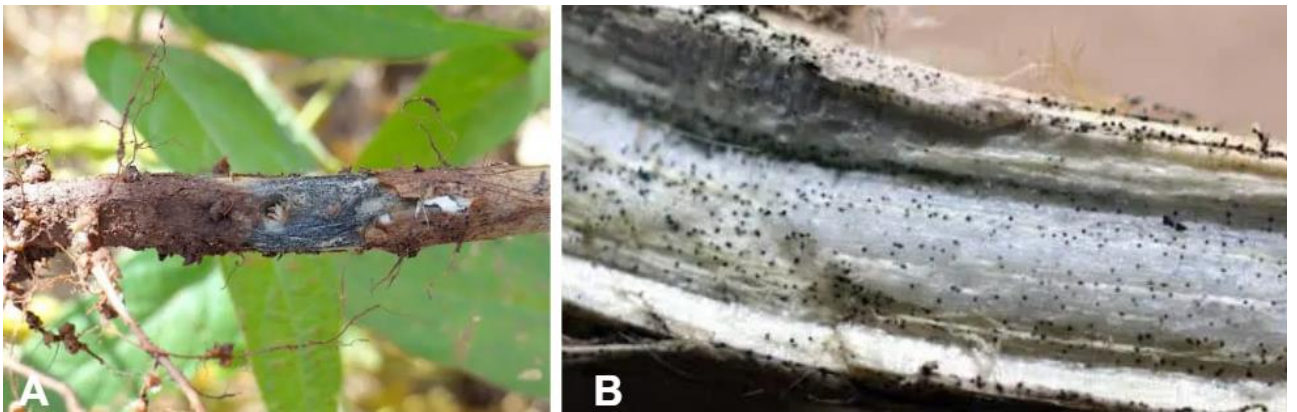
14 O primeiro relato que destacou o impacto significativo dessa doença
15 na cultura da soja no Brasil foi feito por Ferreira et al. (1979), os quais observaram
16 que, em anos caracterizados por condições secas e quentes na região norte do
17 estado do Paraná, as perdas nas cultivares tardias de soja, Viçoja e Santa Rosa,
18 poderiam chegar a 50% devido à infecção por *M. phaseolina*.

19 Esses microrganismos são capazes de formar estruturas
20 denominadas microescleródios, que representam uma forma de resistência do

1 fungo, além de ser um dos principais mecanismos de inóculo do patógeno (Figura 6).
2 Essas estruturas são formadas a partir do micélio fúngico e são encontradas em
3 regiões epidérmicas do caule e raiz da planta parasitadas pelo patógeno. Após a
4 morte e decomposição do hospedeiro, essas estruturas são liberadas no solo,
5 possibilitando a infecção de outras plantas.

6

7 Figura 6 – Sintomas causados por *M. phaseolina* em soja e escleródios presentes no
8 caule de soja



9

10 Legenda: A) caule de soja afetados por *M. phaseolina*; B) microescleródios formados por *M.*
11 *phaseolina* encontrados no caule de soja. Fonte: Banco de imagens da Embrapa.

12

13 Assim como em outras doenças, o método mais prático e econômico
14 para controlar a podridão de carvão na soja seria através do uso de cultivares
15 resistentes. No entanto, até o momento, não foram desenvolvidas cultivares
16 comerciais que sejam totalmente resistentes a esse fungo (Sharma et al., 2023).
17 Apesar disso, foram identificados genótipos moderadamente resistentes que
18 poderiam ser explorados em programas de melhoramento genético da planta
19 (Mengistu et al., 2013).

20

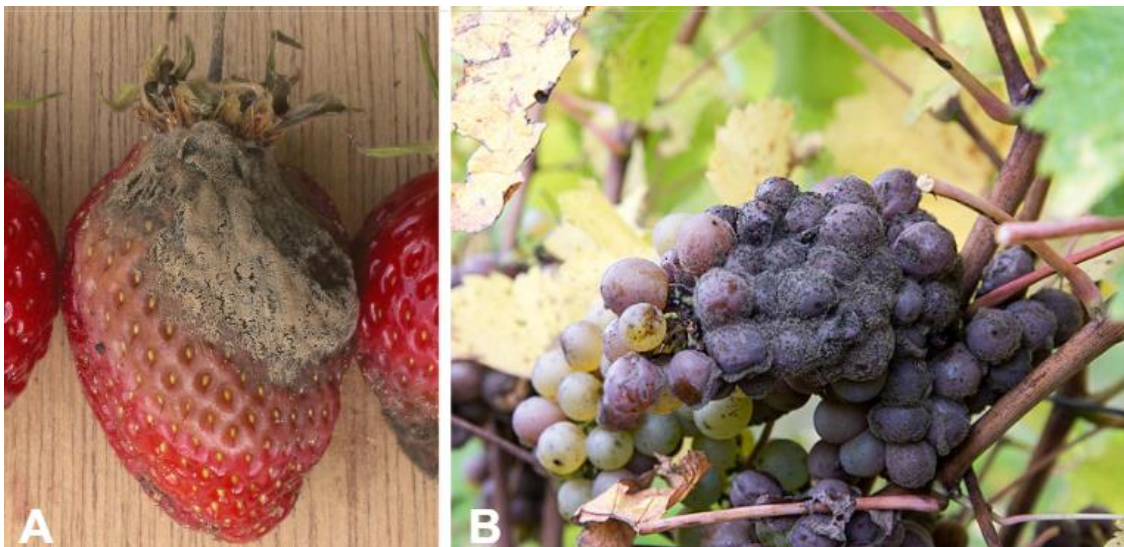
1 2.2.7 *Botrytis cinerea*

2

3 *B. cinerea* representa um fungo ascomiceto generalista que pode ser
4 encontrado em todas as regiões do mundo, sendo responsável por causar doenças
5 como podridão cinzenta dos vegetais, podridão-da flor, mofo-cinzento, podridão-
6 cinza-do-capítulo dentre outras nomenclaturas. O fungo pode atacar diferentes
7 regiões da planta, como folhas e caule, sendo mais frequente em regiões de tecidos
8 moles da planta, como frutas, vegetais e flores, como observado na figura 7 (Bi et
9 al., 2023).

10

11 Figura 7– Aspectos gerais dos sintomas de *B. cinerea* em frutas de morango e uva



12

13 Legenda: A) sintoma causado por *B. cinerea* em morango; B) sintoma de *B. cinerea* observado em
14 uva. Fonte: Rasbak.

15

16 Apesar dos sintomas causados variarem de acordo com o
17 hospedeiro e órgãos infectados, esses são geralmente caracterizados pelo
18 acinzentamento dos tecidos, que apresentam um aspecto úmido e necrótico
19 causados pela presença do patógeno (Töfoli et al., 2011). Esse patógeno apresenta

1 um melhor desenvolvimento em regiões com elevada precipitação e pluviometria, e
2 com temperaturas entre 18 e 23 °C.

3 No Brasil, o fungo é o principal causador de perdas nas culturas de
4 morango (Calvo e Garrido, 2013), onde o patógeno infecta flores e frutos em
5 diferentes estágios de desenvolvimento (Barakat e Al-Masri, 2017). A infecção
6 primária ocorre a partir de conídios, que penetram nos tecidos das plantas e tornam-
7 se quiescentes até o amadurecimento do fruto (Lucon et al., 2009).

8 9 2.3 Controle de Fitopatógenos

10 11 2.3.1 Métodos de controle

12
13 A principal estratégia empregada para o manejo de fitopatógenos é o
14 uso de defensivos químicos-sintéticos, que utilizam ingredientes ativos para eliminar
15 ou inibir o crescimento de microrganismos (Hirooka e Ishi, 2013). Apesar dos
16 benefícios proporcionados, o uso excessivo desses defensivos representa uma
17 ameaça à saúde humana e ao meio ambiente, além de favorecer o desenvolvimento
18 de resistência nos fitopatógenos (Chelinho et al., 2011; Araújo, 2016). Outras
19 estratégias, como rotação de cultura, uso de cultivares resistentes, aplicação de
20 fumigantes e solarização do solo, podem ser empregadas para aumentar a eficiência
21 da produção (Panth; Hassler; Baysal-Gurel, 2020).

22 Uma tecnologia eficaz para reduzir os impactos dos defensivos
23 químicos-sintéticos é a utilização de agentes de controle biológico (BCAs),
24 microrganismos naturalmente antagonistas que impedem o desenvolvimento de
25 fitopatógenos por meio de métodos diretos, como a produção de metabólitos, ou

1 indiretos, induzindo a resistência em plantas (Usta, 2013). O uso desses
2 microrganismos apresenta a vantagem de agir apenas contra o patógeno alvo, além
3 de ser capaz de se manter e se multiplicar no ambiente.

4 5 2.3.2 Microrganismos no controle biológico

6
7 O controle biológico pode ser realizado por diversos grupos de
8 microrganismos, com fungos filamentosos e bactérias se destacando como os
9 principais agentes de controle biológico (BCAs), presentes em diversos produtos
10 registrados (Van Lenteren et al., 2018). A utilização de fungos para o controle de
11 fitopatógenos é eficaz devido a características específicas desses microrganismos,
12 como alta taxa de reprodução, baixo tempo de geração e especificidade de alvo.
13 Gêneros como *Trichoderma*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Penicillium*,
14 *Pichia*, *Talaromyces* e *Clonostachys* representam alguns dos principais grupos
15 estudados e utilizados no controle de diversos grupos de fitopatógenos (Thambugala
16 et al., 2020).

17 O uso de microrganismos no controle de fitopatógenos representa
18 uma tecnologia com uma história significativa. O primeiro biopesticida utilizado para
19 o controle de insetos, à base de *Bacillus thuringiensis*, foi introduzido na Europa em
20 1930 (Milner, 1994). No entanto, o desenvolvimento desses produtos é um processo
21 demorado. Por exemplo, o primeiro fungicida biológico foi lançado apenas em 1989.
22 Há pouco mais de 30 anos, o produto Binab T, contendo *Trichoderma* sp. como
23 princípio ativo, foi introduzido no mercado (Dutta; Deb; Pandey, 2022).

24 Microrganismos de diversos grupos têm sido utilizados e aplicados
25 como possíveis agentes de controle biológico de fitopatógenos. *Beauveria bassiana*,

1 *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* e *Colletotrichum* sp. são exemplos
2 de fungos utilizados como princípios ativos em inseticidas, fungicidas, nematicidas e
3 herbicidas, respectivamente (Chakraborty; Ray, 2021; Gao et al., 2016; Genier et al.,
4 2016; Jouzani; Valijanian; Sharafi, 2017; Sood et al., 2020; Zimmermann, 2007).

5 Esses agentes de controle biológico apresentam diferentes
6 mecanismos para o controle de fitopatógenos, podendo ser agrupados em
7 mecanismos diretos, como predação, parasitismo, competição e antibiose, e
8 indiretos, como a indução de resistência. Compreender esses mecanismos é
9 fundamental para o desenvolvimento de novos produtos que atuem de maneira
10 eficaz, auxiliando no controle de fitopatógenos em diferentes regiões (Mishra et al.,
11 2018).

12 13 2.3.3.1 *Clonostachys rosea*

14
15 As primeiras observações das interações de *C. rosea* com
16 fitopatógenos datam do final da década de 1950, e desde então, tem havido
17 interesse em explorar esse microrganismo como agente de controle biológico (BCA),
18 devido aos seus diversos mecanismos de ação (Barnett e Lilly, 1962; Shigo, 1958).
19 Por ser um fungo generalista, *C. rosea* apresenta várias estratégias para controlar
20 fitopatógenos, incluindo competição por espaço e nutrientes, antibiose e
21 micoparasitismo (Sutton et al., 1997; Fatema et al., 2018).

22 A capacidade de interação de *C. rosea* com diferentes espécies
23 vegetais permite que ele ocupe órgãos que seriam alvos de fungos fitopatogênicos
24 (Saraiva et al., 2015). Essas interações também podem induzir resistência nas
25 plantas, melhorando sua capacidade de resposta aos patógenos (Kamou et al.,

2020; Wang et al., 2019). A antibiose realizada por *C. rosea*, através da produção de metabólitos secundários, é fundamental para o micoparasitismo e o controle de patógenos de plantas (Han et al., 2020; Saraiva et al., 2020).

Competindo por espaço e nutrientes, *C. rosea* pode efetivamente controlar fitopatógenos como *B. cinerea*, impactando diretamente em seu desenvolvimento (Jensen et al., 2017; Sutton et al., 1997). Isso ocorre devido à redução de nutrientes disponíveis para o patógeno, resultando em menor produção de esporos e desenvolvimento mais lento (Morandi et al., 2000).

Os primeiros relatos de micoparasitismo por *C. rosea* foram baseados em estudos de interação em placas de ágar, nos quais o fungo foi capaz de sobrepujar e destruir culturas de diversos fungos, danificando o micélio superficial e, em alguns casos, produzindo pigmentos escuros (Jensen et al., 2022). Essa interação envolve o reconhecimento e ligação das hifas de *C. rosea* ao patógeno, seguido pela formação de apressório e penetração no hospedeiro (Makkonen e Pohjakallio, 1960). Enzimas como quitinases, glucanases e proteases produzidas por *C. rosea* atuam na parede celular dos patógenos, facilitando a penetração (Pachenari e Dix, 1980).

Estudos de microscopia de fluorescência da interação entre *C. rosea* e *F. oxysporum* confirmaram a formação de apressório durante a penetração (Karlsson et al., 2015). Por outro lado, análises de microscopia eletrônica de varredura da interação entre *C. rosea* e *B. cinerea* mostraram exemplos de penetração direta sem a formação de apressórios, resultando em desintegração citoplasmática (Li et al., 2002). O micoparasitismo de oomicetos fitopatogênicos, como *Pythium aphanidermatum* e *P. ultimum*, também foi relatado para *C. rosea* (Chatterton e Punja, 2009; Mamarabadi et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos microrganismos

A linhagem LABIM-LF027 utilizada nos experimentos foi isolada do solo de uma região de floresta estacional semidecídua localizada na região da Universidade Estadual de Londrina (-23.3287879841484, -51.20575613285868). O isolado LABIM-LF027 encontra-se armazenado a -80 °C, sendo pertencentes a coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM), Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Os demais microrganismos utilizados no estudo *C. cassicola*, *F. solani*, *C. kikuchii*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *B. cinerea* estão mantidos na coleção. Para a ativação das cepas, inóculos foram realizados em placas com ágar Batata Dextrose (PDA), e incubados a 25 °C por 7 dias.

3.2 Caracterização morfológica e crescimento

As características morfológicas de LABIM-LF027 foram estudadas em diferentes meios de cultura solidificados, sendo esses: ágar extrato de levedura sacarose (YES), ágar Czapek (CZ), ágar extrato de malte (MEA), ágar batata dextrose (PDA) e ágar Sabouraud dextrose (SBA). As cepas foram inoculadas em 3 pontos de uma placa de Petri 90 – mm, e incubadas por 7 dias, a 20, 24 e 28 °C, em ambiente claro, escuro e com fotoperíodo afim de observar o meio que favorecesse o melhor crescimento do *C. rosea*. Os inóculos foram preparados utilizando uma solução de conídios na concentração de 1×10^7 . Após a incubação, o diâmetro das colônias nos

1 diferentes meios e temperaturas foram medidos com a utilização de um paquímetro. A
2 coloração das colônias na superfície e fundo das placas de Petri também foram
3 determinados.

4 5 3.3 Extração do DNA e sequenciamento

6
7 O isolado LABIM-LF027 foi cultivado em caldo batata-dextrose
8 (PDB) em shaker, 150 rpm a 28 ° C durante 4 dias, e o DNA foi extraído de acordo
9 com o protocolo de Raeder e Broda (1985). Para a análise filogenética, a região
10 parcial do gene ITS 5.8S foi amplificada e sequenciada utilizando os primers ITS1 e
11 ITS4 (White et al. 1990), conforme descrito por Noriler et al. (2018). A curadoria dos
12 cromatogramas e das sequências foram realizados conforme descrito por Noriler et
13 al., (2019). A análise de similaridade da sequência ITS foi realizada através da
14 comparação das sequências ITS presentes no banco de dados GenBank do NCBI
15 (*National Center for Biotechnology Information*).

16 17 3.4 Antagonismo contra fungos fitopatogênicos

18 19 3.4.1 Cultura dupla

20
21 O ensaio foi conduzido utilizando o método de cultura dupla. Um
22 *spot* de ágar contendo micélio foi colocado no centro de placas de Petri contendo
23 meio de cultura BDA (Kasvi), enquanto na extremidade oposta um *spot* de ágar
24 contendo micélio de LABIM-LF027 foi colado. Dois tratamentos foram testados para
25 a atividade de LABIM-LF027 em cultura dupla, onde o fungo foi inoculado ao mesmo

1 tempo com os patógenos e com antecedência de 4 dias. Um tratamento de controle,
2 sem inóculo fúngico, foi preparado para monitorar o crescimento do fungo.

3 As placas foram incubadas em uma câmara BOD a 25°C, com um
4 fotoperíodo de 12 horas. O tempo de incubação foi determinado pelo crescimento do
5 controle; quando o fungo crescia por toda a placa, o experimento era encerrado. Os
6 ensaios foram realizados em placas de 90 mm. O experimento foi realizado em
7 triplicata.

8 O teste de cultura dupla foi delineado para determinar a atividade
9 antagonista com base na avaliação da porcentagem de inibição de crescimento
10 radial (ICR) conforme descrito por Royse e Ries em 1978. A ICR é calculada pela
11 fórmula:

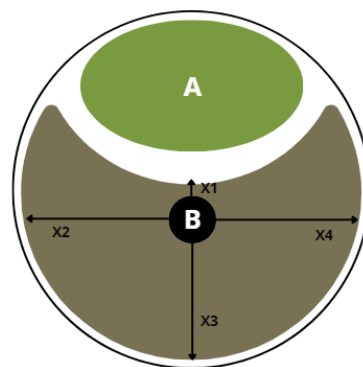
$$12 \quad ICR = \left(\frac{\left[\frac{X2 + X3 + X4}{3} \right] - X1}{\frac{X2 + X3 + X4}{3}} \right)$$

13

14 O diagrama presente na figura 8 representa as medidas utilizadas
15 em centímetros para a realização dos cálculos.

16

17 Figura 8 – Medidas utilizadas para o cálculo de inibição de crescimento radial.



18

19 Legenda: A) *Spot* de *C. rosea*; B) *Spot* do fungo fitopatogênico. Fonte: Adaptado de Royse e
20 Ries, 1978

3.5 Microscopia eletrônica de varredura

As colônias foram cultivadas em BDA por 7 dias foi removida e fixada em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em 0,1 M de tampão de cacodilato de sódio (pH 7,2) a 4°C. As amostras foram mantidas nesta solução durante a noite para fixação, após foram lavadas três vezes com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 10 minutos, seguido por desidratação três vezes por 10 minutos em uma série de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%). As amostras foram então submetidas à hexametildisilazano (HMDS) e revestidas com ouro (Revestidora por pulverização BALTEC SDC 050) e observadas com um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 operando a 25,0 kV.

3.6 Fermentação sólida em arroz

A fermentação em estado sólido utilizando arroz foi realizada com 200 g de arroz branco (Butuí), umedecido com 40% (m/v) e depositados em sacos plásticos de polipropileno nas medidas de 24x33 cm.. O tratamento 1 utilizou de um inóculo produzido a partir de uma fermentação líquida, enquanto o tratamento 2 foi utilizado de um proveniente de conídios aéreos de uma cultura crescida durante 14 dias em BDA e preparado adicionando 5 ml de uma solução de polissorbato a 0,01% (Tween 80) para a coleta dos esporos. Os sacos contendo a massa de arroz úmido foram inoculados com volume de 10% relativo à massa total, nas concentrações de 1×10^6 . Os tratamentos foram mantidos em BOD a 28 °C com 12h de fototase durante sete dias. Transcorrido esse período a massa de arroz contendo os conídios foi peneirado utilizando uma sequência de tamizes de abertura de 0.250 mm, 0.05 mm. Após essas etapas, uma diluição seriada foi realizada e com o auxílio de uma câmera de

1 Neubauer foi realizada a contagem de conídios em microscópio de luz com aumento
2 de 400x.

3

4 3.7 Análises estatísticas

5

6 Para os experimentos descritos nos itens, todos os dados obtidos
7 foram analisados pelo teste de ANOVA e Tukey para verificar adequação aos
8 pressupostos de normalidade dos resíduos, homogeneidade das variâncias e
9 independência dos resíduos, respectivamente ($p < 0,05$).

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

1 4. RESULTADOS

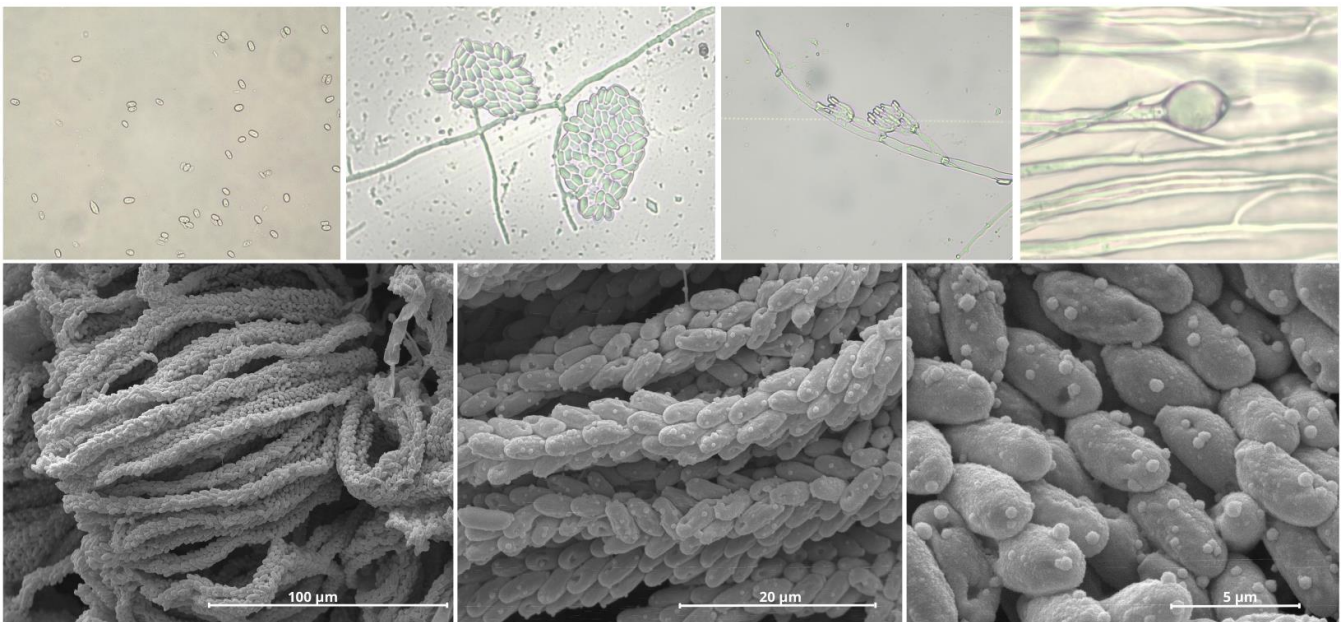
2 4.1 Caracterização macro e microscópica

3

4 A análise morfológica de LABIM-LF027 em cinco meios de cultura
 5 distintos, sob diferentes temperaturas e fotoperíodos, revelou que o fungo pode
 6 exibir diversas características macroscópicas, as quais variam de acordo com os
 7 parâmetros testados. Sob análise em microscopia óptica, não foram observadas
 8 diferenças morfológicas significativas em LABIM-LF027 em nenhum dos tratamentos
 9 avaliados.

10

11 Figura 9 – Imagem das estruturas características de LABIM-LF027 encontrada nos
 12 diferentes meios.



13

14 Legenda: A) conídios de LABIM-LF027; B) Conidióforos penicilados; C) Conidióforos verticilados; D)
 15 Clamidósporo de LABIM-LF027. Fonte: autor.

16

17

18 Em todos os meios de cultura avaliados (BDA, CZ, MEA, SB e YES),
 19 as hifas produzidas por LABIM-LF027 apresentaram um aspecto aveludado no
 anverso da placa, com o reverso com pigmentação acastanhada/ avermelhada, com

1 bordas levemente amareladas (Figuras 10, 11 e 12). Quanto à coloração das
2 estruturas, observou-se diferença em apenas um dos meios de cultura testados:
3 enquanto nos meios BDA, MEA, SB e YES as hifas exibiram uma coloração
4 alaranjada, no meio CZ apresentaram um aspecto esbranquiçado. Notavelmente, no
5 meio SB, o fungo apresentou uma característica peculiar, onde as regiões próximas
6 ao inóculo exibiram uma coloração diferente daquelas observadas nas hifas
7 distantes do centro da colônia. Essas variações podem ser visualizadas nas figuras
8 10, 11 e 12

9

10

11

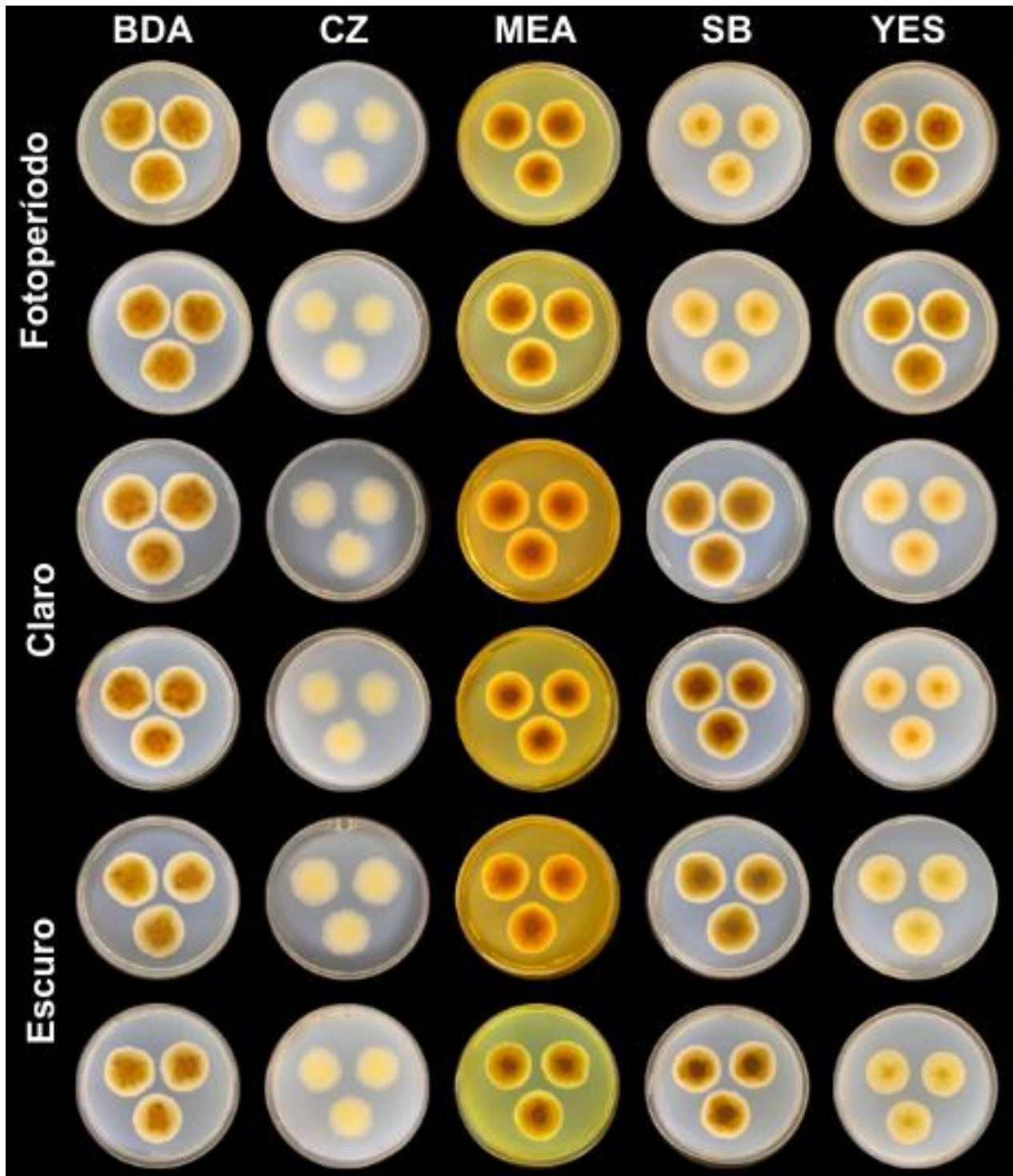
12

13

14

1

Figura 10 – Crescimento de LABIM-LF027 em diferentes meio e fotoperíodos em 20°C.



2 Legenda: Da esquerda para direita: características macroscópicas do verso e inverso de LABIM-
 3 LF027 nos meios BDA, CZ, MEA, SB e YES em 3 luminosidades diferentes, fotoperíodo, claro e
 4 escuro.

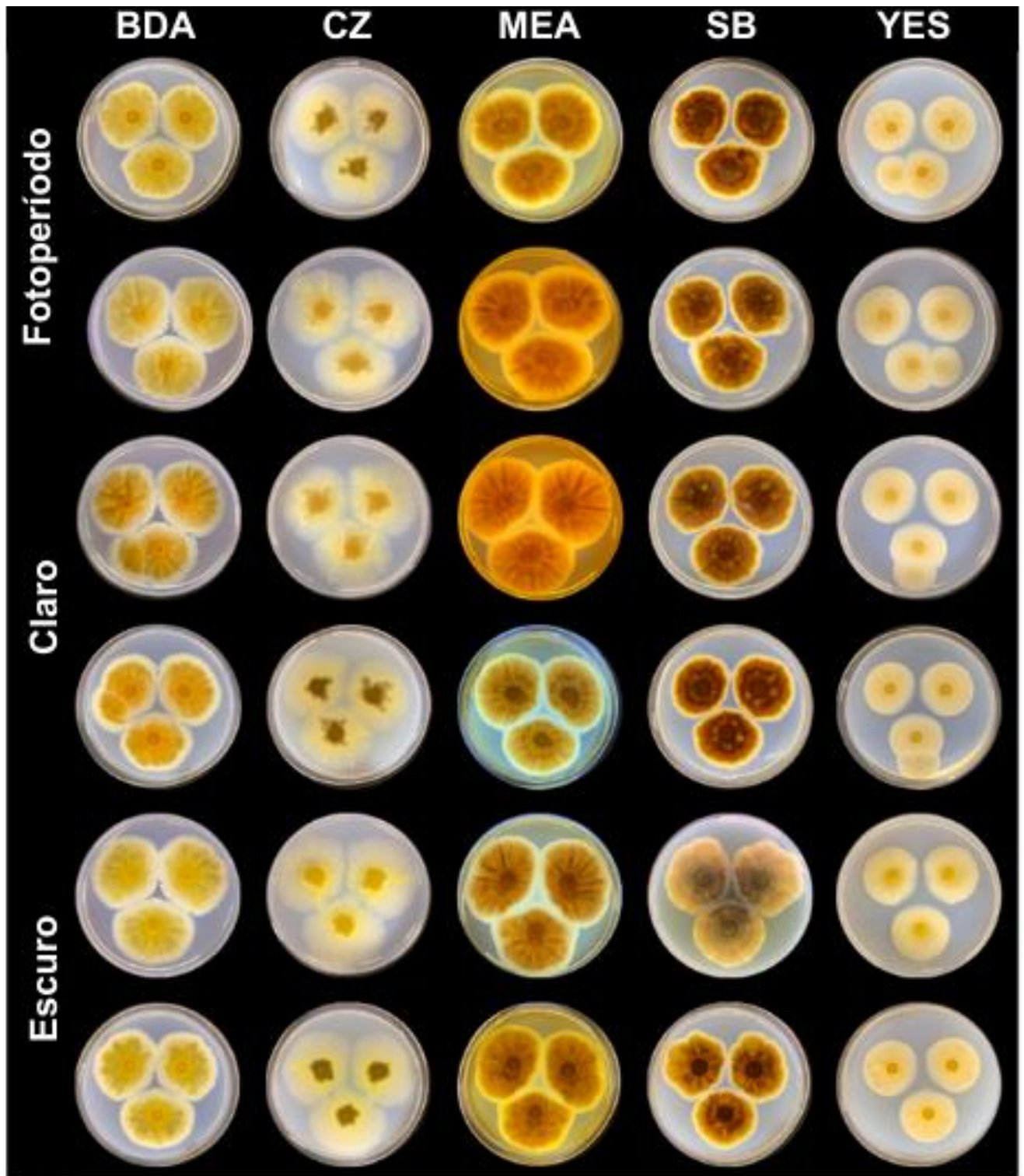
5

6

7

1
2

Figura 11 - Crescimento de LABIM-LF027 em diferentes meio e fotoperíodos em 24°C

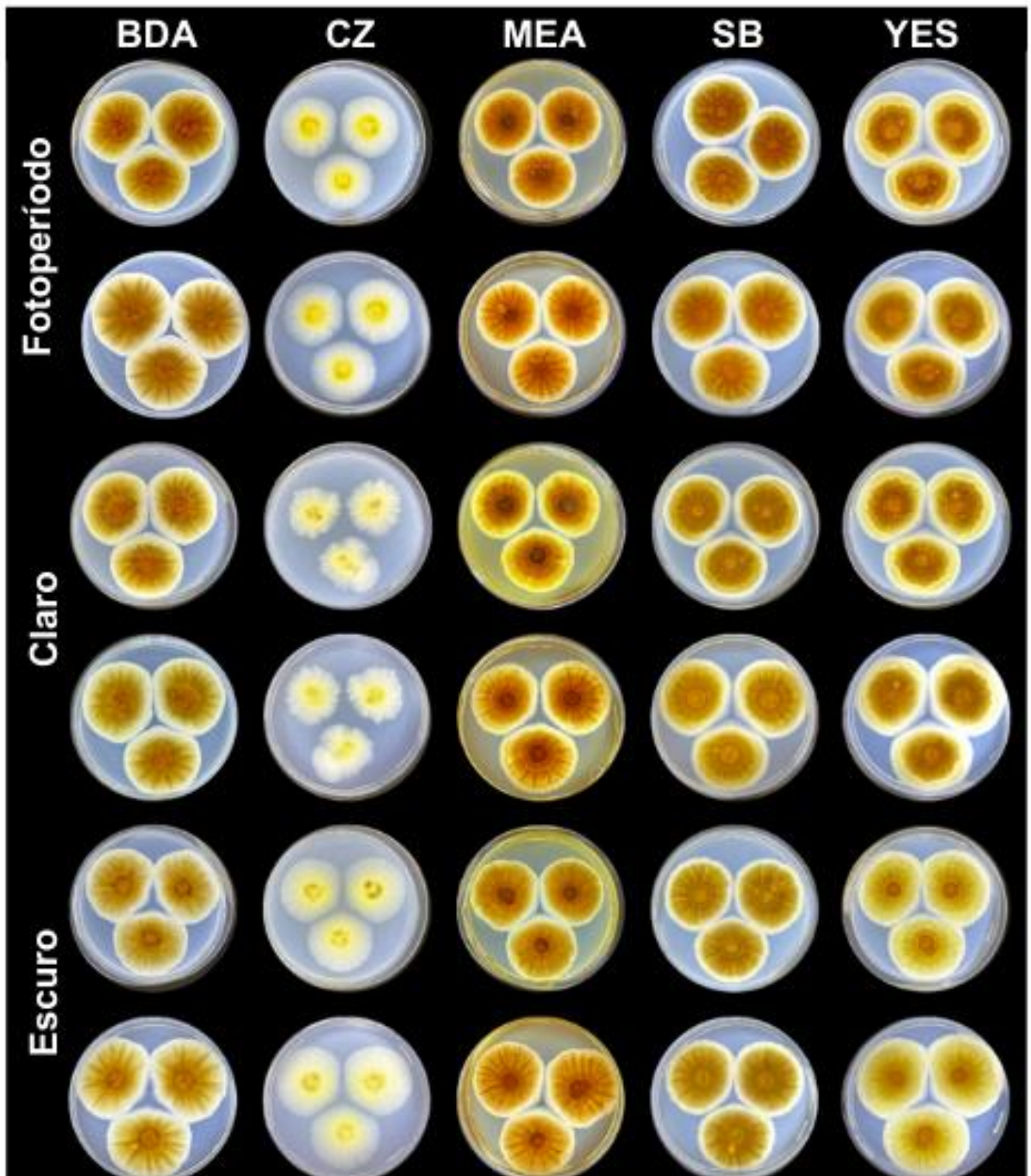


3 Legenda: Da esquerda para direita: características macroscópicas do verso e inverso de LABIM-
 4 LF027 nos meios BDA, CZ, MEA, SB e YES em 3 luminosidades diferentes, fotoperíodo, claro e
 5 escuro.

6
7

1

Figura 12 - Crescimento de LABIM-LF027 em diferentes meio e fotoperíodos em 28°C.



2 Legenda: Da esquerda para direita: características macroscópicas do verso e inverso de LABIM-
 3 LF027 nos meios BDA, CZ, MEA, SB e YES em 3 luminosidades diferentes, fotoperíodo, claro e
 4 escuro.
 5
 6
 7

4.2 Avaliação do crescimento

O crescimento de LABIM-LF027 demonstrou variações significativas em resposta aos diferentes parâmetros testados. Os resultados indicaram que o meio de cultura, a iluminação e a temperatura tiveram efeitos marginalmente significativos, com valores de p próximos a 0,05, sobre a variável dependente, ou seja, o crescimento do fungo. Especificamente em relação à temperatura, os resultados sugerem que ela exerceu uma influência significativa no crescimento de LABIM-LF027.

Tabela 1 – Crescimento em cm de LABIM-LF027 nos diferentes parâmetros testados.

	20°C			24°C			28°C		
	Fotoperíodo	Claro	Escuro	Fotoperíodo	Claro	Escuro	Fotoperíodo	Claro	Escuro
BDA	3,09 bCd	3,1 abCd	2,82 aCd	4 bCc	4,1 abCc	4,05 aCc	3,85 bCc	3,91 abCc	3,94 aCc
CZ	2,55 bBd	2,63 abBd	2,69 aBd	4,02 bBc	4,08 abBc	4,22 aBc	3,18 bBc	2,82 abBc	3,16 aBc
MEA	2,75 bAd	2,75 abAd	2,67 aAd	4,36 bAc	4,45 abAc	4,31 aAc	3,71 bAc	3,84 abAc	3,72 aAc
SB	2,79 bAd	3,11 abAd	2,81 aAd	3,55 bAc	3,83 abAc	3,78 aAc	3,46 bAc	3,94 abAc	3,77 aAc
YES	2,48 bAd	2,57 abAd	2,3 aAd	2,91bAc	3,06 abAc	3,01 aAc	3,9 bAc	4,12 abAc	4,11 aAc

Os resultados da análise estatística indicaram que os tratamentos MEA, YES e SB apresentaram médias semelhantes, indicadas pela letra "a", o que sugere que não há diferença estatisticamente significativa entre esses tratamentos. Por outro lado, os tratamentos CZ e BDA apresentaram médias diferentes, indicadas pelas letras "b" e "c", respectivamente, o que sugere que eles são significativamente diferentes dos outros tratamentos.

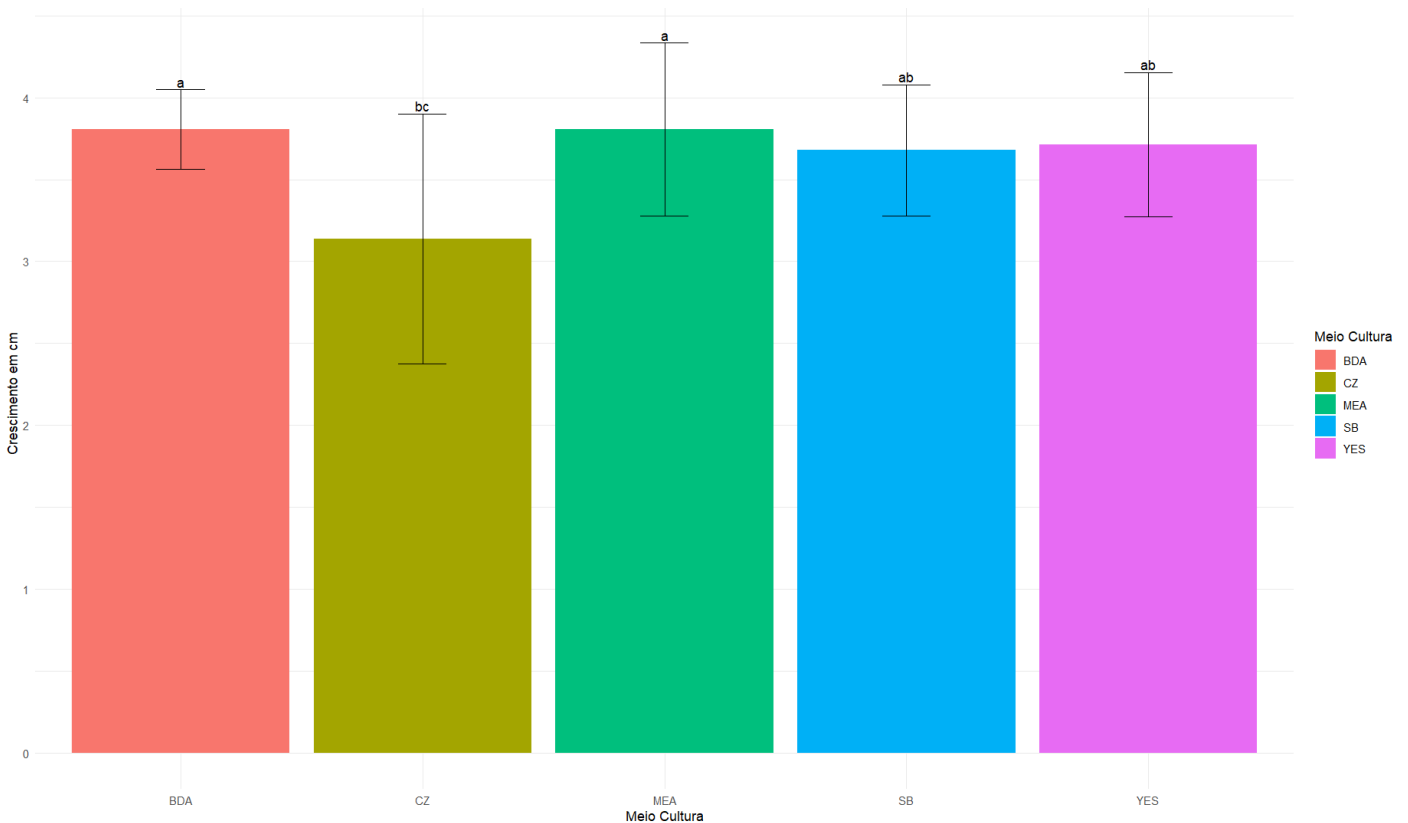
Em relação aos tratamentos de luminosidade ("Escuro", "Claro" e "Fotoperíodo"), os resultados indicaram médias diferentes, indicadas pelas letras "a", "ab" e "b", respectivamente. Isso sugere que há diferenças significativas entre esses tratamentos. O tratamento "Escuro" apresentou a maior média, seguido por "Claro" e

1 "Fotoperíodo", indicando uma possível tendência de efeito da luminosidade no
2 resultado da variável medida.

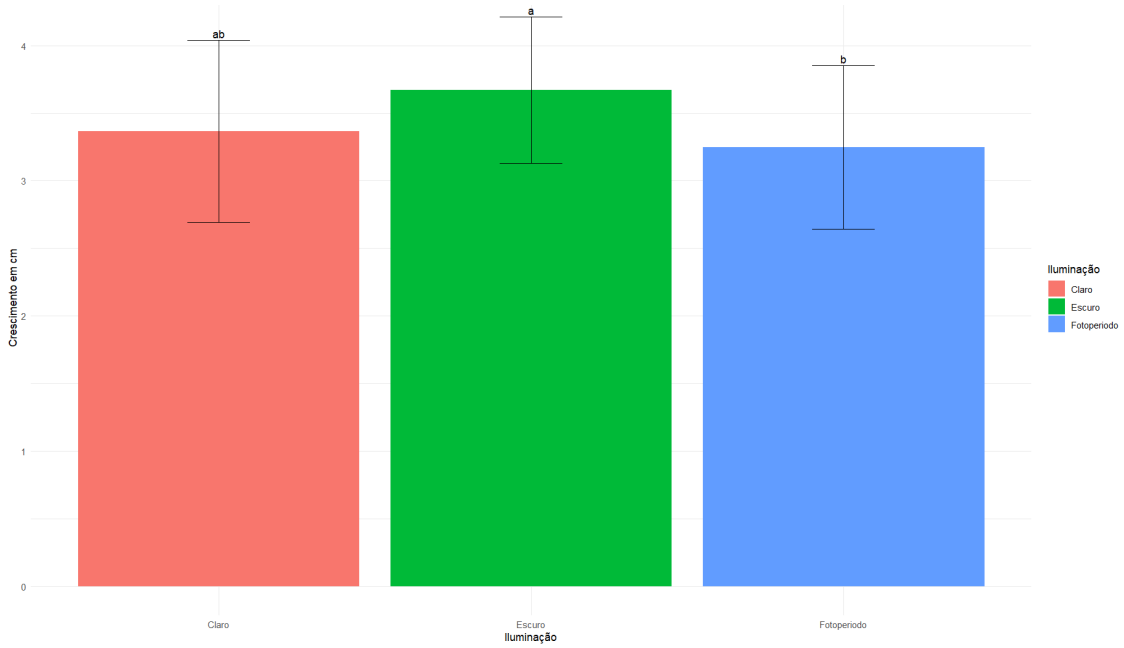
3 Os dados da temperatura mostraram que os tratamentos com
4 médias de valor "a" (24 e 28) não são estatisticamente diferentes entre si, enquanto
5 o tratamento com média "b" (20) é estatisticamente diferente dos tratamentos "a".
6 Isso significa que há uma diferença significativa entre o tratamento com média "b" e
7 os tratamentos com média "a". Neste caso, o tratamento "20" teve uma média
8 significativamente menor do que os tratamentos "24" e "28".

9

10 Figura 13 – Crescimento de LABIM-LF027 em diferentes meios de cultura.

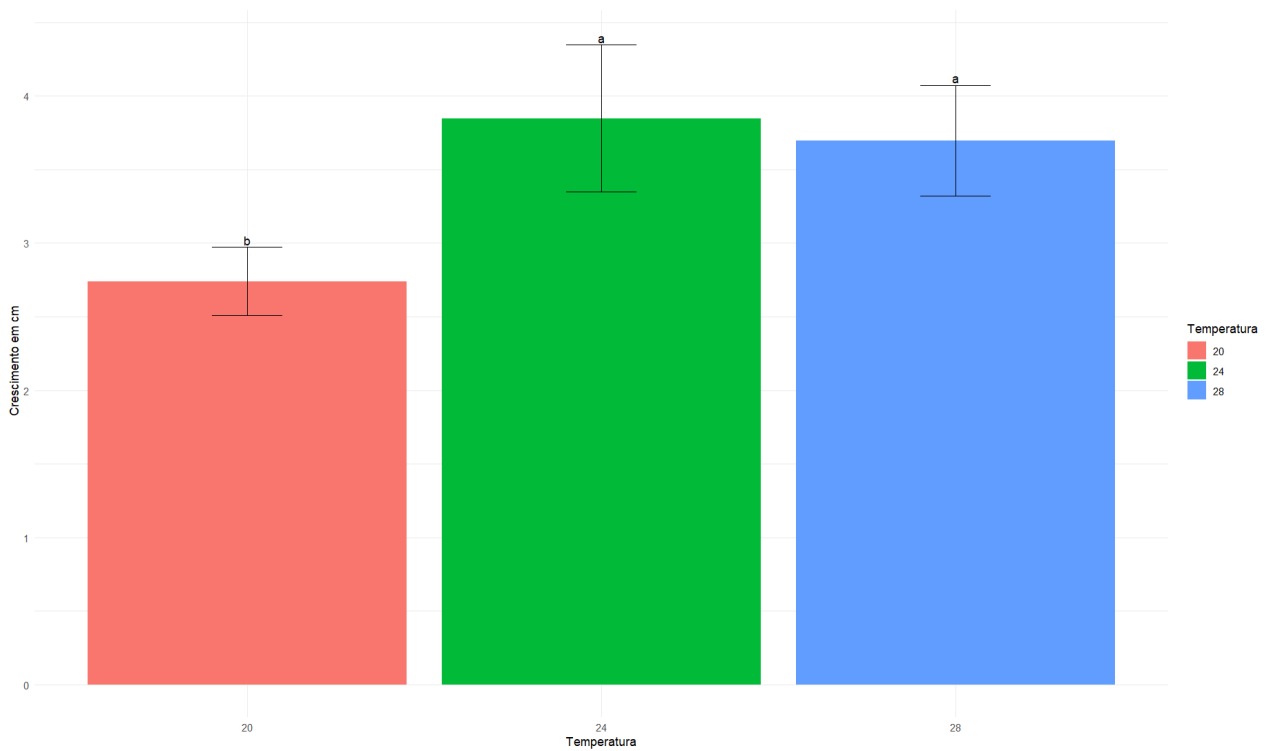


11 Figura 14 – Crescimento de LABIM-LF027 em diferentes tempos de iluminação.



1
2
3

Figura 15 – Crescimento de LABIM-LF027 em diferentes temperaturas.



4
5
6
7
8
9
10
11

4.3 Sequenciamento

1 A sequência consenso obtida neste estudo foi comparada com
2 sequências tipo na base de dados do NCBI através da ferramenta BLAST. O
3 resultado obtido através do BLAST indicou que o isolado LABIM-LF027 apresenta
4 maior similaridade com a sequência tipo do fungo *Clonostachys*. Contudo conforme
5 indicado na literatura outras regiões deverão ser sequenciadas para realizar a
6 análise filogenética e identificar o isolado a nível de espécie.

7 8 4.4 Antagonismo contra fungos fitopatogênicos

9
10 Nos estudos sobre o antagonismo de LABIM-LF027, observou-se
11 que o fungo possui a capacidade de reduzir o crescimento micelial de fungos
12 fitopatogênicos avaliados (Figura 17). Esse efeito foi mais pronunciado quando o
13 fungo foi cultivado por quatro dias antes dos patógenos. Além disso, verificou-se que
14 *C. rosea* foi capaz de crescer sobre os fitopatógenos na maioria dos ensaios,
15 resultando em alterações na coloração das hifas, particularmente observadas em
16 *Fusarium solani*. Utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível
17 observar esporos de *C. rosea* sob as hifas dos fitopatógenos (Figura 18).

18 É importante ressaltar que os resultados dos ensaios de cultura
19 dupla avaliam a inibição apenas na região em que LABIM-LF027 está presente, não
20 considerando o desenvolvimento total do patógeno na placa. Os ensaios
21 demonstraram diferenças significativas entre os tempos de inóculo, sendo que o
22 tratamento com inóculo anterior (IT) apresentou uma média de inibição maior do que
23 o tratamento com inóculo simultâneo (IS). As interações entre LABIM-LF027 e os
24 patógenos foram visualizadas por MEV, conforme demonstrado na figura.

25 Os resultados das análises estatísticas de acordo com o teste
26 ANOVA indicam que não há diferença significativa entre os grupos IS e IT em

1 relação à variável "ICR". Os dois grupos têm médias semelhantes, indicando que
 2 não há evidência estatística para afirmar que um grupo é diferente do outro em
 3 termos da média da variável analisada.

4

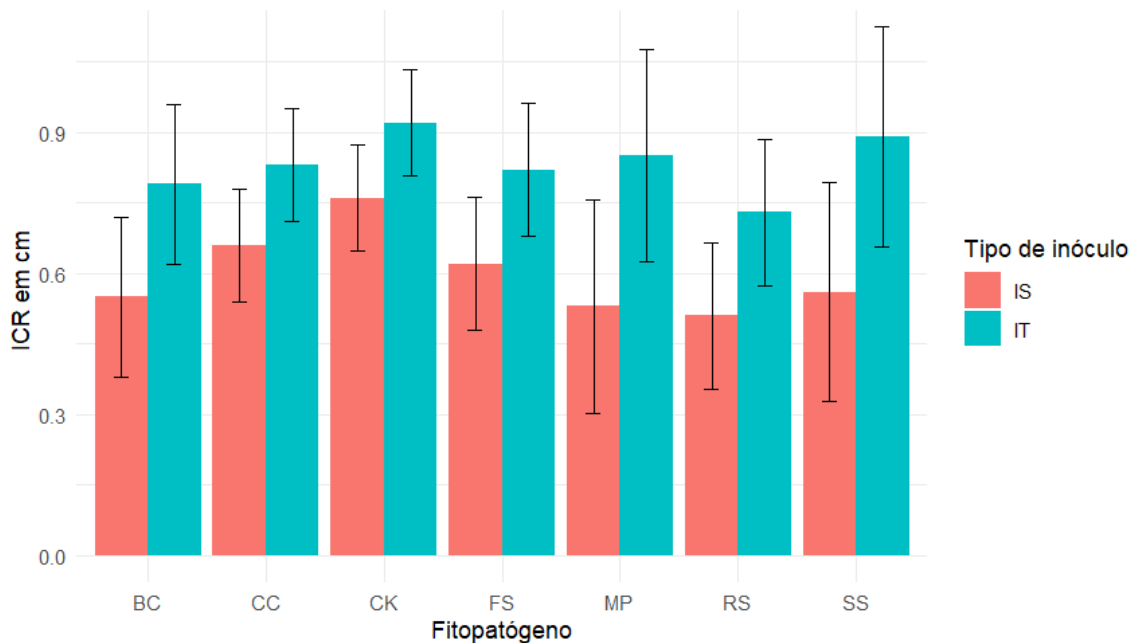
5 Tabela 2 – Inibição do crescimento radial utilizando 2 inóculos diferentes de *C.*
 6 *rosea*.

Inóculo	ICR						
	BC	SS	CC	FS	CK	MP	RS
IT	0,79 a	0,89 a	0,83 a	0,82 a	0,92 a	0,85 a	0,73 a
IS	0,55 a	0,56 a	0,66 a	0,62 a	0,76 a	0,53 a	0,51 a

7 Legenda: Inóculo anterior (IT); inóculo simultâneo (IS); *Botrytis cinerea* (BC); *Sclerotinea sclerotiorum*
 8 (SS); *Corinespora cassicola* (CC); *Fusarium solani* (FS); *Cercospora kikuchii* (CK); *Macrophomina*
 9 *phaseolina* (MP); *Rhizoctonia solani* (RS)

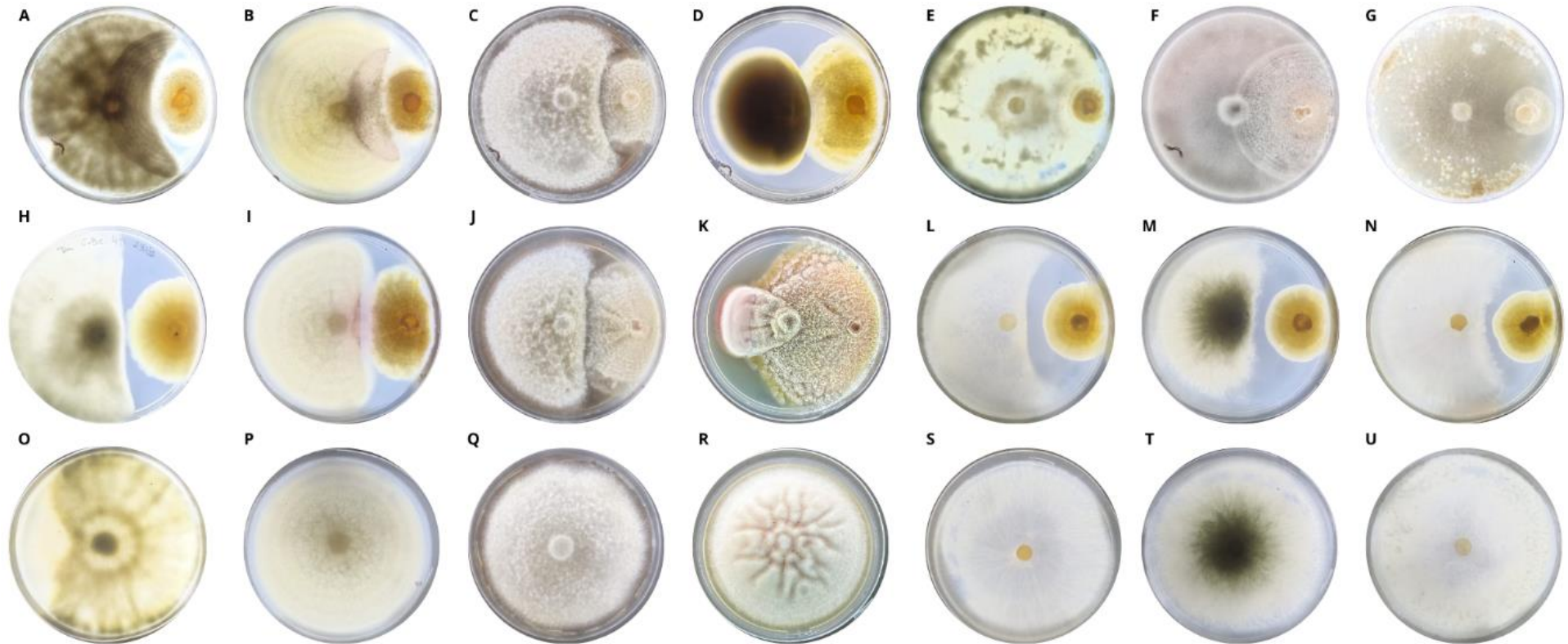
10

11 Figura 16 – Valores de ICR de acordo com o tipo de inóculo de LABIM-LF027.



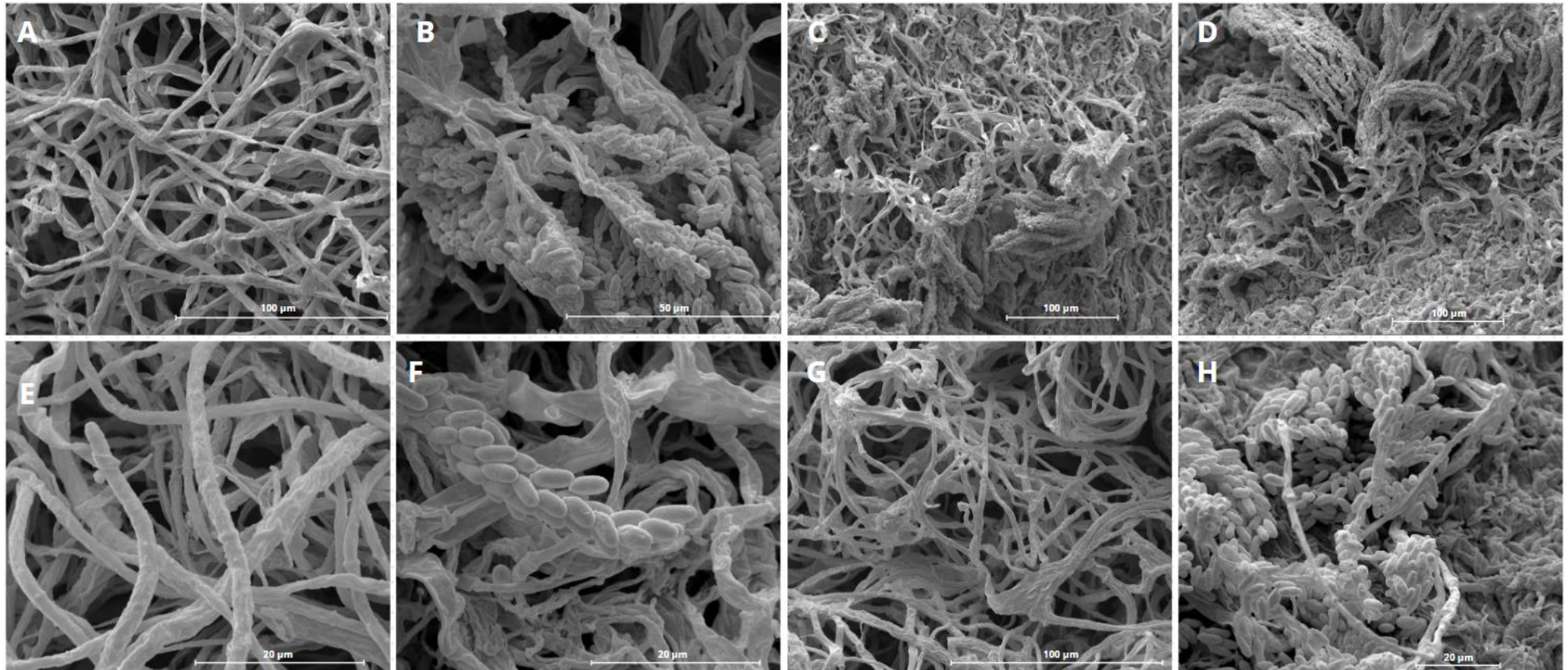
12

1
2 Figura 17 – Controle de fitopatógenos por LABIM-LF027 em cultura dupla.



3
4
5 Legenda: Primeira fileira horazontal: controle de fitopatógenos por LABIM-LF027 em inóculos simultâneos. A) *B. cinerea*; B) *F. solani*; C) *C. cassicola*; D) *C.*
6 *kikuchii*; E) *S. sclerotiorum*; F) *M. phaseolina*; G) *R. solani*. Segunda fileira horizontal: controle de fitopatógenos por LABIM-LF027 com intervalo de 4 dias. H)
7 *B. cinerea*; I) *F. solani*; J) *C. cassicola*; K) *C. kikuchii*; L) *S. sclerotiorum*; M) *M. phaseolina*; N) *R. solani*. Terceira fileira horizontal: controle dos fungos
8 fitopatógenos. O) *B. cinerea*; P) *F. solani*; Q) *C. cassicola*; R) *C. kikuchii*; S) *S. sclerotiorum*; T) *M. phaseolina*; U) *R. solani*. Fonte: autor

1
2 Figura 18 – MEV de culturas duplas de LABIM-LF027.



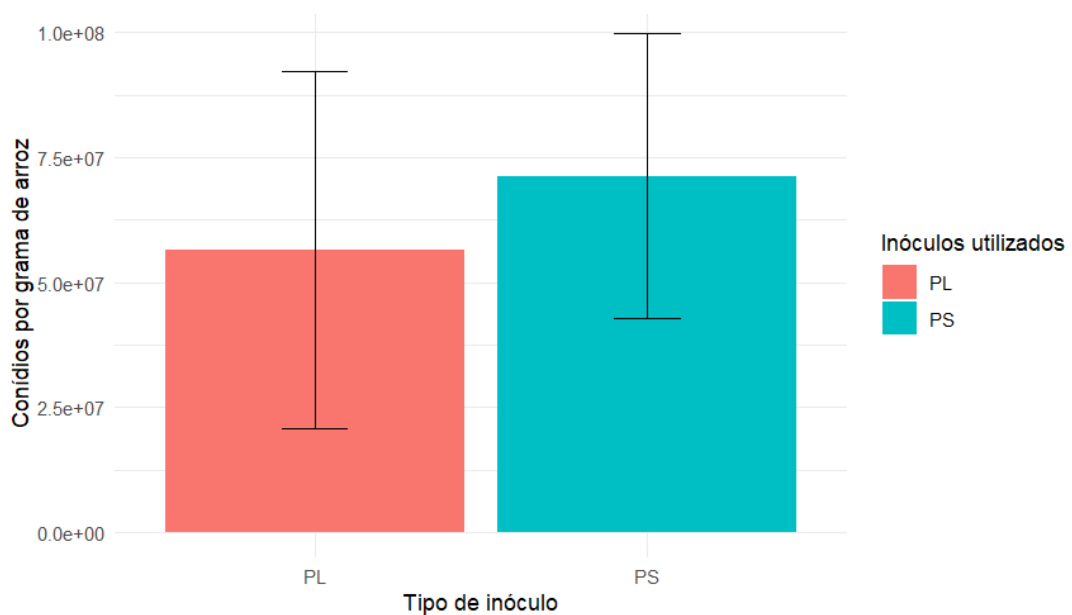
3
4 Legenda: A) Hifas de *B. cinerea* em MEV; B) *B. cinerea* em cultura dupla com LABIM-LF027 em MEV C) *R. solani* em cultura dupla com LABIM-LF027 em
5 MEV D) Hifas de *R. solani* em MEV; E) *M. phaseolina* em cultura dupla com LABIM-LF027 em MEV F) Hifas de *S. sclerotiorum* em MEV G) *S. sclerotiorum*
6 em cultura dupla com LABIM-LF027 em MEV H) Hifas de *M. phaseolina* em MEV. Fonte: autor.

4.5 Fermentação sólida em arroz

A hipótese deste estudo foi verificar se a forma de inóculo teria influência na produção de conídios em arroz por LABIM-LF027. O inóculo derivado das culturas crescidas em BDA apresentou uma média de $6,37 \times 10^7$ conídios/g, enquanto o inóculo da suspensão feito com pré-cultura líquida conferiu uma média de $4,47 \times 10^7$ conídios/g, concluindo que não há diferença estatística na produção de conídios entre as duas formas de inóculo testadas (Figura 19).

Os resultados das análises estatísticas de acordo com o teste ANOVA indicam que não há diferença significativa entre os inóculos PL e PS em relação à variável " conídios/g ". Os dois grupos têm médias semelhantes, indicando que não há evidência estatística para afirmar que um grupo é diferente do outro em termos da média da variável analisada.

Figura 19 – Produção de conídios em fermentação sólida em arroz.



Legenda: Inóculo líquido (PL); inóculo sólido (PS).

5 DISCUSSÃO

A principal estratégia utilizada para o controle de fitopatógenos nos tempos contemporâneos se dá pelo uso de defensivos químicos sintéticos, que apesar de essencial para a produção de alimentos apresentam riscos à saúde humana e ambiental. O uso de bio defensivos tem crescido significativamente em todo o mundo, representando atualmente cerca de 5% do mercado global de defensivos agrícolas. Estima-se que a partir de 2040, essa porcentagem aumente drasticamente, alcançando cerca de 50% do mercado (DAMALAS; KOUTROUBAS, 2018; PATHMA et al., 2021).

No Brasil, esse mercado movimenta aproximadamente 1 bilhão de reais por ano, com um crescimento anual de cerca de 6% (VIDAL et al., 2022). Essa tendência de crescimento é impulsionada por medidas públicas que incentivam o desenvolvimento e uso de bio defensivos. Recentemente, o Brasil implementou duas importantes medidas governamentais nesse sentido: o Plano Nacional de Bio insumos, em 2020, por meio do Decreto nº 10.375, e o Plano Nacional de Fertilizantes, em 2022. Essas iniciativas têm como objetivo promover o desenvolvimento e uso de bio insumos de forma geral, o que inclui os bio defensivos (SAE, 2021).

Entre esses microrganismos os fungos representam potenciais agentes que podem contribuir para o manejo de pragas, onde espécies como *B. bassiana*, *T. harzianum* e *P. lilacinus* já são amplamente utilizados no mercado. *C. rosea* representa um potencial agente no controle de fungos fitopatogênicos, apresentando diversos mecanismos que podem ser aplicados de forma industrial.

1 Elementos como a produção em larga escala são necessários para a
2 viabilização e utilização agrícola desse fungo agente no controle biológico.
3 Processos como a fermentação líquida e fermentação sólida já são realizados para
4 avaliar o potencial de *C. rosea* como possível BCA (Zhang et al., 2014; de Andrade
5 et al., 2018). A delimitação de parâmetros básicos a partir diferentes ensaios podem
6 auxiliar no desenvolvimento dessas tecnologias.

7 A morfologia de LABIM-LF027 pode apresentar diferenças
8 relacionadas ao meio de cultura de crescimento, luminosidade e temperatura, fatores
9 importantes para a identificação e cultivo do fungo em condições controladas. As
10 análises permitiram distinguir diferentes fenótipos que LABIM-LF027 pode expressar,
11 estando diretamente relacionado aos seus fatores de crescimento. A coloração típica
12 pode ser observada, onde as colônias apresentam um tom amarelo/alaranjado
13 quando crescidos em meios como BDA e SB (Sutton et al., 1997).

14 Além disso, foi possível observar as principais estruturas
15 necessárias para uma possível classificação do fungo, onde a presença de esporos
16 característicos, tanto por microscopia óptica como em MEV, conidióforos verticilados
17 e penicilados, e clamidósporos foi observada. Conforme observado, o fungo também
18 apresentou diferentes aspectos, como a coloração esbranquiçada, fator que pode
19 ocorrer tanto devido a ausência de luz, como a disponibilidades de nutrientes no
20 meio (Sutton et al., 1997; Schroers et al., 1999).

21 O crescimento do fungo observado no estudo demonstrou que
22 diferentes fatores podem afetar no crescimento de LABIM-LF027. Os resultados da
23 análise estatística indicam que os tratamentos MEA, YES e SB não apresentaram
24 diferenças estatisticamente significativas entre si, enquanto os tratamentos CZ e
25 BDA foram significativamente diferentes dos demais. Em relação à luminosidade, os

1 tratamentos "Escuro", "Claro" e "Fotoperíodo" apresentaram diferenças
2 significativas, com o "Escuro" tendo a maior média. Quanto à temperatura, os
3 tratamentos a 24 e 28 graus não foram estatisticamente diferentes entre si, mas
4 ambos foram significativamente diferentes do tratamento a 20 °C, que teve uma
5 média menor.

6 De acordo com a literatura, a produção de *C. rosea* tem sido feita
7 utilizando diferentes condições de temperatura (variando de 18 a 30 °C) e de
8 fotoperíodo (12 h de luz, 14 h de luz ou 24 h de luz por dia). Nas placas presentes
9 em ambientes com 24 °C e 28 °C. no escuro apresentaram o melhor crescimento.
10 Diferenças também foram observadas na formação de hifas aéreas, onde em
11 ambiente escuros havia uma maior formação quando comparada ao ambiente com
12 fotoperíodo e claro. Esses resultados sugerem uma possível influência da
13 luminosidade e da temperatura nos resultados das variáveis medidas, sendo
14 relevante para sua aplicação prática.

15 Conforme descrito por SUTTON et al. (1997), as colônias do fungo
16 *C. rosea* em ágar geralmente apresentam colorações esbranquiçadas, alaranjadas
17 ou salmão. Porém, a existência de trabalhos que discutam as condições específicas
18 que levam o fungo a exibir essa variação de coloração são escassas, nem sua
19 função ou o que poderia ser responsável por ela, como um pigmento de proteção ou
20 um composto com outra função que, por coincidência, é pigmentado. De modo geral,
21 sabe-se que a luz influencia os fungos de diversas maneiras, podendo afetar o
22 metabolismo, o crescimento, o desenvolvimento sexual e assexual, a formação de
23 pigmentos, o tropismo, entre outros (SÁNCHEZ-MURILLO et al., 2004).

24 O isolado utilizado no estudo teve a análise de similaridade da sequência
25 ITS realizada, indicando a sequência tipo do fungo *Clonostachys*. A partir das

1 análises, estudos envolvendo o controle de fitopatógenos podem ser realizados, já
2 que apresentam que o grupo em que o organismo está presente demonstra
3 potencial biotecnológico. Essas confirmações são necessárias para atribuir uma
4 maior importância ao microrganismo utilizado no estudo, já que *Clonostachys*
5 representa um gênero com potencial aplicação como uso no controle biológico.

6 Diversos estudos demonstram a ação desse fungo contra fitopatógenos
7 como *Alternaria dauci*, *A. radicina*, *B. cinerea*, *B. aclada*, *Bipolaris sorokiniana*,
8 *Drechslera teres*, *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*,
9 *H. solani*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora palmivora*, *R. solani*, *Rhynchosporium*
10 *commune* e *S. sclerotiorum* (Krauss and Soberanis 2001; Jensen et al. 2004;
11 Yohalem et al. 2004; Kosawang et al. 2014; Schoenberg et al. 2015; Sun et al.
12 2015a, 2015b; Jensen et al. 2016; Lysøe et al. 2017; Samsudin et al. 2017).

13 Nos ensaios de controle contra diferentes tipos de fitopatógenos o
14 fungo apresentou capacidade de diminuir o crescimento micelial dos patógenos,
15 especialmente quando cultivado por quatro dias antes da inoculação dos mesmos.
16 Isso pode se dar ao desenvolvimento mais lento de LABIM-LF027 em relação aos
17 patógenos como foi observado nas figuras anteriores, onde fitopatógenos que
18 apresentaram um rápido crescimento não apresentaram um controle eficiente
19 quando comparado ao inóculo com 4 dias de antecedência.

20 O isolado também foi capaz de crescer sobre os fitopatógenos,
21 como pode ser observado na interação com *M. phaseolina*, alterando também a
22 coloração das hifas, principalmente em *F. solani*, onde é possível observar uma
23 região violácea onde LABIM-LF027 entra em contato com o fitopatógeno. Usando
24 microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi observado que os esporos de LABIM-
25 LF027 estavam presentes sob as hifas dos patógenos. O principal fitopatógeno que

1 apresentou uma diminuição drástica em seu desenvolvimento micelial foi *C. kikuchii*,
2 que teve uma inibição média de 0,92 do desenvolvimento micelial.

3 O potencial de antagonismo do fungo LABIM-LF027 contra *S.*
4 *sclerotiorum* neste estudo está alinhado com os resultados encontrados em outras
5 pesquisas (WU et al., 2018; ELSHERBINY et al., 2019; MASCARIN et al., 2022). Os
6 resultados obtidos aqui sugerem que a cepa utilizada neste trabalho pode possuir
7 potencial de antagonismo. Estudos futuros envolvendo a análise de metabólitos
8 ativos e secundários, assim como metodologias in planta, podem ser considerados
9 para uma avaliação mais abrangente e precisa do potencial dessas cepas.

10 Esses resultados não permitem inferir que a ação de LABIM-LF027
11 foi fungicida ou fungistática, porém algumas moléculas produzidas por esse fungo
12 possuem atividade antimicrobiana, como a produção de enzimas que degradam a
13 parede celular e metabólitos secundários tóxicos (Chatterton e Punja 2009; Fatema
14 et al. 2018). Enzimas produzidas pelo gênero *Clonostachys* possivelmente
15 degradam a parede celular de patógenos, uma estrutura essencial para sua defesa e
16 sobrevivência. Entre essas enzimas pode-se destacar a produção de glucanases,
17 quitinases e proteases.

18 Na fermentação sólida utilizando grãos de arroz, o valor médio
19 máximo obtido após 7 dias de fermentação foi de $6,37 \times 10^7$ conídios por grama para
20 o inóculo sólido e $4,47 \times 10^7$ conídios por grama, valor inferior ao obtido por Carvalho
21 et al. (2018) e inferior aos encontrados por Viccini et al. (2007) e Zhang et al. (2015),
22 que foram de 5×10^8 conídios por grama, $3,4 \times 10^9$ e $3,5 \times 10^{10}$ conídios por grama,
23 respectivamente. Esse menor valor pode ser atribuído à quantidade de água no
24 sistema. De acordo com De La Cruz Quiroz et al. (2015), o excesso de água diminui
25 o rendimento do índice de esporulação, pois as cavidades dos meios são ocupadas

1 pela água, reduzindo os espaços livres para o desenvolvimento de formas de
2 reprodução de fungos.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

6 CONCLUSÃO

A partir dos estudos, foi possível caracterizar as principais características macroscópicas relacionados ao fungo LABIM-LF027, bem como analisar as diferentes características morfológicas atreladas a parâmetros como temperatura, iluminação e meios de cultura. O crescimento também pode ser avaliado de acordo com os resultados experimentais obtidos. Através do sequenciamento foi possível confirmar que o fungo pertence ao gênero *Clonostachys*.

O isolado também apresentou capacidade de inibir o crescimento micelial de diferentes fitopatógenos, podendo apresentar diferentes mecanismos para seus controles. A fermentação utilizando substrato sólido também demonstrou que LABIM-LF027 apresenta uma produção de conídios, importante para o seu potencial como produto de controle biológico.

Futuros estudos são necessários para o melhor entendimento dos resultados obtidos. Com o desenvolvimento de novas fermentações em diferentes meios, testes que busquem ampliar a produção de conídios e a atividade contra fitopatógenos são necessários para a otimização do fungo em uma escala industrial.

1 REFERÊNCIAS

- 2
3 ABNEY, T. S.; RICHARDS, T. L.; ROY, K. W. *Fusarium solani* from ascospores of
4 *Nectria haematococca* causes sudden death syndrome of soybean. *Mycologia*, v. 85,
5 n. 5, p. 801-806, 1993.
- 6
7 AJAYI-OYETUNDE, O. O.; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy,
8 population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean.
9 *Plant pathology*, v. 67, n. 1, p. 3-17, 2018.
- 10
11 ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). *Manual de*
12 *Fitopatologia - Vol. 2. Doenças de Plantas Cultivadas*. 4. ed. São Paulo SP. Editora
13 Agrônômica Ceres, 2005. pp. 570-588.
- 14
15 ALMEIDA, A. M. R. et al. Ocorrência de *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei
16 no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 1, 1976, p. 111-112.
- 17
18 ARAÚJO, I. M. M.; OLIVEIRA, A. G. R. C. Agronegócio e agrotóxicos: impactos à
19 saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. *Trab. Educ. Saúde*, v. 15,
20 n. 1, p. 117-129, 2017.
- 21
22 BAINIER, G. *Mycothèque de l'école de Pharmacie*. XI. *Paecilomyces*, genre.
- 23
24 BARAKAT, Radwan M.; AL-MASRI, Mohammad I. Effect of *Trichoderma harzianum*
25 in combination with fungicides in controlling gray mould disease (*Botrytis cinerea*) of
26 strawberry. *American Journal of Plant Sciences*, v. 8, n. 4, p. 651-665, 2017.
- 27
28 BARNETT, H. L.; LILLY, V. G. A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*.
29 *Mycologia*, v. 54, n. 1, p. 72-77, 1962.
- 30
31 BI, Kai et al. Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in*
32 *plant science*, v. 28, n. 2, p. 211-222, 2023.
- 33
34 BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian*
35 *Journal of Plant Pathology*, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.
- 36
37 CALVO-GARRIDO, Carlos et al. Biological control of botrytis bunch rot in organic
38
- 39 CHAKRABORTY, A.; RAY, P. Mycoherbicides for the Noxious Meddlesome: Can
40 *Colletotrichum* be a Budding Candidate? *Frontiers in Microbiology*, v. 12, n.
41 September, 2021. ISSN: 1664302X. DOI: 10.3389/fmicb.2021.754048.
- 42
43 CHATTERJEE, Subhankar et al. Interactions among filamentous fungi *Aspergillus*
44 *niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of
45 secreted metabolites and fumonisin production. *BMC microbiology*, v. 16, p. 1-13,
46 2016.
- 47
48 CHELINHO, S. et al. Carbofuran effects in soil nematode communities: Using trait
49 and taxonomic based approaches. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 74, n. 7, p. 2002-

- 1 2012, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868095>. Acesso
2 em: 12 jun. 2017.
3
- 4 DAUB, M. E.; HANGARTER, R. P. Light-induced production of singlet oxygen and
5 superoxide by the fungal toxin, cercosporin. *Plant Physiology*, v. 73, n. 3, p. 855-857,
6 1983.
7
- 8 DE AZEVEDO SILVA, F. et al. Introduction of *Trichoderma* spp. biocontrol strains
9 against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary change soil microbial community
10 composition in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivation. *Biological Control*,
11 v. 163, p. 104755, 2021.
12
- 13 DE FARIAS NETO, A. L. et al. Podridão vermelha da raiz (*Fusarium solani*) e mofo
14 branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) na cultura da soja. 2008.
15
- 16 DIGHTON, J.; WHITE, J. (Eds.). *The Fungal Community: Its Organization and Role*
17 *in the Ecosystem*. Boca Raton: CRC Press, 2017. p. 549-562.
18
- 19 FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal databases, U.S. National Fungus Collections,
20 ARS, USDA. Disponível em: < <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em
21 26 jun. 2018.
22
- 23 FATEMA, U. et al. Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol
24 fungus *Clonostachys rosea*. *Sci. Rep.*, v. 8, p. 15009, 2018.
25
- 26 GENIER, H. L. A. et al. Nematicidal activity of *Paecilomyces marquandii* proteases
27 on infective larvae of *Ancylostoma* spp. *Brazilian Archives of Biology and*
28 *Technology*, v. 59, n. December, p. 1-4, 2016. ISSN: 16784324. DOI: 10.1590/1678-
29 4324-2016160218.
30
- 31 GISBERT. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and
32 *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 17, n. 6, p. 553-596,
33 2007. ISSN: 09583157. DOI: 10.1080/09583150701309006.
34
- 35 GODOY, C. V. et al. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo,
36 *Corynespora cassiicola*, na cultura da soja, na safra 2017/18: resultados
37 sumarizados dos ensaios cooperativos. 2018.
38
- 39 GUERRERO-GONZÁLEZ, M. L. et al. Differential expression of *Phaseolus vulgaris*
40 genes induced during the interaction with *Rhizoctonia solani*. *Plant Cell reports*, v. 30,
41 n. 8, p. 1465-1473, 2011. [http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00299-011-
42 1055-5](http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00299-011-1055-5)
43
- 44 HAN, P. P. et al. Metabolites from *Clonostachys* fungi and their biological activities. *J.*
45 *Fungi* (Basel), v. 6, n. 4, p. 229, 2020.
46
- 47 HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed.). *Compendium of soybean*
48 *diseases*. 1999.

- 1 HIROOKA, Takashi; ISHII, Hideo. Chemical control of plant diseases. *Journal of*
2 *General Plant Pathology*, v. 79, n. 6, p. 390–401, 2013. ISSN: 1345-2630. DOI:
3 10.1007/s10327-013-0470-6.
- 4
- 5 HUIJUAN; QI, G.; YIN, R.; ZHANG, H.; LI, C.; ZHAO, X. *Bacillus cereus* strain S2
6 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing
7 sphingosine. *Scientific Reports*, v. 6, n. 19 June, p. 1-11, 2016. ISSN: 20452322.
8 DOI: 10.1038/srep28756.
- 9
- 10 JENSEN, D. F. et al. Fungal-fungal interactions: From natural ecosystems to
11 managed plant production with emphasis on biological control of plant diseases. In:
12
- 13 KAMOU, N. N. et al. Induction of defense-related genes in tomato plants after
14 treatments with the biocontrol agents *Pseudomonas chlororaphis* ToZa7 and
15 *Clonostachys rosea* IK726. *Arch. Microbiol.*, v. 202, n. 2, p. 257-267, 2020.
16
- 17 KARLSSON, M. et al. Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome
18 of *Clonostachys rosea*. *Genome Biol. Evol.*, v. 7, n. 2, p. 465-480, 2015.
19
- 20 KASHIWA, Takeshi; SUZUKI, Tomohiro. High-quality genome assembly of the
21 soybean fungal pathogen *Cercospora kikuchii*. *G3*, v. 11, n. 10, p. jkab277, 2021.
22
- 23 KAUR, Surinder et al. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology,
24 economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*,
25 v. 38, n. 2, p. 136-151, 2012.
26
- 27 KOHN, Linda Myra. A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. 1979.
28
- 29 KUDO, A. S. Aerobiologia de conídios e manejo das cercosporioses da soja (*Glycine*
30 *max*). 2009. 86 f. Tese (Doutorado) – Curso de Fitopatologia, Instituto de Ciências
31 Biológicas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Brasília,
32 Brasília, 2009.
33
- 34 KUYAMA, Shimpei; TAMURA, Teiichi. Cercosporin. A pigment of *Cercosporina*
35 *kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. I. Cultivation of fungus, isolation and purification of
36 pigment. *Journal of the American Chemical Society*, v. 79, n. 21, p. 5725-5726, 1957.
37
- 38 LEHNER, M. S. et al. Meta-analytic modelling of the incidence–yield and incidence–
39 sclerotial relationships in soybean white mould epidemics. *Plant Pathology*, v. 66, n.
40 3, p. 460-468, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ppa.12590>. Acesso em:
41 13 out. 2022.
42
- 43 LES, Nathaly et al. Controle de *Rhizoctonia solani* com produtos biológicos no
44 tratamento de sementes na cultura da soja. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n.
45 12, p. 99919-99935, 2020.
46
- 47 LUCON, C.M.M. et al. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o
48 controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. *Pesquisa*
49 *Agropecuária Brasileira*, v. 44, p. 225-232, 2009.
50

- 1 MARQUEZ, Nathalie et al. *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of
2 pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, p. 634397,
3 2021.
- 4
- 5 MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; GODOY, C. V. Controle biológico de mofo-branco
6 na cultura da soja. In: MEYER, M. C. et al. *Bioinsumos na cultura da soja*. Editores
7 técnicos - Brasília, DF: Embrapa, 2022. p. 315-329. Disponível em:
8 [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1147051/1/cap-18-Bioinsumos-](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1147051/1/cap-18-Bioinsumos-na-cultura-da-soja)
9 [na-cultura-da-soja](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1147051/1/cap-18-Bioinsumos-na-cultura-da-soja). Acesso em: 14 out. 2022.
- 10
- 11 MILNER, R. J. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and*
12 *Environment*, v. 49, n. 1, p. 9-13, 1994. ISSN: 01678809. DOI: 10.1016/0167-
13 8809(94)90014-0.
- 14
- 15 MISHRA, R. K. et al. Utilization of biopesticides as sustainable solutions for
16 management of pests in legume crops: Achievements and prospects. *Egyptian*
17 *Journal of Biological Pest Control*, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2018.
- 18
- 19 MORANDI, M. A. B. et al. Effects of host and microbial factors on development of
20 *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *Eur. J. Plant Pathol.*, v.
21 106, n. 5, p. 439-448, 2000.
- 22
- 23 NORILER, Sandrielle A. et al. Bioprospecting and structure of fungal endophyte
24 communities found in the Brazilian biomes, Pantanal, and Cerrado. ***Frontiers in***
25 ***microbiology***, v. 9, p. 381807, 2018.
- 26
- 27 NORILER, Sandrielle Aparecida et al. Vochysiamides A and B: Two new bioactive
28 carboxamides produced by the new species *Diaporthe vochysiae*. ***Fitoterapia***, v.
29 138, p. 104273, 2019.
- 30
- 31 OGOSHI, Akira. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups
32 of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual review of phytopathology*, v. 25, n. 1, p. 125-143,
33 1987.
- 34
- 35 PACHENARI, A.; DIX, N. J. Production of toxins and wall degrading enzymes by
36 *Gliocladium roseum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, v. 74, n. 3, p. 561-566, 1980.
- 37
- 38 PANTH, Milan; HASSLER, Samuel C.; BAYSAL-GUREL, Fulya. Methods for
39 Management of Soilborne Diseases in Crop Production. *Agriculture*, v. 10, n. 1, p. 16,
40 2020. ISSN: 2077-0472. DOI: 10.3390/agriculture10010016.
- 41
- 42 PHILLIPS, V.D. Fungal Leaf Spots IN: COLYER, P.D. Soybean disease atlas. 2°
43 edição. Louisiana: Louisiana State University, 1989.
- 44
- 45 PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. Doenças de soja: diagnose, epidemiologia e
46 controle. 2003.
- 47
- 48 PRANAB; DEB, L.; PANDEY, A. K. *Trichoderma*- from lab bench to field application:
49 Looking back over 50 years. *Frontiers in Agronomy*, v. 4, n. 19, p. 1-25, 2022. ISSN:
50 26733218. DOI: 10.3389/fagro.2022.932839.

- 1
2 ROYSE, D. J.; RIES, S. M. The influence of fungi isolated from peach twigs on the
3 pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, v. 68, n. 4, p. 603-607, 1978.
4 Acesso em: 28 out. 2022.
5
- 6 SALEHI, G.; VALIJANIAN, E.; SHARAFI, R. *Bacillus thuringiensis*: a successful
7 insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and*
8 *Biotechnology*, v. 101, n. 7, p. 2691-2711, 2017. ISSN: 14320614. DOI:
9 10.1007/s00253-017-8175-y.
10
- 11 SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*,
12 v. 6, Centraalbureauvoor Schimmelcultures, Baarn, 1974, 116 pp.
13
- 14 SARAIVA, R. M. et al. Compounds produced by *Clonostachys rosea* deleterious to
15 *Botrytis cinerea*. *Braz. J. Agr.*, v. 95, p. 34-47, 2020.
16
- 17 SARAIVA, R. M. et al. Confocal microscopy study to understand *Clonostachys rosea*
18 and *Botrytis cinerea* interactions in tomato plants. *Biocont. Sci. Technol.*, v. 25, p. 56-
19 71, 2015.
20
- 21 SCHROERS, Hans-Josef. A monograph of Bionectria (Ascomycota, Hypocreales,
22 Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. 2001.
23
- 24 SHIGO, A. L. Fungi isolated from oak-wilt trees and their effects on *Ceratocystis*
25 *fagacearum*. *Mycologia*, v. 50, n. 5, p. 757-769, 1958.
26
- 27 SOARES, Ana Paula Gomes et al. More *Cercospora* species infect soybeans across
28 the Americas than meets the eye. *PLoS One*, v. 10, n. 8, p. e0133495, 2015.
29
- 30 SOOD, M. et al. *Trichoderma*: The "secrets" of a multitasking biocontrol agent.
31 *Plants*, v. 9, n. 6, p. 1-25, 2020. ISSN: 22237747. DOI: 10.3390/plants9060762.
32
- 33 SUTTON, J. C. et al. *Gliocladium roseum* - A versatile adversary of *Botrytis cinerea*
34 in crops. *Plant Dis.*, v. 81, n. 4, p. 316-328, 1997.
35
- 36 THAMBUGALA, Kasun M. et al. Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal
37 antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in cellular and infection*
38 *microbiology*, v. 10, p. 604923, 2020.
39
- 40 USTA, Canan. Microorganisms in biological pest control—a review (bacterial toxin
41 application and effect of environmental factors). *Current progress in biological*
42 *research*, v. 13, p. 287-317, 2013.
43
- 44 VAN LENTEREN, J. C. et al. Biological control using invertebrates and
45 microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, v. 63, p. 39-59, 2018.
46
- 47 WANG, H. et al. High-quality genome resource of *Clonostachys rosea* strain CanS41
48 by Oxford nanopore long-read sequencing. *Plant Dis.*, 2021. DOI: 10.1094/PDIS-12-
49 20-2615-A.
50

- 1 WILLBUR, Jaime et al. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in
2 soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. *Tropical Plant*
3 *Pathology*, v. 44, n. 1, p. 3-11, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/s40858-](https://doi.org/10.1007/s40858-018-0250-0)
4 [018-0250-0](https://doi.org/10.1007/s40858-018-0250-0). Acesso em: 15 out. 2022.
- 5
- 6 WILLETTS, Haydn J.; WONG, J. A. L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S.*
7 *trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *The Botanical*
8 *Review*, v. 46, p. 101-165, 1980.
- 9 wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology*, v. 62,
10 n. 3, p. 510-519, 2013.
- 11
- 12 YAMAZAKI, Sunao et al. Cercosporin, a novel photodynamic pigment isolated from
13 *Cercospora kikuchii*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 39, n. 1, p. 287-288,
14 1975.
15