



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

**BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* PELOS FUNGOS *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40**

**ANY CAROLINE PANTALEÃO BUENO**

Foz do Iguaçu  
2023



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

**BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* PELOS FUNGOS *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40**

**ANY CAROLINE PANTALEÃO BUENO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos.

Foz do Iguaçu  
2023

ANY CAROLINE PANTALEÃO BUENO

**BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* PELOS FUNGOS *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Orientador: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos  
UNILA



Documento assinado digitalmente  
JULIANA KAFKA BILHA  
Data: 21/06/2023 09:07:46-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Ma. Juliana Kafka Bilha  
PPGIES



Documento assinado digitalmente  
NATHALIA CORREA CHAGAS DE SOUZA  
Data: 20/06/2023 10:30:11-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dra. Nathália Corrêa Chagas de Souza  
UNILA

Foz do Iguaçu, 13 de junho de 2023.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Any Caroline Pantaleão Bueno

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação
	<input type="checkbox"/> tese
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/> _____

Título do trabalho acadêmico: BIOCOTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* PELOS FUNGOS *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40.

Nome do orientador(a): Rafaella Costa Bonugli Santos

Data da Defesa: 13/06/2023

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a OBRA GRATUITAMENTE e de acordo com a licença pública Creative Commons Licença 3.0 Unported.

Foz do Iguaçu, 13 de junho de 2023.

Any Caroline Pantaleão Bueno

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho a minha mãe e a todos aqueles que acreditam e lutam pela ciência diariamente.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Maria, por sempre me incentivar e me mostrar a importância dos estudos, e por não medir esforços para me apoiar em todos os momentos.

Agradeço à minha orientadora, Prof. Rafaella, por todo o apoio, ensinamentos e orientações durante esses anos de graduação, e por ser a grande responsável por cativar o meu apreço pela microbiologia.

Agradeço aos membros da banca, Prof. Nathália e Juliana, pela disponibilidade e pelas contribuições e ideias cedidas.

Agradeço ao Prof. Chiba, pela orientação durante minha iniciação científica, foi de grande importância para meu crescimento pessoal e acadêmico.

Agradeço a Prof. Maria Leandra, pela orientação durante o estágio no HMPGL.

Agradeço as técnicas e técnicos do DELABEN, por todo auxílio durante as aulas, e principalmente durante a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer ao grupo de pesquisa durante a IC, Gisele, Álvaro, Josiane, Maria Cecilia e em especial ao meu parceirinho de laboratório e uma das pessoas que mais me entende, Luiz. Obrigada por todas as reuniões, conversas e conhecimentos compartilhados.

Gostaria de agradecer às minhas amigas, que me proporcionaram bons momentos e me lembravam que existia vida social fora da universidade, em especial a Fabíola, amiga, obrigada por me incentivar e acreditar em mim, até quando eu mesma não o fazia.

Por fim, agradeço aos colegas de curso e de laboratório, aos professores e a todas as pessoas que fizeram da Universidade Federal da Integração Latino-Americana um bom lugar para se estar durante esses anos.

*“Você é o único representante do seu sonho  
na face da Terra”.*

***Emicida.***

BUENO, Any Caroline Pantaleão. **BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* PELOS FUNGOS *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40.** 2023. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

## RESUMO

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo-branco em soja, ainda hoje é um dos principais responsáveis por perdas econômicas significativas dessa cultivar. Técnicas de manejo dessa doença incluem, controle cultural, químico e biológico, sendo este último, de grande interesse do mercado agrícola, se apresentando como uma alternativa segura e de menor impacto ambiental. A utilização de consórcios microbianos em substituição a microrganismos isolados tem se mostrado uma alternativa eficiente dentro do controle biológico. Este estudo avaliou o potencial de antagonismo *in vitro* dos fungos da Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental – CCMIBA, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38, *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, isolados e em consórcio contra *S. sclerotiorum* para futuras aplicações como bioinoculante no controle biológico. Os fungos cultivados em meio malte enriquecido, foram submetidos a dois testes de cultura dupla, com diferentes tratamentos e tempos de incubação, que consistiu na incubação dos fungos de biocontrole, isolados e em consórcio, na mesma placa que o patógeno a 28°C por oito e dez dias. No primeiro teste, os fungos *P. lilacinum* CCMIBA\_38 e *C. rosea* CCMIBA\_39, foram incubados dois dias após o patógeno devido ao rápido crescimento observado anteriormente. Porém, devido a essa diferença, não foi possível avaliar corretamente os resultados. Assim, no segundo teste, os fungos de biocontrole foram inoculados no mesmo dia que o patógeno. Após o tempo de incubação, foram feitas três análises: 1) o crescimento do patógeno nos diferentes tratamentos em comparação com o controle; 2) o potencial de antagonismo dos fungos de biocontrole, determinado através de notas de 1 a 5, se o fungo de biocontrole ocupou 100%, 75%, 50%, 25% ou 0% da placa, respectivamente; e 3) o crescimento dos fungos de biocontrole na presença e na ausência do patógeno. No primeiro teste de cultura dupla, a taxa de crescimento do patógeno diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) em todos os tratamentos. Já no segundo, a redução foi significativa apenas nos tratamentos com consórcio e com *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40. Na avaliação do potencial de antagonismo dos fungos de biocontrole, *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 obteve nota 3, ao ocupar 60% da placa, enquanto *P. lilacinum* CCMIBA\_38, *C. rosea* CCMIBA\_39 e o consórcio microbiano obtiveram nota 4, ao ocupar 40%, 42% e 49% da placa, respectivamente. *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 também apresentou crescimento significativo na presença do patógeno. Tais resultados indicam um bom potencial antagônico de *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 contra *S. sclerotiorum*, provavelmente, devido a competição por espaço e nutrientes, mas micoparasitismo e produção de metabólitos ativos não podem ser descartados, estudos futuros serão realizados para maior elucidação dos mecanismos dessa interação.

**Palavras-chave:** mofo-branco; doenças da soja; antagonismo; controle biológico; consórcio microbiano.

BUENO, Any Caroline Pantaleão. **BIOCONTROL DE *Sclerotinia sclerotiorum* POR LOS HONGOS *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38 y *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40.** 2023. 60 p. Trabajo de Conclusión de Curso (Bacharelado en Biotecnología) - Universidad Federal da Integración Latinoamericana, Foz do Iguazú, 2023.

## RESUMEN

El fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, causante del moho blanco en la soja, sigue siendo una de las principales causas de importantes pérdidas económicas en este cultivo. Las técnicas de manejo para esta enfermedad incluyen el control cultural, químico y biológico, siendo este último de gran interés para el mercado agrícola, presentándose como una alternativa segura y con menor impacto ambiental. El uso de consorcios microbianos para reemplazar microorganismos aislados ha demostrado ser una alternativa eficiente dentro del control biológico. Este estudio evaluó el potencial de antagonismo in vitro de hongos de la Colección de Cultivos de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental – CCMIBA, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38, *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39 y *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, aislado y en consorcio contra *S. sclerotiorum* para futuras aplicaciones como bioinoculante en control biológico. Los hongos cultivados en medio de malta enriquecido se sometieron a dos pruebas de doble cultivo, con diferentes tratamientos y tiempos de incubación, consistentes en la incubación de los hongos de biocontrol, aislados y en consorcio, en la misma placa que el patógeno a 28°C durante ocho y diez días. En la primera prueba, los hongos *P. lilacinum* CCMIBA\_38 y *C. rosea* CCMIBA\_39 se incubaron dos días después del patógeno debido al rápido crecimiento observado previamente. Sin embargo, debido a esta diferencia, no fue posible evaluar correctamente los resultados. Así, en la segunda prueba, los hongos de biocontrol se inocularon el mismo día que el patógeno. Después del tiempo de incubación se realizaron tres análisis: 1) el crecimiento del patógeno en los diferentes tratamientos en comparación con el control; 2) el potencial de antagonismo de los hongos de biocontrol, determinado mediante puntajes de 1 a 5, si el hongo de biocontrol ocupaba el 100%, 75%, 50%, 25% o 0% de la placa, respectivamente; y 3) el crecimiento de hongos biocontroladores en presencia y ausencia del patógeno. En la primera prueba de doble cultivo, la tasa de crecimiento del patógeno disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en todos los tratamientos. En el segundo, la reducción fue significativa solo en los tratamientos con consorcio y con *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40. En la evaluación del potencial de antagonismo de los hongos biocontroladores, *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 obtuvo 3, ocupando el 60% de la placa, mientras que *P. lilacinum* CCMIBA\_38, *C. rosea* CCMIBA\_39 y el consorcio microbiano obtuvieron 4, ocupando el 40%, 42% y 49% de la placa, respectivamente. *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 también mostró un crecimiento significativo en presencia del patógeno. Tales resultados indican un buen potencial antagónico de *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 contra *S. sclerotiorum*, probablemente debido a la competencia por espacio y nutrientes, pero no se puede descartar el micoparasitismo y la producción de metabolitos activos, se realizarán estudios futuros para dilucidar aún más los mecanismos de esta interacción.

**Palabras clave:** moho blanco; enfermedades de la soja; antagonismo; control biológico; consorcio microbiano.

BUENO, Any Caroline Pantaleão. **BIOCONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* BY THE FUNGI *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38, and *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40.** 2023. 60 p. Undergraduate thesis (Bachelor degree in Biotechnology) - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2023.

## ABSTRACT

The phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, which causes white mold in soybeans, is still one of the main causes of significant economic losses in this cultivar. Management techniques for this disease include cultural, chemical, and biological control, the latter being of great interest to the agricultural market, presenting itself as a safe alternative with less environmental impact. The use of microbial consortia to replace isolated microorganisms has proven to be an efficient alternative within biological control. This study evaluated the in vitro antagonism potential of fungi from the Culture Collection of Microorganisms of Biotechnological and Environmental Importance – CCMIBA, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38, *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, and *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, isolated and in consortium against *S. sclerotiorum* for future applications as a bioinoculant in biological control. The fungi grow in enriched malt medium were submitted to two double culture tests, with different treatments and incubation times, consisting of the incubation of the biocontrol fungi, isolated and in consortium, on the same plate as the pathogen at 28° C for eight and ten days. In the first test, the fungi *P. lilacinum* CCMIBA\_38 and *C. rosea* CCMIBA\_39 were incubated two days after the pathogen due to the rapid growth previously observed. However, due to this difference, it was not possible to correctly evaluate the results. Thus, in the second test, the biocontrol fungi were inoculated on the same day as the pathogen. After the incubation time, three analyzes were performed: 1) the growth of the pathogen in the different treatments compared to the control; 2) the antagonism potential of the biocontrol fungi, determined through scores from 1 to 5, if the biocontrol fungus occupied 100%, 75%, 50%, 25% or 0% of the plate, respectively; and 3) the growth of biocontrol fungi in the presence and absence of the pathogen. In the first double culture test, the pathogen growth rate decreased significantly ( $p < 0,05$ ) in all treatments. In the second, the reduction was significant only in treatments with the consortium and with *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40. In the evaluation of the antagonism potential of the biocontrol fungi, *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 scored 3, occupying 60% of the plate, while *P. lilacinum* CCMIBA\_38, *C. rosea* CCMIBA\_39, and the microbial consortium scored 4, occupying 40%, 42%, and 49% of the plate, respectively. *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 also showed significant growth in the presence of the pathogen. Such results indicate a good antagonistic potential of *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 against *S. sclerotiorum*, probably due to competition for space and nutrients, but mycoparasitism and production of active metabolites cannot be ruled out, future studies will be carried out to further elucidate the mechanisms of this interaction.

**Keywords:** white mold; soybean diseases; antagonism; biological control; microbial consortia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Estágios de desenvolvimento vegetativo da soja.....	15
<b>Figura 2-</b> Estágios de desenvolvimento reprodutivo da soja.....	16
<b>Figura 3-</b> Aspecto geral de uma lavoura de soja saudável e uma infectada por <i>S. sclerotiorum</i> .....	17
<b>Figura 4-</b> Morfologias de <i>S. sclerotiorum</i> e danos causados nas diferentes partes da soja.....	19
<b>Figura 5-</b> Ciclo do mofo-branco em soja ( <i>Glycine max</i> ).....	20
<b>Figura 6-</b> Diagrama de inoculação do teste de antagonismo, contendo os parâmetros de zona de inibição e de inibição do crescimento.....	29
<b>Figura 7-</b> Crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> em meio malte enriquecido.....	32
<b>Figura 8-</b> Resultado do primeiro experimento de cultura dupla (pré análise).....	33
<b>Figura 9-</b> Resultado do segundo experimento de cultura dupla.....	35
<b>Figura 10-</b> <i>S. sclerotiorum</i> em meio malte enriquecido para a produção de escleródios.....	40
<b>Figura 11-</b> <i>S. sclerotiorum</i> em meio BDA para a produção de escleródios.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Média da taxa de crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> nos testes de cultura dupla nos diferentes tratamentos.....	34
<b>Tabela 2-</b> Média da taxa de crescimento dos fungos de biocontrole no controle (C+) e no tratamento com <i>S. sclerotiorum</i> (T).....	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
2.1 SOJA	14
2.2 FITOPATÓGENOS DA SOJA	16
2.2.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	17
2.3 CONTROLE QUÍMICO DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	21
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	23
2.5 INOCULANTES NO CONTROLE BIOLÓGICO	25
<b>3 OBJETIVO</b>	<b>27</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
4.1 MICRORGANISMOS	28
4.2 TESTES DE CULTURA DUPLA	29
4.3 PRODUÇÃO DE ESCLERÓDIOS PARA AVALIAÇÃO DE GERMINAÇÃO	31
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
5.1 MICRORGANISMOS	32
5.2 TESTES DE CULTURA DUPLA	32
5.3 PRODUÇÃO DE ESCLERÓDIOS PARA AVALIAÇÃO DE GERMINAÇÃO	39
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>44</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um fitopatógeno que afeta diversas culturas agrícolas de importância comercial, como o feijão, o grão-de-bico e a soja. Por ser um patógeno de ampla distribuição e que persiste no ambiente, causando danos econômicos severos, estratégias de controle devem ser aprimoradas (O'SULLIVAN et al., 2021).

Atualmente, no Brasil, *S. sclerotiorum* é um problema que atinge, principalmente, os cultivares de soja na região sul do país (WILLBUR et al., 2019). Sendo a combinação de manejo cultural com o controle químico, a principal forma de controle utilizada. No entanto, o controle químico, utilizando fungicidas de modo contínuo, tem apresentado algumas preocupações, como o desenvolvimento de patógenos resistentes e danos à saúde humana e ao ambiente (O'SULLIVAN et al., 2021; YU et al., 2022).

Neste cenário, outros tipos de controle, como o controle biológico, são alternativas viáveis. No Brasil, produtos à base dos gêneros microbianos *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., já são comercializados para combater a *S. sclerotiorum*. Porém, por se tratarem, em sua maioria, de um gênero microbiano isolado, sua eficácia em campo pode ser variável, já que dependem diretamente das condições ambientais, para seu bom desenvolvimento (DE FARIA et al., 2022).

Sendo assim, alternativas dentro do controle biológico vêm sendo estudadas, é o caso de formulações contendo uma mistura de microrganismos com potencial de biocontrole, os chamados consórcios microbianos. A partir de tais consórcios, ao utilizar microrganismos com diferentes mecanismos de biocontrole e que sejam estáveis em conjunto, pode-se explorar o efeito sinérgico do biocontrole e tentar diminuir a variação de sua eficácia (O'SULLIVAN et al., 2021; DE FARIA et al., 2022).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo, avaliar o potencial de biocontrole, através do antagonismo *in vitro*, dos isolados fúngicos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, assim como investigar sua ação em consórcio, contra o fungo fitopatógeno *S. sclerotiorum*, causador do mofo-branco em soja.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SOJA

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é um dos cultivares mais explorados e de maior importância econômica na agricultura, sendo destinado a diversas indústrias, como para a alimentação humana e na pecuária, sendo exportada em forma de grãos, farelo e óleo (GALE et al., 2019; CONAB, 2022).

Atualmente, o Brasil é o país que possui maior área destinada para o plantio desta oleaginosa, liderando a produção e exportação mundial de soja, competindo este posto com os Estados Unidos. Seu principal mercado é a China, país com maior demanda de importação de soja no mundo (GALE et al., 2019; CONAB, 2022).

Em um levantamento feito em maio de 2023, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), revela que para a safra 2022/23 houve um aumento na área destinada para o plantio de soja de 5,6%, em comparação à safra passada, e uma produção estimada de 154,81 milhões de toneladas de soja no país (CONAB, 2023). Um outro documento indica que houve um aumento da área destinada ao plantio de soja no Paraná, comparado à safra passada, devido a substituição de áreas destinadas ao plantio de feijão e milho, explicada pela persistência de pragas desses cultivares no ambiente (CONAB, 2022).

O mercado agropecuário no Paraná é bastante desenvolvido e constitui o principal eixo econômico do estado. Ao longo dos últimos anos, o aumento na produtividade e das áreas destinadas ao cultivo de soja, contribuiu ainda mais para o desenvolvimento econômico, social e ambiental do estado, fomentando pesquisa de novas técnicas de manejo da cultura e o desenvolvimento de novas tecnologias (FRANCHINI et al., 2016).

O cultivo da soja ocorre no período de primavera/verão, sendo que, no Brasil, seu plantio é iniciado entre os meses de setembro e outubro, podendo atrasar se as condições forem desfavoráveis (CONAB, 2022). Boas condições de cultivo para essa oleaginosa são caracterizadas por chuvas regulares, visto que a prática de irrigação é pouco aderida por ter custo elevado, temperaturas do ar e do solo entre 20°C e 30°C e radiação solar suficiente, a depender do tipo de cultivar. Outras

medidas como, plantio de cultivares resistentes a doenças, e o correto manejo do solo e de pragas, também são essenciais no sucesso da produção (NEUMAIER et al., 2020).

O plantio da soja é feito através do sistema de plantio direto, com sucessão de culturas, geralmente, de soja-trigo ou soja-milho. Para o processo de semeadura deve-se avaliar a fertilidade do solo, verificando se há necessidade do uso de fertilizantes e adubos, podendo estes, serem depositados em conjunto com as sementes ou lançados posteriormente na superfície do solo (CONTE et al., 2020; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2020).

O ciclo da soja pode ser dividido em dois principais estágios, vegetativo e reprodutivo, os quais possuem subdivisões. O primeiro subestágio vegetativo é denominado VE (emergência), caracterizado pelo desenvolvimento dos cotilédones acima da superfície do solo, o segundo estágio é denominado VC (cotilédone), caracterizado pela abertura dos cotilédones. Após esses dois subestágios iniciais, a denominação assume uma sequência numérica (V1, V2...Vn), partindo do primeiro nó com folhas totalmente desenvolvidas (figura 1) (NEUMAIER et al., 2020).

**Figura 1-** Estágios de desenvolvimento vegetativo da soja



Legenda: Sequência de estágios de desenvolvimento vegetativo da soja. Em a) estágio VE (emergência); b) estágio V1 (primeiro nó) com folhas unifolioladas completamente desenvolvidas; c) estágio V2 (segundo nó) com a primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida.

Fonte: Adaptado de NEUMAIER et al., 2020.

As subdivisões durante o estágio reprodutivo são caracterizadas pela denominação R seguida de uma sequência numérica de um até oito, e são utilizadas para descrever os diferentes períodos de florescimento e maturação da soja. Portanto, R1 e R2 representam o florescimento, R3 e R4 o desenvolvimento de vagens, R5 e R6 o desenvolvimento dos grãos, e R7 e R8 caracterizam a maturação do cultivar (figura 2) (NEUMAIER et al., 2020).

**Figura 2-** Estágios de desenvolvimento reprodutivo da soja



Legenda: Sequência de estágios de desenvolvimento reprodutivo da soja. Em a) estágio de floração (R1/R2); b) estágio de desenvolvimento dos grãos (R5/R6); c) estágio de maturação (R7/R8).

Fonte: BANCO DE IMAGENS EMBRAPA. Autores: a) Mônica Juliani Zavaglia Pereira (2015); b) Giovani Luiz Castoldi (2015); c) Luiz Henrique Magnante (2016).

Com a maturação das plantas e com a redução do conteúdo de água das sementes próximo a 13%, inicia-se o processo de colheita dos grãos. As sementes colhidas passam por etapas de limpeza, padronização por tamanho e ensaque, há ainda a possibilidade do tratamento dos grãos com fungicidas ou inseticidas se avaliado risco de contaminação via semente ou desenvolvimento de pragas durante o armazenamento (HENNING et al., 2020).

Apesar de ser um cultivo bem estabelecido e otimizado, a produção de soja ainda é afetada por condições climáticas adversas e pela suscetibilidade a doenças e insetos-praga (CONAB, 2022). Segundo LIN et al. (2022), o aumento da temperatura global e a contínua irregularidade das chuvas contribuem para a alteração da distribuição geográfica e da gravidade das diferentes doenças da soja.

## 2.2 FITOPATÓGENOS DA SOJA

Os cultivares de soja têm sua produtividade reduzida pelo desenvolvimento de várias doenças, causadas por diferentes agentes patogênicos, como bactérias, nematoides, vírus e fungos, capazes de atingir diferentes partes da planta, em diferentes estágios de desenvolvimento (YU et al., 2022; LIN et al., 2022).

Dentre as bactérias patogênicas se destacam, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (causadora do crestamento bacteriano) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (causadora da pústula bacteriana) (DE ALMEIDA LOPES et al., 2018). Já

dentre os nematoides de maior relevância econômica no Brasil, estão *Heterodera glycines* (nematóide do cisto da soja), *Meloidogyne incognita* (nematóide das galhas), *Pratylenchus brachyurus* (nematóide das lesões) e *Rotylenchulus reniformis* (nematóide reniforme) (DIAS-ARIEIRA et al., 2021; LIN et al., 2022).

Dos fungos causadores de doenças, destacam-se, *Rhizoctonia solani* (tombamento da soja), *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo-branco/podridão do caule de esclerotinia), *Phakopsora pachyrhizi* (ferrugem da soja), *Colletotrichum* spp. (antracnose da soja) e *Macrophomina phaseolina* (podridão do carvão) (DE ALMEIDA LOPES et al., 2018; BOUFLEUR et al., 2021; LIN et al., 2022).

### 2.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Dentre os fungos fitopatogênicos mais importantes para a cultura da soja no Brasil está o *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, conhecido por causar a doença do mofo-branco ou podridão do caule de esclerotínia (Figura 3). Dependendo do nível de infestação e das condições ambientais, as perdas de rendimento da soja chegam a 70% (MEYER et al., 2022). Os estados mais afetados por esta doença são os do sul do Brasil, já que apresentam condições ambientais mais úmidas e frias, ideal para o desenvolvimento do fungo (WILLBUR et al., 2019).

**Figura 3-** Aspecto geral de uma lavoura de soja saudável e uma infectada por *S. sclerotiorum*

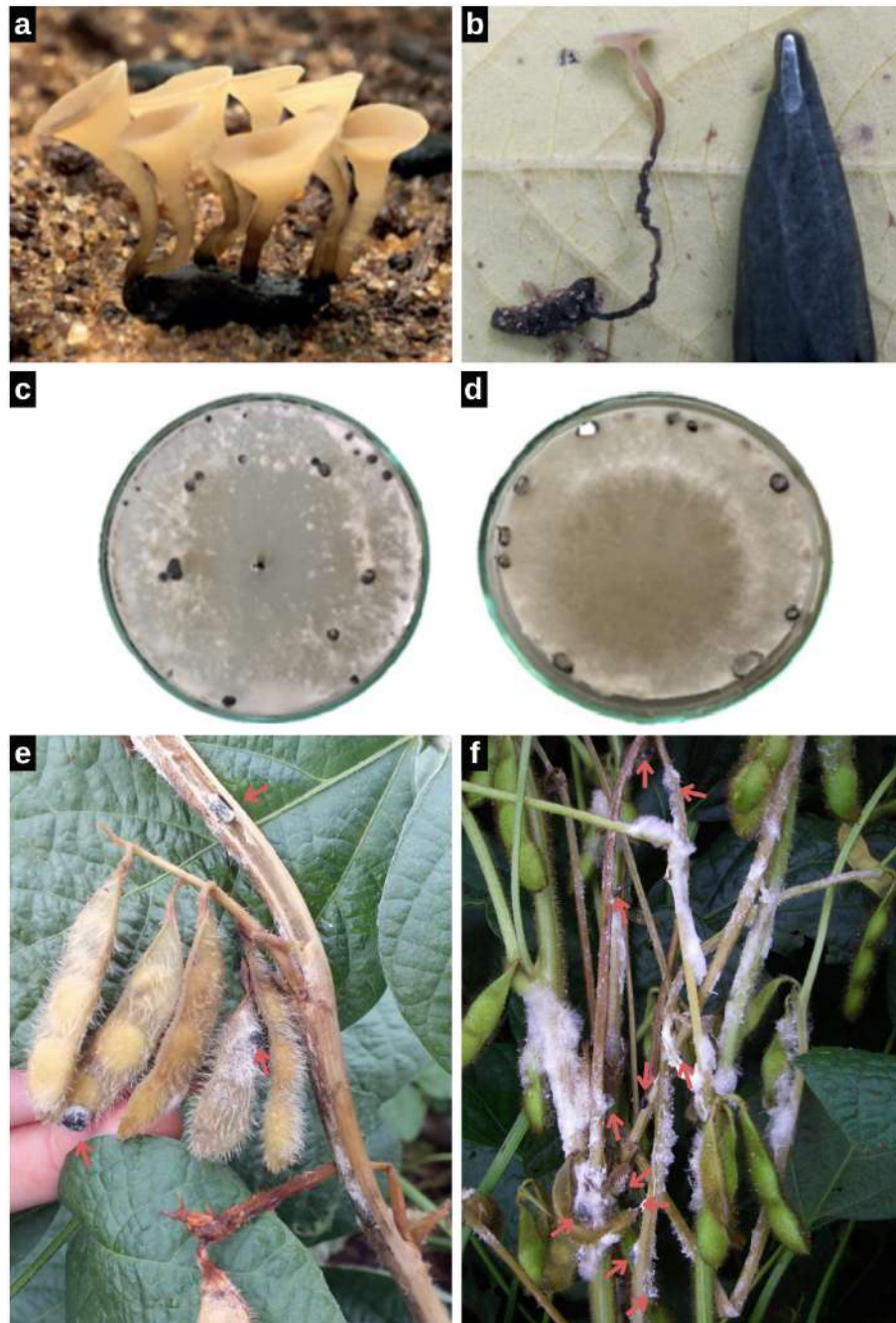


Legenda: a) Lavoura de soja saudável; b) Lavoura de soja infectada com *S. sclerotiorum*.

Fonte: a) BANCO DE IMAGENS EMBRAPA. Autor: Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi (2021); b) MEYER, M. C. et al., 2015.

Esse patógeno pertence ao filo Ascomycota, sendo caracterizado como cosmopolita e necrotrófico presente no solo. O que dificulta seu controle nas culturas agrícolas são seus escleródios (Figura 4), estruturas de resistência formadas pelo condensamento de hifas, que permite sua viabilidade por até 12 meses em solos de regiões tropicais e subtropicais, e por até oito anos em regiões de clima temperado. Os escleródios são estruturas revestidas por melanina, o que lhe confere coloração preta, sendo de fácil identificação em meio ao micélio branco do fungo (LEHNER et al., 2017; DE AZEVEDO SILVA et al., 2021; MEYER et al., 2022).

**Figura 4-** Morfologias de *S. sclerotiorum* e danos causados nas diferentes partes da soja



Legenda: a) e b) mostram o corpo de frutificação de *S. sclerotiorum*, que se desenvolve durante a reprodução sexual, na germinação carpogênica; c) e d) mostram o micélio de *S. sclerotiorum* cultivados em placa de petri com meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Ágar), durante 30 dias, sendo possível observar a presença de escleródios em ambas as placas e as diferenças na coloração das colônias, em c) a colônia é branca e em d) a colônia é bege; e) mostra as vagens e hastes do cultivar de soja infectado e alguns pontos negros indicando a formação dos escleródios (indicados pelas setas vermelhas); f) mostra a região caulinar tomada pelo mofo-branco e alguns pontos negros indicando a formação dos escleródios (indicados pelas setas vermelhas).

Fonte: a) e b) Adaptado de MEYER et al., 2022; c) e d) Adaptado de ZANATTA et al., 2019; e) MEYER, M. C. et al., 2020; f) BANCO DE IMAGENS EMBRAPA, autor: Maurício Meyer (2014).

Os escleródios podem germinar de duas formas, por germinação carpogênica ou miceliogênica. A via carpogênica (reprodução sexual) é a mais relevante na infecção da cultura da soja, nela os escleródios geram apotécios e liberam ascósporos, assim, os esporos sexuados do fungo se espalham pelo ambiente através de correntes de ar, infectando as flores e posteriormente outras partes da planta, como o caule. Já pela via miceliogênica, os escleródios geram hifas infecciosas capazes de penetrar diretamente o tecido vegetal (LEHNER et al., 2017; DE AZEVEDO SILVA et al., 2021; MEYER et al., 2022). O ciclo básico de infecção causada por *S. sclerotiorum* é exemplificado pela figura 5.

**Figura 5-** Ciclo do mofo-branco em soja (*Glycine max*)



Fonte: Adaptado de REIS et al., 2011.

A patogenicidade de *S. sclerotiorum* se dá pela produção de enzimas líticas, que degradam a parede celular da planta hospedeira, e de fatores de

virulência como o ácido oxálico, dessa forma o fungo acidifica o meio, afetando o ambiente redox e causando a morte celular da planta (WILLBUR et al., 2019; O'SULLIVAN et al., 2021).

### 2.3 CONTROLE QUÍMICO DE *Sclerotinia sclerotiorum*

O controle químico, associado a práticas de manejo cultural, como a rotação com culturas não suscetíveis à doença, ainda é o método mais utilizado e mais eficaz no controle de *S. sclerotiorum* nas culturas agrícolas (O'SULLIVAN et al., 2021). No caso da soja, o controle químico é utilizado na época de floração (estágio reprodutivo R1 e R2), com o objetivo de diminuir o impacto da infecção primária do mofo-branco, causado pelos ascósporos liberados no ar durante a germinação carpogênica, que atingem principalmente as partes aéreas da planta (WILLBUR et al. 2019; YU et al., 2022).

No Brasil, dentre os fungicidas mais utilizados no controle de *S. sclerotiorum* estão, o procimidona, que atua na transdução de sinal osmótico na membrana fúngica; fluazinam, um desacoplador da fosforilação oxidativa, afetando a síntese de ATP; boscalida, que possui ação inibidora da succinato-desidrogenase, afetando a respiração do fungo; e tiofanato metílico e carbendazim, ambos atuam inibindo a divisão mitótica do fungo, ao afetar a proteína  $\beta$ -tubulina durante o processo de formação dos microtúbulos (BARRO et al., 2019; MIORINI et al., 2021; FRAC-BR, 2022).

Porém, apesar de ser o método mais eficaz, o controle químico não protege completamente o cultivo da soja contra o mofo-branco, além de existirem outras problemáticas relacionadas ao seu uso contínuo. O principal problema é o risco do desenvolvimento de resistência do patógeno aos fungicidas utilizados, já que estes podem possuir mecanismo de ação semelhantes. Outros problemas relevantes estão relacionados ao investimento na aplicação do fungicida, e ao risco de contaminação ambiental e à saúde humana (O'SULLIVAN et al., 2021; YU et al., 2022).

Em 2019 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), divulgou uma lista de sete ingredientes ativos de agrotóxicos, entre eles fungicidas, que deveriam passar por uma reavaliação toxicológica, seguindo critérios de risco à

saúde humana. Dentre eles, estão o carbendazim, em primeiro lugar, usado no controle de *S. sclerotiorum*, indicado como um possível causador de mutagenicidade, toxicidade reprodutiva e toxicidade no desenvolvimento embrionário; o tiofanato-metílico, em segundo lugar, indicado como possível causador de mutagenicidade e desregulador endócrino, e por fim, a lista traz o procimidona, indicado como possível agente carcinogênico e desregulador endócrino (ANVISA, 2022a).

A reavaliação toxicológica para o ingrediente carbendazim, concluiu que há potencial carcinogênico, mutagênico e de toxicidade reprodutiva, não sendo encontrado um limiar de dose seguro para a população, sendo assim, seu uso foi banido (ANVISA, 2022b). Os resultados dos outros ingredientes reavaliados ainda não foram divulgados. O quadro 1 lista os fungicidas mais utilizados no cultivo da soja contra o mofo-branco, seus possíveis danos à saúde humana e ao ambiente, e sua situação atual (ANVISA, 2022a; 2022c).

**Quadro 1-** Fungicidas mais usados no cultivo da soja contra o mofo-branco e seus possíveis danos à saúde humana e ao ambiente.

Fungicida	Situação atual	Possíveis danos à saúde humana e ao ambiente	Referências
Boscalida	Autorizado	Baixa toxicidade aguda em mamíferos; Genotoxicidade e citotoxicidade em linfócitos do sangue periférico humano <i>in vitro</i> .	QIAN et al, 2018a.
		Efeitos tóxicos no crescimento e metabolismo da alga <i>Chlorella vulgaris</i> .	QIAN et al 2018b.
		Efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento e neurodesenvolvimento em embriões de peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ).	QIAN et al 2018a; WANG et al., 2020.
Carbendazim	Banido	Carcinogênese, mutagênese e toxicidade reprodutiva em humanos.	ANVISA, 2022a.

		Disfunção hepatocelular, desregulação endócrina e aumento dos níveis de estrogênio em ratos e camundongos.	SINGH et al., 2016.
		Toxicidade sobre desenvolvimento embrionário de peixe-zebra.	
		Afeta a diversidade microbiana do solo, podendo reduzir a atividade enzimática dos microrganismos.	
Fluazinam	Autorizado	Baixa toxicidade aguda em mamíferos, potencial de sensibilização dérmica; A longo prazo tem potencial de efeito nos rins, pâncreas, testículos e medula óssea em ratos.	YOUNES et al., 2020.
		Alta toxicidade para organismos aquáticos.	YOUNES et al., 2020; WANG et al., 2018.
Procimidona	Reavaliação toxicológica	Carcinogênese e desregulador endócrino em humanos.	ANVISA, 2022a.
		Toxicidade cardíaca e metabólica em larvas de peixe-zebra.	WU et al., 2021.
Tiofanato-metílico	Reavaliação toxicológica	Mutagenicidade e desregulador endócrino em humanos.	ANVISA, 2022a.
		Hepatotoxicidade em peixe-zebra.	JIA et al., 2020.

#### 2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum*

A preocupação com o desenvolvimento de resistência de *S. sclerotiorum* aos fungicidas comumente utilizados fez com que o investimento em pesquisa de novas alternativas de controle aumentasse (O'SULLIVAN et al., 2021). Neste cenário, o controle biológico, que consiste no uso de microrganismos e seus metabólitos, na redução dos danos causados por fitopatógenos, vem ganhando cada vez mais espaço, visto que essa é uma alternativa eficiente, segura e de menor impacto ambiental (IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2021; YU et al., 2022).

São conhecidos quatro tipos de controle biológico, o controle biológico natural, conservacionista, clássico e aumentativo. No controle natural, as populações dos causadores de doenças ou insetos-praga são mantidos em equilíbrio pela ocorrência natural de inimigos ou antagonistas no ambiente; no controle conservacionista, busca-se a preservação e o aumento natural das populações de inimigos naturais na região afetada; no controle clássico, há a introdução de inimigos naturais de uma praga ou doença no ambiente afetado, dessa forma, espera-se estabelecer uma população de inimigos naturais antes inexistente na região; já o controle aumentativo, é o mais conhecido e utilizado na agricultura, nele há uma produção e aplicação massal de agentes de biocontrole de uma doença ou praga no cultivo, é o caso dos produtos comerciais contendo fungos e bactérias ou seus metabólitos (BETTIOL, 2022).

Atualmente, os bioprodutos comerciais disponíveis no Brasil contra *S. sclerotiorum* têm como base fungos do gênero *Trichoderma* spp. e as bactérias *Bacillus* spp. (DE FARIA et al., 2022). Alguns exemplos são, *Quality* e *Trichodermax EC*, a base de *Trichoderma asperellum*; *Rizoderma* e *Natucontrol*, a base de *Trichoderma harzianum*; e por último *Shocker*, formulado a partir de um consórcio formado por *Trichoderma harzianum* e duas cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* (MEYER et al., 2022).

Apesar dos bioprodutos serem limitados a esses gêneros microbianos, há muitos trabalhos investigando e demonstrando a eficácia de outros gêneros e espécies no controle do mofo-branco. Dentre os agentes fúngicos estão, *Clonostachys rosea*, *Gliocladium* spp., *Fusarium* spp. *Purpleocillium lilacinum* (TSAPIKOUNIS et al., 2019; ELSHERBINY et al. 2019; MASCARIN et al., 2022), além de *Coniothyrium minitans*, que já é comercializado fora do Brasil (O'SULLIVAN et al., 2021; DE FARIA et al., 2022). Já dentre as bactérias estão, *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. *Bacillus* spp. e *Burkholderia* spp. (DE ALMEIDA LOPES et al., 2018; ALBERT et al., 2022; YU et al., 2022).

A implementação dos controles químico e biológico em conjunto, deve ser considerada para uma maior eficiência no combate do mofo-branco, visto que assim é possível afetar diferentes estágios do desenvolvimento da doença. O controle químico age sob os apotécios, reduzindo a germinação de ascósporos, enquanto o controle biológico age, de maneira geral, parasitando os escleródios dormentes (DE FARIA et al., 2022).

## 2.5 INOCULANTES NO CONTROLE BIOLÓGICO

O uso de agentes de controle biológico (ACB) isoladamente para o controle de *S. sclerotiorum* é bem explorado. No entanto, fatores ambientais como temperatura e disponibilidade de água, podem afetar o desenvolvimento ótimo do agente de biocontrole, tornando sua eficácia variável em campo (IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2021; DE FARIA et al., 2022).

Uma alternativa ao uso dos ACBs isoladamente é a utilização de inoculantes formados por um consórcio microbiano. Tais consórcios são caracterizados pela associação de dois ou mais microrganismos, como fungos, bactérias e vírus (IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2021). Sendo assim, podemos combinar agentes de biocontrole com diferentes mecanismos de ação para se obter um efeito sinérgico (IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2021; O'SULLIVAN et al., 2021).

O fungo *C. rosea* pertence ao filo Ascomycota e a família *Bionectriaceae*, é caracterizado por ser um saprófita cosmopolita, habitante do solo e apresentando capacidade endofítica. *C. rosea* possui potencial de biocontrole relatado contra nematoides, insetos e fitopatógenos fúngicos importantes, como, por exemplo, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. e *S. Sclerotiorum* (WU et al., 2018; SUN et al., 2020). Seu potencial de biocontrole se dá por fatores como, sua capacidade micoparasitária, secreção de enzimas degradadoras e produção de metabólitos secundários (SUN et al., 2020).

*P. lilacinum* também faz parte do filo Ascomycota, pertencendo a família *Ophiocordycipitaceae*, e sendo caracterizado como um fungo cosmopolita. Seu potencial no biocontrole de nematoides, insetos e fungos fitopatogênicos, como *S. sclerotiorum*, também já foi relatado (ELSHARBINY, et al., 2019). As características que fazem *P. lilacinum* ser um ACB incluem, a secreção de enzimas degradadoras e a produção de metabólitos secundários (CHEN e HU, 2021).

O gênero *Bjerkandera* sp., pertence ao filo Basidiomycota e a família *Polyporaceae*, sendo caracterizado como saprófita e fazendo parte dos fungos da podridão branca. Dentre as espécies do gênero, *B. adusta* é a mais estudada, sendo seu potencial de degradação de compostos complexos, como a lignina, bem conhecido (BOUACEM et al., 2018). Seu potencial de biocontrole contra fungos

fitopatogênicos ainda é pouco explorado, havendo alguns trabalhos que relatam sua ação contra *Fusarium* spp. (FENG et al., 2021).

Portanto, devido ao potencial de biocontrole contra fitopatógenos fúngicos de *C. rosea* e *P. lilacinum* já descritos em literatura, e o potencial pouco explorado de *Bjerkandera* sp., este trabalho visa avaliar o potencial de biocontrole desses fungos, isolados e em consórcio, contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial de biocontrole *in vitro* dos fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, isolados e em consórcio, contra o fungo *S. sclerotiorum*, causador do mofo-branco.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar os fungos de biocontrole na presença do patógeno;
- Avaliar a taxa de inibição de crescimento *S. sclerotiorum* na presença dos diferentes fungos de biocontrole, isolados e em consórcio;
- Avaliar a taxa de crescimento dos fungos de biocontrole na presença e ausência de *S. sclerotiorum*;
- Avaliar o potencial de antagonismo *in vitro* dos fungos *C. rosea* CCMIBA\_39, *P. lilacinum* CCMIBA\_38 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, isolados e em consórcio contra *S. sclerotiorum*;
- Produzir escleródios de *S. sclerotiorum* para avaliação da germinação na presença e ausência dos fungos de biocontrole.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MICRORGANISMOS

Esse trabalho faz parte do projeto intitulado “Desenvolvimento de Inoculante para Biorremediação de Solos Agrícolas baseado na Associação de Fungos e Carvão Ativado” coordenado pela Profa. Rafaella Costa Bonugli Santos. No projeto, foram selecionados três fungos pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental – CCMIBA, situada no laboratório de Bioquímica e Microbiologia da UNILA: *Clonostachys rosea* CCMIBA\_39, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_38, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40. A seleção de tais fungos ocorreu devido a produção de enzimas ligninolíticas, potencial bibliográfico de controle biológico de fitopatógenos e capacidade de degradação do herbicida atrazina. Os fungos selecionados foram inicialmente submetidos ao teste de antagonismo para avaliar o potencial de cultivo em conjunto, após foram cultivados em consórcio com a adição de carvão ativado como imobilizante, conforme dissertação de mestrado em Biociências da discente Adriana Heiss Siqueira do projeto intitulado “Tratamento de Solo Agrícola Contaminado com Atrazina por Fungos Filamentosos Imobilizados em Carvão Ativado”, em andamento.

A cepa do fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi cedida pela Coleção de Culturas de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental - CMAA da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA) e atualmente está depositada na CCMIBA.

Para o presente estudo todos os fungos de biocontrole e o patógeno, foram reativados em placa de Petri em meio sólido malte 2% (MA2) e em meio sólido Batata Dextrose Ágar (BDA), por sete dias a 28°C. Posteriormente, ao constatar um lento crescimento dos fungos após a reativação em ambos os meios utilizados, os fungos foram cultivados em meio sólido contendo malte enriquecido (20 g/L de extrato de malte, 15 g/L de ágar, 10 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de levedura) e em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA).

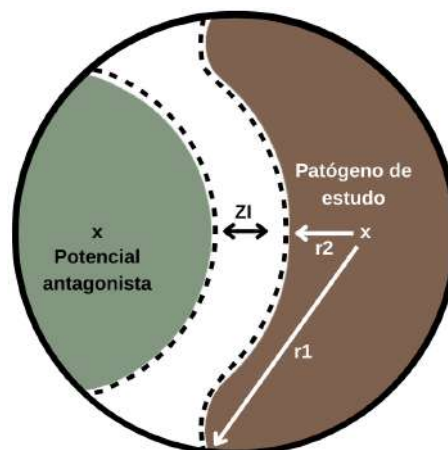
## 4.2 TESTES DE CULTURA DUPLA

O teste de cultura dupla, para avaliar o antagonismo *in vitro* dos fungos contra a *S. sclerotiorum* foi realizado com cada um dos fungos isoladamente e em consórcio. Sendo assim, como forma de padronizar o experimento, o meio escolhido para o teste foi o malte enriquecido.

Portanto, após sete dias de crescimento fúngico, discos de ágar (9 mm) foram retirados das bordas do micélio dos fungos e inoculados em lados opostos de uma placa de petri com meio malte enriquecido. Foram executados dois experimentos de cultura dupla, com diferentes tratamentos e tempo de incubação.

O primeiro teste de cultura dupla foi delineado de forma que a atividade antagonista fosse determinada a partir da avaliação de dois parâmetros, a zona de inibição (ZI) e a porcentagem de inibição de crescimento radial (ICR). A ZI é determinada pela menor distância entre o patógeno e o agente de biocontrole testado, enquanto a porcentagem de ICR é dada pela seguinte fórmula:  $ICR (\%) = [(r1-r2)/r1] \times 100$ , onde  $r1$  representa o maior crescimento micelial do patógeno, e  $r2$  o menor crescimento micelial do patógeno, na presença do antagonista, como exemplificado na figura 6 (ROYSE e RIES, 1978).

**Figura 6-** Diagrama de inoculação do teste de antagonismo, contendo os parâmetros de zona de inibição e de inibição do crescimento



Fonte: Adaptado de ROYSE e RIES (1978).

Dessa forma, foram feitos cinco tratamentos, T1: apenas *S. sclerotiorum* como controle, T2: *S. sclerotiorum* + *C. rosea* CCMIBA\_39, T3: *S. sclerotiorum* + *P. lilacinum* CCMIBA\_38, T4: *S. sclerotiorum* + *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, e T5: *S.*

*sclerotiorum* + consórcio microbiano (todos os fungos de biocontrole). Sendo que, os fungos *C. rosea* CCMIBA\_39 e *P. lilacinum* CCMIBA\_38 foram inoculados apenas dois dias após a inoculação do patógeno, justificada pelo crescimento acelerado e produção de esporos observados no cultivo prévio dessas duas cepas. Os fungos *S. sclerotiorum* e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, foram inoculados no mesmo dia, por apresentarem crescimento semelhante. O experimento foi executado em trélicas, e as placas incubadas a 28°C durante dez dias (ELSHERBINY et al., 2019).

No segundo teste de cultura dupla, os fungos de biocontrole e o patógeno foram inoculados no mesmo dia, e o experimento foi delineado de forma que a atividade antagonista fosse determinada pela escala proposta por BELL et al. (1982) e modificada conforme DE CONTO et al. (2021), onde atribui-se uma nota de 1 a 5, a depender se o fungo de biocontrole ocupou 100%, 75%, 50%, 25%, ou 0% da placa, respectivamente. Desse modo, notas de 1 a 3, significam uma boa atividade antagônica.

A porcentagem da taxa de crescimento do fungo de biocontrole no tratamento com o patógeno, que indica seu potencial antagonista, foi determinada considerando o tamanho da placa de 8,7 cm, através da equação 1:

$$\% \text{ potencial antagonista} = \left( \frac{\text{crescimento médio do fungo de biocontrole na presença do patógeno}}{\text{tamanho da placa}} \right) \times 100$$

Equação 1

Sendo assim, o segundo teste de cultura dupla gerou os seguintes tratamentos, T1: *S. sclerotiorum* + *C. rosea* CCMIBA\_39, T2: *S. sclerotiorum* + *P. lilacinum* CCMIBA\_38, T3: *S. sclerotiorum* + *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, e T4: *S. sclerotiorum* + consórcio microbiano (ELSHERBINY et al., 2019). Como controle, foram feitos inóculos do patógeno e dos fungos de biocontrole isolados e em consórcio. O experimento foi executado em trélicas, e as placas foram incubadas a 28°C durante oito dias.

### 4.3 PRODUÇÃO DE ESCLERÓDIOS PARA AVALIAÇÃO DE GERMINAÇÃO

Para a produção dos escleródios, discos de ágar (9 mm) de *S. sclerotiorum* foram inoculados em placas de petri contendo meio malte enriquecido, e incubadas por duas semanas a 20°C; um outro cultivo foi feito em placas com meio BDA, e incubadas por três semanas a 20°C seguida de duas semanas a 18°C (ELSHERBINY et al., 2019). No entanto, em nenhum dos cultivos houve a produção de escleródios, não possibilitando a avaliação do efeito dos biocontroles sobre a germinação dos escleródios.

### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O software PAST 4.03 e o Microsoft Excel foram usados para todas as análises estatísticas. As diferenças entre as médias foram analisadas por ANOVA, seguida por teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MICRORGANISMOS

Os fungos, a princípio incubados em meio BDA e em meio malte para reativação, apresentaram dificuldade de crescimento, dessa forma, foi necessário padronizar o meio de cultivo, uma vez que nos testes de cultura dupla todos os fungos deveriam estar no mesmo meio, sem que essa modificação resultasse em vantagem para algum deles. Sendo assim, o meio malte enriquecido foi escolhido, uma vez que foi selecionado e utilizado no projeto citado anteriormente, “Desenvolvimento de Inoculante para Biorremediação de Solos Agrícolas baseado na Associação de Fungos e Carvão Ativado”, que utilizou as cepas da coleção CCMIBA. Portanto, foram feitos testes para avaliar o crescimento das cepas, resultando em bons crescimentos, inclusive do patógeno *S. sclerotiorum*, como visto na figura 7, o qual ainda não se conhecia o comportamento em meio malte enriquecido.

**Figura 7-** Crescimento de *S. sclerotiorum* em meio malte enriquecido



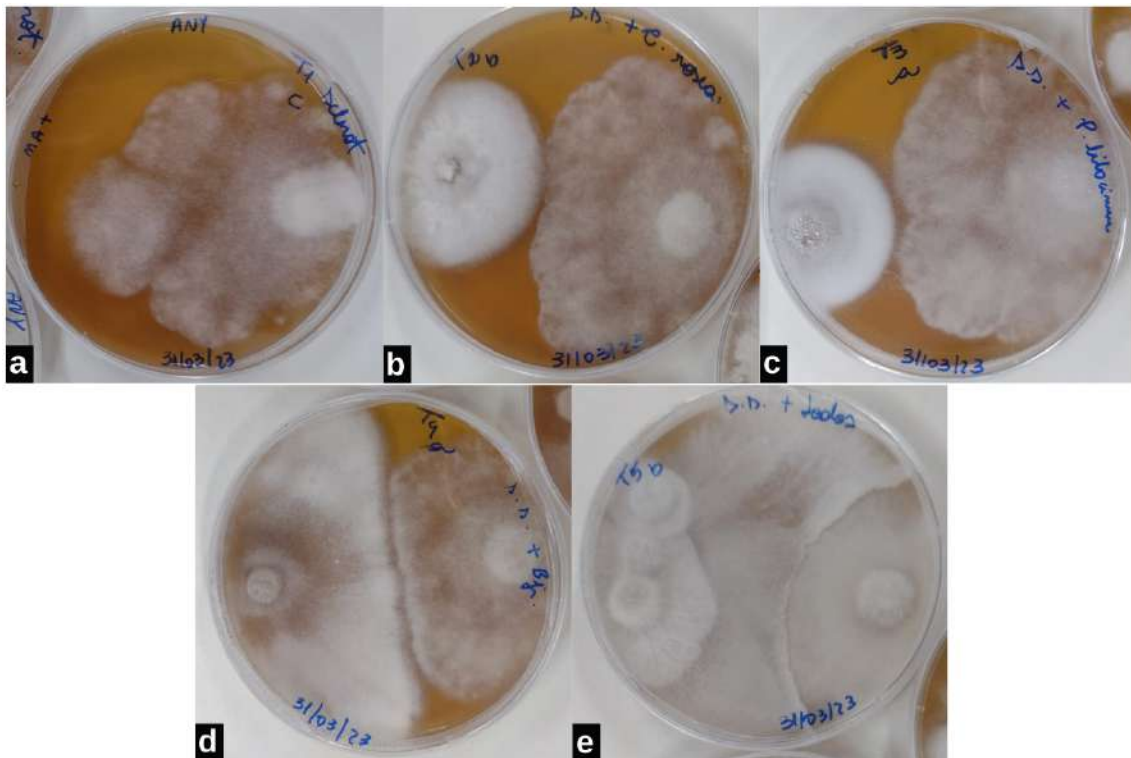
Legenda: Placa contendo *S. sclerotiorum* com seis dias de crescimento em meio malte enriquecido.  
Fonte: Autoria própria (2023).

### 5.2 TESTES DE CULTURA DUPLA

No primeiro teste de cultura dupla, o crescimento fúngico foi acompanhado todos os dias, até o encerramento do experimento no décimo dia de cultivo. Esse tempo de experimento prolongado é justificado como uma forma de

padronizar os tratamentos, já que os fungos *C. rosea* CCMIBA\_39 e *P. lilacinum* CCMIBA\_38, só foram incubados dois dias depois do patógeno. Os resultados ao fim do experimento estão apresentados na figura 8 e complementados pelo apêndice A.

**Figura 8-** Resultado do primeiro experimento de cultura dupla (pré análise)



Legenda: Resultado do primeiro experimento de cultura dupla, testando a atividade antagonista dos diferentes fungos de biocontrole contra *S. sclerotiorum*, placas com dez dias de cultivo em meio malte enriquecido a 28°C. a) tratamento 1, contendo apenas *S. sclerotiorum* (controle positivo); b) tratamento 2, *C. rosea* CCMIBA\_39 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); c) tratamento 3, *P. lilacinum* CCMIBA\_38 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); d) tratamento 4, *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); e e) tratamento 5, consórcio microbiano (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita). Imagens complementadas pelo apêndice A.

Fonte: Autoria própria (2023).

Os resultados como expressos na figura 8, do primeiro teste de cultura dupla, não permitiu que fosse feita a análise de atividade antagonista descrita no estudo de ROYSE e RIES (1978), que considerava os parâmetros de zona de inibição e a porcentagem de inibição de crescimento radial, para a determinação do potencial antagonista, visto que não houve a formação de uma zona de inibição de crescimento em nenhum dos tratamentos.

Sendo assim, esse primeiro teste, permitiu apenas comparar o crescimento do patógeno *S. sclerotiorum* nos tratamentos, com o controle, já que foi

a única cepa que se cultivou também um controle positivo (sem o fungo de biocontrole). Portanto, esse experimento foi caracterizado como uma pré-análise ou um estudo piloto. A taxa de crescimento de *S. sclerotiorum* é apresentada na tabela 1.

**Tabela 1-** Média da taxa de crescimento de *S. sclerotiorum* nos testes de cultura dupla nos diferentes tratamentos

Experimento	Controle positivo	<i>P. lilacinum</i> CCMIBA_38	<i>C. rosea</i> CCMIBA_39	<i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_40	Consórcio microbiano
1° teste (pré análise)	7,25*	4,38*	5*	3,67*	2,89*
2° teste	4,84*	4,20	3,85	3,28*	3,61*

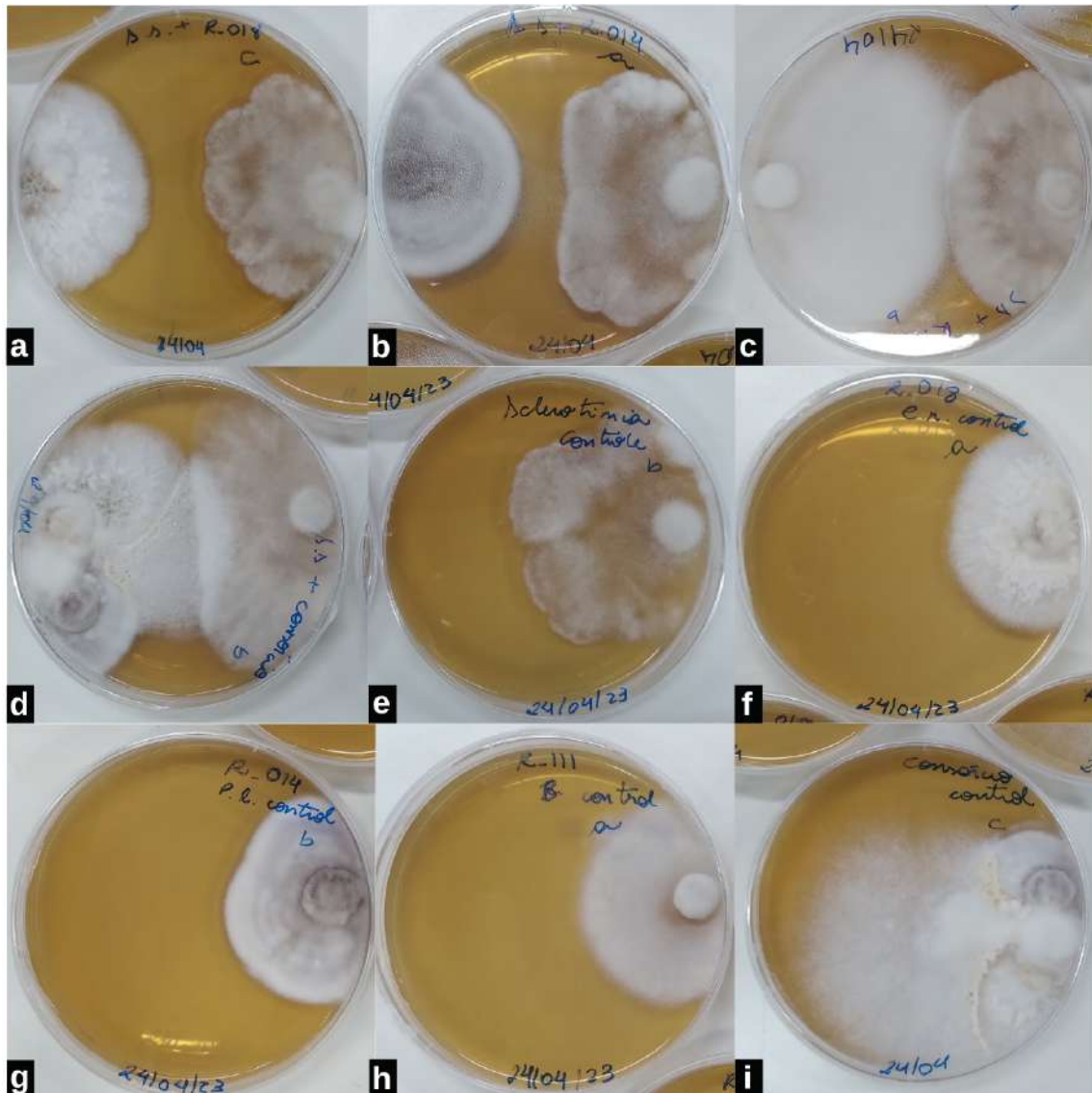
Legenda: Análise estatística do crescimento da *S. sclerotiorum*, na presença dos diferentes fungos de biocontrole, nos dois testes de cultura dupla. ANOVA  $p < 0,05$ . As médias seguidas de \* indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autoria própria (2023).

No primeiro teste, a redução do crescimento de *S. sclerotiorum* na presença dos biocontroles foi significativa em todos os tratamentos ( $p < 0,05$ ), sendo que uma maior redução é evidenciada nos tratamentos nos quais *S. sclerotiorum* foi inoculada com o consórcio microbiano, seguida do tratamento de inoculação com *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 (tabela 1).

O segundo teste de cultura dupla foi executado a fim de superar a limitação de análise dos resultados encontrados no primeiro teste. Sendo assim, foram incubados controles positivos de todas as cepas do estudo, e do consórcio microbiano. Assim como, todos os fungos foram incubados no mesmo dia, uma vez que, durante a pré análise os fungos, *C. rosea* CCMIBA\_39 e *P. lilacinum* CCMIBA\_38 não apresentaram crescimento acelerado, como o observado nos cultivos anteriores. Os perfis de cultivo ao fim do experimento estão apresentados na figura 9 e complementados no apêndice B.

**Figura 9-** Resultado do segundo experimento de cultura dupla



Legenda: Resultado do segundo experimento de cultura dupla, testando a atividade antagonista dos diferentes fungos de biocontrole contra *S. sclerotiorum*, placas com oito dias de cultivo em meio malte enriquecido a 28°C. a) *C. rosea* CCMIBA\_39 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); b) *P. lilacinum* CCMIBA\_38 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); c) *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); e d) consórcio microbiano (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita). As placas de e-i representam os controles positivos: e) *S. sclerotiorum*; f) *C. rosea* CCMIBA\_39; g) *P. lilacinum* CCMIBA\_38; h) *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40; e i) consórcio microbiano. Imagens complementadas pelo apêndice B.

Fonte: Autoria própria (2023).

No segundo teste, a redução de crescimento da *S. sclerotiorum* nos diferentes tratamentos só foi significativa nos tratamentos contendo o consórcio microbiano e no tratamento contendo *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40. Esse resultado é semelhante ao encontrado no primeiro teste, indicando que o fungo com maior potencial de redução de crescimento do patógeno é o *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 e os fungos em consórcio (tabela 1).

Sendo assim, de acordo com os resultados de crescimento da *S. sclerotiorum*, é possível observar que houve uma redução do crescimento do patógeno em todos os tratamentos em ambos os testes de cultura dupla, quando comparamos com os dados do controle.

Com os dados do segundo teste de cultura dupla, além da redução de crescimento do patógeno, uma segunda análise foi executada para avaliar o potencial de antagonismo dos fungos de biocontrole. O crescimento dos fungos de biocontrole na presença do patógeno foi comparado com o tamanho total da placa (8,7 cm) e as medições foram executadas utilizando-se um paquímetro manual e estão apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2-** Média da taxa de crescimento dos fungos de biocontrole no controle (C+) e no tratamento com *S. sclerotiorum* (T)

Tratamento	<i>C. rosea</i> CCMIBA_39		<i>P. lilacinum</i> CCMIBA_38		<i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_40		Consórcio microbiano	
	C+	T	C+	T	C+	T	C+	T
<b>Média</b>	3,72	3,65	3,76	3,47	3,84*	5,2*	6,72	4,25
<b>% potencial antagonista</b>	42%		40%		60%		49%	

Legenda: Análise estatística do crescimento dos fungos de biocontrole na presença e ausência de *S. sclerotiorum* e seu potencial antagonista. As médias seguidas de \* indicam diferença significativa de acordo com o teste de ANOVA ( $p < 0,05$ ). As médias do tratamento (T), foram utilizadas na equação 1, para determinar o potencial de antagonismo dos fungos de biocontrole. O controle (C+) é o crescimento do fungo isolado, sem o patógeno.

Fonte: Autoria própria (2023).

A análise mostrou que apenas o fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 possui um bom potencial antagonista, recebendo nota 3 na escala de BELL et al. (1982), ao ocupar 60% da placa na presença do patógeno. Os outros tratamentos, *P. lilacinum* CCMIBA\_38, *C. rosea* CCMIBA\_39 e consórcio microbiano, obtiveram nota 4, ao ocupar 40%, 42% e 49% da placa, respectivamente. Contudo, nota-se que o antagonismo promovido pelo consórcio é muito próximo a nota 3 da escala utilizada, indicando seu potencial (tabela 2).

Os dados do segundo teste de cultura dupla ainda permitiram uma terceira análise, executada para avaliar se houve diferenças significativas na taxa de crescimento dos fungos de biocontrole no tratamento com *S. sclerotiorum* quando

comparados aos seus controles positivos (sem o patógeno). No teste de ANOVA diferenças significativas só foram encontradas na taxa de crescimento do fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 (tabela 2).

Em resumo, todas as três análises feitas indicam que, dentre os fungos testados, *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 se apresentou como o melhor antagonista contra o patógeno *S. sclerotiorum*, uma vez que o patógeno apresentou uma taxa de crescimento diminuída significativamente na sua presença. Em adição, na presença do patógeno, *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 apresentou uma taxa de crescimento aumentada significativamente. Os bons resultados obtidos também pelo consórcio se dão, muito provavelmente, pela ação do fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, como pode ser observado nas imagens das tréplicas dos testes de cultura dupla (apêndice A e B).

O baixo potencial de antagonismo dos fungos *P. lilacinum* CCMIBA\_38 e *C. rosea* CCMIBA\_39 contra *S. sclerotiorum* não está de acordo com o encontrado em outros trabalhos (WU et al., 2018; ELSHERBINY et al., 2019; MASCARIN et al., 2022), inclusive foram selecionados para o consórcio devido a seus usos documentados na literatura. Os resultados aqui obtidos demonstram que as cepas utilizadas neste trabalho não possuem tal potencial de antagonismo ou que a metodologia adotada não foi a melhor para evidenciar esse potencial. Como abordado por JENSEN et al. (2022), unicamente a triagem *in vitro* de cepas de biocontrole pode não ser tão eficiente. Sendo assim, estudos envolvendo metabólitos ativos e secundários, e metodologias *in planta*, podem ser executados no futuro.

O trabalho de GEIGER et al. (2022), sugere a existência de variações nos mecanismos de antagonismo exibidos por *C. rosea*, a depender do patógeno testado, no trabalho, o patógeno *Botryosphaeria dothidea* foi suscetível ao micoparasitismo mas não aos efeitos antibióticos de *C. rosea*, diferente do encontrado para os outros fungos testados. Condições semelhantes podem ter influenciado nos resultados deste trabalho, uma vez que para ocorrer o micoparasitismo é necessário um contato entre as cepas, o que não foi observado, muito provavelmente, como citado também por GEIGER et al. (2022), pelo pouco tempo de experimento.

Já em um ensaio de cultura dupla para testar o potencial antagonista da cepa selvagem *P. lilacinum* 36-1 e seu mutante *P. lilacinum* pt361, contra *S. sclerotiorum*, YANG et al. (2015) demonstraram que apenas a cepa mutante foi eficaz como antagonista, os autores defendem a hipótese de que a cepa mutante é capaz de produzir metabólitos antifúngicos, como enzimas quitinases, que estão ausentes na cepa selvagem.

Portanto, as variações fisiológicas das cepas utilizadas neste trabalho e as utilizadas por outros pesquisadores, podem ter influenciado nos resultados divergentes encontrados para *P. lilacinum* CCMIBA\_38 e *C. rosea* CCMIBA\_39. O potencial antagonista de fungos de biocontrole de uma mesma espécie, mas derivada de diferentes substratos, pode variar, já que diferentes mecanismos fisiológicos podem ser adotados para adaptação às relações do nicho em que se encontram (NOBRE et al., 2005; LI et al., 2022; GEIGER et al., 2022).

Resultados positivos de antagonismo pelo fungo *Bjerkandera* sp., foram descritos no trabalho de LI et al. (2022), no qual a cepa *B. adusta* M1 foi eficaz no controle do fungo patógeno *Fusarium graminearum*, causador da sarna do trigo. O potencial antagonista de *B. adusta* M1 foi evidenciado através de testes de confronto, que se equiparam aos testes de cultura dupla utilizados neste trabalho.

LI et al. (2022) identificaram diferentes mecanismos de ação, que possivelmente tornam *B. adusta* M1 um antagonista eficiente, como competição por nutrientes e espaço, indução de resistência a doenças nas plantas, produção de substâncias ativas antimicrobianas e micoparasitismo. Tais mecanismos também são descritos no trabalho de FENG et al. (2021), que utilizou essa mesma cepa para inibir o crescimento do patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*.

SOLIMAN e EL-SAYED (2021), demonstraram a atividade antimicrobiana de substâncias ativas no extrato de *B. adusta* contra bactérias e levedura. Os autores identificaram compostos fenólicos, como os ácidos clorogênico, cafeico e siríngico, assim como os flavonóides, rutina e quercetina. Tais compostos quando isolados de plantas apresentam potencial de atividade antifúngica (KOVAL et al., 2020; KHAN et al., 2021). COSTA et al. (2019), identificou alguns destes compostos nos extratos do fungo basidiomiceto *Ganoderma lipsiense*, evidenciando a atividade antimicrobiana dos ácidos cafeico e siríngico.

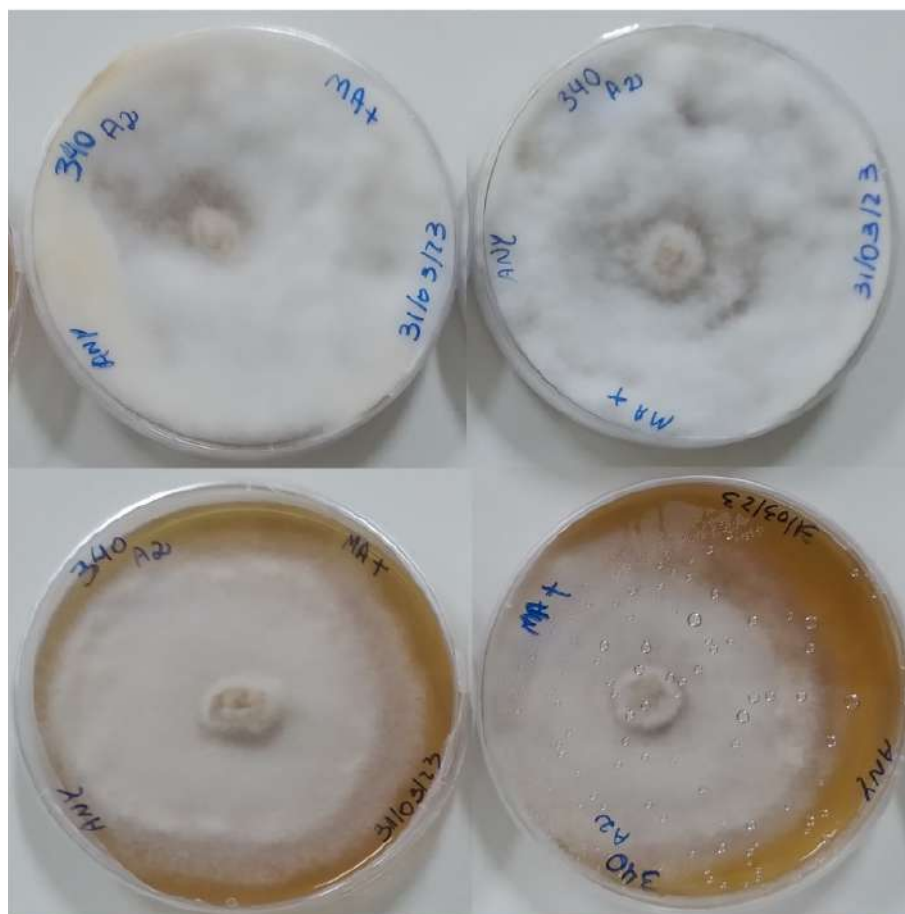
Há um crescente interesse na identificação e isolamento de compostos antimicrobianos e antifúngicos, como os compostos fenólicos e flavonoides identificados por SOLIMAN e EL-SAYED (2021) em *B. adusta*. A revisão de MOUSSA et al. (2022), demonstra o potencial promissor dos fungos basidiomicetos na produção desses compostos, além dos já citados, também é evidenciado o potencial de compostos policetídeos e terpenóides, isolados de diferentes espécies de basídios.

No presente trabalho, as observações demonstram que *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 utilizou, provavelmente, os mecanismos de competição por nutrientes e espaço, uma vez que obteve uma maior taxa de crescimento quando inoculado com o patógeno em comparação com o controle. Assim como, possivelmente, mecanismos de micoparasitismo, visto que suas hifas se conectaram com as hifas de *S. sclerotiorum* (apêndice A e B). No entanto, para avaliar se essa maior taxa de crescimento também foi favorecida por secreção de substâncias ativas e confirmar se houve micoparasitismo, mais estudos devem ser realizados.

### 5.3 PRODUÇÃO DE ESCLERÓDIOS PARA AVALIAÇÃO DE GERMINAÇÃO

Inicialmente, discos de ágar (9 mm) de *S. sclerotiorum*, foram inoculados em placas de petri contendo meio malte enriquecido, totalizando 12 placas. As placas foram incubadas a 28°C por dois dias, para garantir o crescimento fúngico, e posteriormente, foram incubadas a 20°C por duas semanas para a produção de escleródios. Após duas semanas, o patógeno nas placas contendo meio malte enriquecido exibia apenas características de crescimento micelial (figura 10).

**Figura 10-** *S. sclerotiorum* em meio malte enriquecido para a produção de escleródios

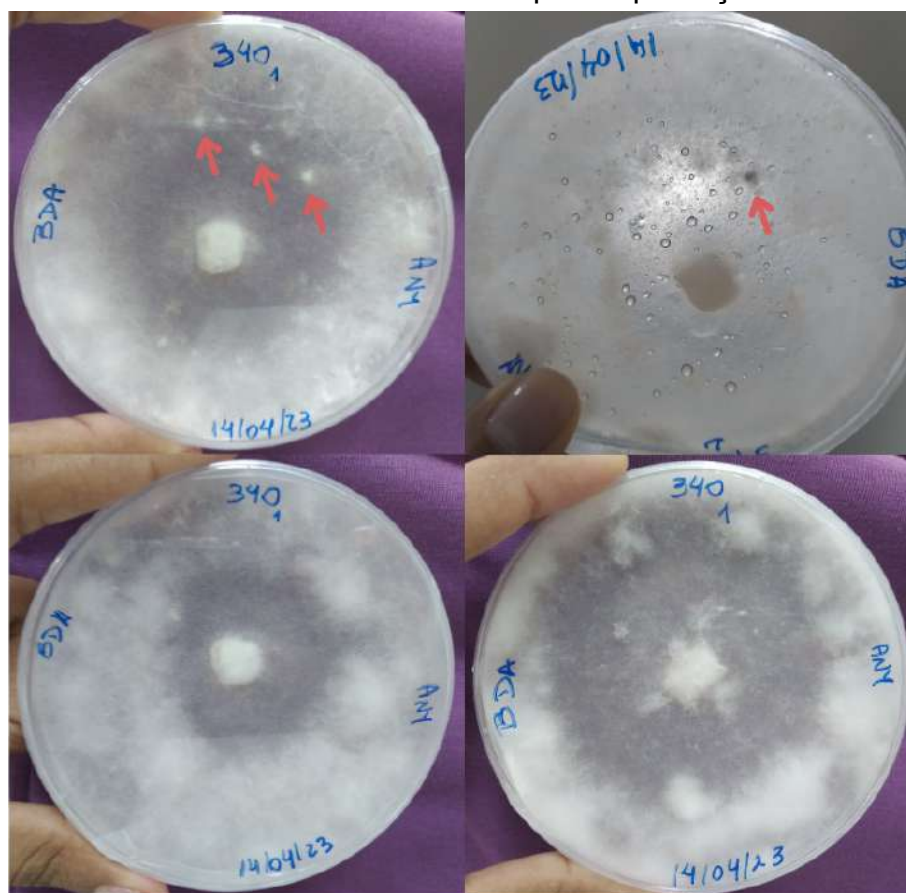


Legenda: *S. sclerotiorum* em meio malte enriquecido após duas semanas de cultivo a 20°C.  
Fonte: Autoria própria (2023).

Como observado, em algumas placas o crescimento micelial foi exacerbado e em outras o crescimento foi normal, porém, em nenhuma delas foi observada a produção de escleródios. A não produção de escleródios pode ser explicada pelo meio ser muito rico em nutrientes, sendo unicamente a diminuição da temperatura insuficiente para causar um estresse no patógeno, de modo que este produzisse suas estruturas de resistência.

Outro cultivo de germinação de escleródios foi executado, desta vez em meio BDA, assim como no primeiro experimento, os fungos foram crescidos a 28°C por dois dias e depois transferidos para 20°C. Após as três semanas de cultivo, não foi observado a produção de escleródios em nenhuma das placas, sendo assim, a temperatura foi trocada para 18°C e o cultivo seguiu por mais duas semanas. Ao final do experimento o patógeno exibiu menor produção de micélio em relação ao cultivo anterior. (figura 11).

**Figura 11-** *S. sclerotiorum* em meio BDA para a produção de escleródios



Legenda: *S. sclerotiorum* em meio BDA após cinco semanas de cultivo. As setas vermelhas indicam aglomerados de hifas que possivelmente formariam os escleródios.

Fonte: Autoria própria (2023).

Como observado na figura 11, algumas das placas apresentaram aglomerados de hifas, como indicado pelas setas vermelhas, caracterizando um início da formação de escleródios, no entanto, não houve a produção de fato e em tempo para realização das atividades do presente projeto. Esse resultado difere do encontrado por LIU et al. (2019) e ELSHERBINY et al. (2019), que conseguiram obter escleródios de *S. sclerotiorum* a partir de cultivos em meio BDA a 20°C, após 14 e 30 dias, respectivamente.

Fatores como a umidade e circulação de ar dentro da incubadora BOD podem ter influenciado nos resultados do experimento, como visto no apêndice C, algumas placas cultivadas em meio BDA tiveram grande acúmulo de água, o que não é favorável a integridade dos escleródios (MEYER et al., 2022).

Devido a não obtenção dos escleródios, não foi possível avaliar o potencial dos fungos de biocontrole e de seus extratos metabólicos sobre a germinação dos mesmos, o que era de grande interesse neste trabalho, visto que os

escleródios são os responsáveis pela persistência do mofo-branco no solo e consequentemente nos cultivares da soja, ao resistir no ambiente por um longo período e germinando assim que possuem as condições favoráveis (LIU et al. 2019; MEYER et al., 2022).

Dos mecanismos de antagonismo discutidos ao longo do trabalho, o micoparasitismo e a secreção de metabólitos antimicrobianos, são os mais eficientes na diminuição da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*. No Brasil, os bioprodutos disponíveis contra *S. sclerotiorum* têm como base apenas fungos do gênero *Trichoderma* spp. e as bactérias *Bacillus* spp., e estes podem possuir sua eficácia variável em campo devido, principalmente, às condições climáticas variáveis (DE FARIA et al., 2022; MEYER et al., 2022).

Portanto, ressalta-se a importância de continuar explorando o potencial de novas cepas para o controle do mofo-branco, assim como, de se formular consórcios microbianos, que sejam mais estáveis e que consigam abranger diferentes mecanismos de antagonismo contra o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, mas, principalmente contra seus escleródios, inibindo o patógeno logo em seu estágio inicial de desenvolvimento, diminuindo assim a disseminação e persistência da doença no solo e nos cultivares (DE FARIA et al., 2022).

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que, dentre os fungos estudados, *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 apresentou o melhor potencial antagonista contra *S. sclerotiorum*, apresentando também uma maior taxa de crescimento na presença do patógeno, e em paralelo, na sua presença, o patógeno teve sua taxa de crescimento diminuída significativamente. O consórcio microbiano apresentou resultados razoáveis, muito provavelmente pela presença de *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, já que os fungos *P. lilacinum* CCMIBA\_38 e *C. rosea* CCMIBA\_39 não apresentaram bons resultados de crescimento e antagonismo.

Apesar dos resultados promissores promovidos por *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40, não ficou evidente os mecanismos de sua interação com *S. sclerotiorum*. Sendo assim, estudos e análises adicionais, como testes de inibição do patógeno por substância ativas e metabólitos secundários, e análises de microscopia eletrônica para investigar micoparasitismo, se fazem necessários para elucidar essa interação. Em relação aos fungos *P. lilacinum* CCMIBA\_38 e *C. rosea* CCMIBA\_39, é importante, em estudos futuros, avaliar o potencial antagonista frente a outros fitopatógenos.

## REFERÊNCIAS

- ALBERT, Daphné et al. Combining Desirable Traits for a Good Biocontrol Strategy against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1189, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061189>. Acesso em: 22 out. 2022.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nova metodologia define reavaliação de agrotóxicos**. 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/nova-metodologia-define-reavaliacao-d-e-agrotoxicos>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Carbendazim: Anvisa concluiu processo de reavaliação e mantém o banimento**. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/carbendazim-anvisa-concluiu-processo-de-reavaliacao-e-mantem-o-banimento>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil**. 2022c. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2017/listas-de-ingredientes-ativos-com-uso-a-utorizado-e-banidos-no-brasil>. Acesso em: 02 jun. 2023.
- BANCO DE IMAGENS EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-imagens>. Acesso em 07 dez. 2022.
- BARRO, Jhonatan P. et al. Performance and profitability of fungicides for managing soybean white mold: A 10-year summary of cooperative trials. **Plant disease**, v. 103, n. 9, p. 2212-2220, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1760-RE>. Acesso em: 20 out. 2022.
- BELL, D. K. et al. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- BETTIOL, W. Pesquisa, desenvolvimento e inovação com bioinsumos. In: MEYER, M. C.; BUENO, A. de F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (ed.). Bioinsumos na cultura da soja. Brasília, DF: Embrapa, 2022. p. 21-38. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1143066/bioinsumos-na-cultura-da-soja>. Acesso em 10 dez. 2022.
- BOUFLEUR, Thais R. et al. Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 4, p. 393-409, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.13036>. Acesso em: 16 out. 2022.
- BOUACEM, Khelifa et al. Purification and characterization of two novel peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta* strain CX-9. **International journal of biological macromolecules**, v. 106, p. 636-646, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.061>. Acesso em: 30 out. 2022.
- CHEN, Wei; HU, Qiongbo. Secondary metabolites of *Purpureocillium lilacinum*. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27010018>. Acesso em: 30 out. 2022.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2022/23. V. 10, nº 3- Terceiro levantamento. p. 1-81, Brasília/DF, dezembro de 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 10 dez. 2022.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2022/23. V. 10, nº 8- Oitavo levantamento. p. 1-106, Brasília/DF, maio 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 02 jun. 2023.
- CONTE, Osmar et al. Manejo do solo. In: SEIXAS et al. **Tecnologias de produção de soja**. Londrina/PR: Embrapa Soja, 2020. p.55-80. Disponível em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1128396/1/p.-55-80-de-SP-17-2020-online.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2022.

COSTA, Tania Maria et al. Produção de metabólitos bioativos pelo fungo *Ganoderma lipsiense* cultivado em arroz vermelho. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/214689>. Acesso em: 27 maio 2023.

DE ALMEIDA LOPES, Karla Bianca et al. Screening of bacterial endophytes as potential biocontrol agents against soybean diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1466-1481, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14041>. Acesso em: 16 out. 2022.

DE AZEVEDO SILVA, Fábio et al. Introduction of *Trichoderma* spp. biocontrol strains against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary change soil microbial community composition in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivation. **Biological Control**, v. 163, p. 104755, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104755>. Acesso em: 14 out. 2022.

DE CONTO, Leonardo Machado et al. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. nativos em controlar o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e como promotor de crescimento na cultura da soja. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 30616-30632, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-673>. Acesso em: 08 maio 2023.

DE FARIA, Amanda Flausino et al. Seven years of white mold biocontrol product's performance efficacy on *Sclerotinia sclerotiorum* carpogenic germination in Brazil: a meta-analysis. **Biological Control**, p. 105080, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105080>. Acesso em: 17 out. 2022.

DIAS-ARIEIRA, Cláudia Regina et al. Correlations between nematode numbers, chemical and physical soil properties, and soybean yield under different cropping systems. **Rhizosphere**, v. 19, p. 100386, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100386>. Acesso em: 16 out. 2022.

ELSHERBINY, E. A.; TAHER, M. A.; ELSEBAI, M. F. Activity of *Purpureocillium lilacinum* filtrates on biochemical characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum* and induction of defense responses in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 1, p. 39-52, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01748-5>. Acesso em: 14 set. 2022.

FENG, Xiao et al. *Bjerkandera adusta* M1 inhibits the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and *fusarium* wilt incidence in *Brassica napus* L. **Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 2, p. 483-491, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00753-0>. Acesso em: 30 out. 2022.

FRAC-BR. Comitê de Ação de Resistência a Fungicidas. Disponível em: <https://www.frac-br.org/>. Acesso em: 20 out. 2022

FRANCHINI, J. C. et al. Variabilidade espacial e temporal da produção de soja no Paraná e definição de ambientes de produção. Documentos n° 374, ISSN 2176-2937. Embrapa Soja, Londrina-PR, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1052786/>. Acesso em: 10 dez. 2022.

GALE, Fred; VALDES, Constanza; ASH, Mark. Interdependence of China, United States, and Brazil in soybean trade. **New York: US Department of Agriculture's Economic Research Service (ERS) Report**, p. 1-48, 2019. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=93389>. Acesso em: 13 out. 2022.

GEIGER, Adrienn et al. Mycoparasitism capability and growth inhibition activity of *Clonostachys rosea* isolates against fungal pathogens of grapevine trunk diseases suggest potential for biocontrol. **Plos one**, v. 17, n. 9, p. e0273985, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273985>. Acesso em: 30 maio 2023.

HENNING, Ademir Assis et al. Tecnologia de sementes. In: SEIXAS et al. **Tecnologias de produção de soja**. Londrina/PR: Embrapa Soja, 2020. p. 293-316. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1128407/1/p.-293-316-de-SP-17-2020-online.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2022.

IZQUIERDO-GARCÍA, L. F.; COTES, A. M.; MORENO-VELANDIA, C. A. Screening for effective microbial consortia against *Fusarium* wilt of cape gooseberry (*Physalis peruviana*). **BioControl**, v. 66, n. 5, p. 713-725, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10095-6>. Acesso em: 24 out. 2022.

JENSEN, D. F. et al. *Clonostachys rosea* to control plant diseases. Burleigh dodds series in agricultural science. 2022. Disponível em: <https://library.oapen.org/handle/20.500.12657/61518>. Acesso em: 30 maio 2023.

JIA, Kun et al. Thiophanate-methyl induces severe hepatotoxicity in zebrafish. **Chemosphere**, v. 248, p. 125941, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125941>. Acesso em: 11 dez. 2022.

KHAN, Fazlurrahman et al. Caffeic acid and its derivatives: antimicrobial drugs toward microbial pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 2979-3004, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07579>. Acesso em: 27 maio 2023

KOVAL, Daniel et al. Buckwheat secondary metabolites: Potential antifungal agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 42, p. 11631-11643, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04538>. Acesso em: 27 maio 2023.

LEHNER, M. S. et al. Meta-analytic modelling of the incidence–yield and incidence–sclerotial production relationships in soybean white mould epidemics. **Plant Pathology**, v. 66, n. 3, p. 460-468, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ppa.12590>. Acesso em: 13 out. 2022.

LI, Suping et al. A *Bjerkandera adusta* new strain as a potential biocontrol agent against wheat scab. **International Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 831-838, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00265-6>. Acesso em: 23 maio 2023.

LIN, Feng et al. Breeding for disease resistance in soybean: A global perspective. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 1-100, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04101-3>. Acesso em: 14 out. 2022.

LIU, Dongli et al. Antifungal, plant growth-promoting, and genomic properties of an endophytic actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2077, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02077>. Acesso em: 29 out. 2022.

MASCARIN, Gabriel Moura et al. *Clonostachys rosea*: Production by Submerged Culture and Bioactivity Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bemisia tabaci*. **Frontiers in microbiology**, v. 13, p. 851000-851000, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.851000/full>. Acesso em: 08 set. 2022.

MEYER, M. C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2014/2015 – resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Embrapa soja-Londrina/PR, 2015. Circular técnica 124, ISSN 2176-2864. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/133605/1/CT114.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2022.

MEYER, M. C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2019/2020: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos Embrapa soja-Londrina/PR, 2020. Circular técnica 165, ISSN 2176-2864. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/217684/1/Circ-Tec-165.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2022.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; GODOY, C. V. Controle biológico de mofo-branco na cultura da soja. In: MEYER, M. C. et al. **Bioinsumos na cultura da soja**. Editores técnicos - Brasília, DF: Embrapa,

2022. p. 315-329. Disponível em:  
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1147051/1/cap-18-Bioinsumos-na-cultura-da-soja.pdf>. Acesso em: 12 out. 2022.

MIORINI, Thomas JJ et al. Determination of the protection period of fungicides used for control of *Sclerotinia* stem rot in soybean through bioassay and chromatography. **European Journal of Plant Pathology**, v. 159, n. 4, p. 877-889, 2021. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1007/s10658-021-02212-z>. Acesso em: 18 out. 2022.

MOUSSA, Ashaimaa Y. et al. New insights into antimicrobial and antibiofilm effects of edible mushrooms. **Food Research International**, p. 111982, 2022. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111982>. Acesso em: 30 maio 2023.

NEUMAIER, Norman et al. Ecofisiologia da soja. In: SEIXAS et al. **Tecnologias de produção de soja**. Londrina/PR: Embrapa Soja, 2020. p.33-54. Disponível em:  
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1128387/1/p.-33-54-de-SP-17-2020-online.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2022.

NOBRE, Sérgio AM et al. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v. 34, n. 2, p. 132-143, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.04.011>>. Acesso em: 30 maio 2023.

OLIVEIRA JUNIOR, A. de et al. Fertilidade do solo e avaliação do estado nutricional da soja. In: SEIXAS et al. **Tecnologias de produção de soja**. Londrina/PR: Embrapa Soja, 2020. p.133-184.

O'SULLIVAN, Cathryn A.; BELT, Katharina; THATCHER, Louise F. Tackling control of a cosmopolitan phytopathogen: *Sclerotinia*. **Frontiers in Plant Science**, p. 1764, 2021. Disponível em:  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.707509>. Acesso em: 20 out. 2022.

QIAN, Le et al. Mechanisms of developmental toxicity in zebrafish embryos (*Danio rerio*) induced by boscalid. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 478-487, 2018a. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.012>. Acesso em: 11 dez. 2022.

QIAN, Le et al. Toxic effects of boscalid on the growth, photosynthesis, antioxidant system and metabolism of *Chlorella vulgaris*. **Environmental pollution**, v. 242, p. 171-181, 2018b. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.055>. Acesso em: 11 dez. 2022.

REIS, Erlei Melo et al. Ciclo do mofo-branco. **Revista Plantio Direto-Março/Abril de**, v. 2011, p. 25. Disponível em: <https://www.plantiodireto.com.br/storage/files/122/5.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2022.

ROYSE, D. J.; RIES, S. M. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. **Phytopathology**, v. 68, n. 4, p. 603-607, 1978. Acesso em: 28 out. 2022.

SINGH, Simranjeet et al. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. **Environmental chemistry letters**, v. 14, n. 3, p. 317-329, 2016. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1007/s10311-016-0566-2>. Acesso em: 11 dez. 2022.

SOLIMAN, Elham RS; EL-SAYED, Heba. Molecular identification and antimicrobial activities of some wild Egyptian mushrooms: *Bjerkandera adusta* as a promising source of bioactive antimicrobial phenolic compounds. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00200-8>. Acesso em: 26 maio. 2023.

SUN, Z.-B. et al. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 3, p. 486-495, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14625>. Acesso em: 09 set. 2022.

TSAPIKOUNIS, Fanis A.; IPSILANDIS, Constandinos G.; GREVENIOTIS, Vasileios. Studies on the infection and parasitism course of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by three different mycoparasites. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 126, n. 3, p. 225-235, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00210-2>. Acesso em: 22 out. 2022.

WANG, Honglei et al. Characterization of boscalid-induced oxidative stress and neurodevelopmental toxicity in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 238, p. 124753, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124753>. Acesso em: 11 dez. 2022.

WANG, Xiao H. et al. Fluazinam impairs oxidative phosphorylation and induces hyper/hypo-activity in a dose specific manner in zebrafish larvae. **Chemosphere**, v. 210, p. 633-644, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.056>. Acesso em: 11 dez. 2022.

WILLBUR, Jaime et al. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 3-11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40858-018-0250-0>>. Acesso em: 15 out. 2022.

WU, Anyi et al. Developmental toxicity of procymidone to larval zebrafish based on physiological and transcriptomic analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 248, p. 109081, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109081>. Acesso em: 11 dez. 2022.

WU, Hong-qu et al. Preparation of dry flowable formulations of *Clonostachys rosea* by spray drying and application for *Sclerotinia sclerotiorum* control. **Journal of integrative agriculture**, v. 17, n. 3, p. 613-620, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61811-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61811-2). Acesso em: 22 out. 2022.

YANG, Fan; ABDELNABBY, Hazem; XIAO, Yannong. A mutant of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) is a novel biocontrol agent for *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microbial pathogenesis**, v. 89, p. 169-176, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.012>>. Acesso em: 30 maio 2023.

YOUNES, Nabil A.; DAWOOD, Mona FA; WARDANY, Ahmed A. The phyto-impact of fluazinam fungicide on cellular structure, agro-physiological, and yield traits of pepper and eggplant crops. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 15, p. 18064-18078, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08289-z>. Acesso em: 11 dez. 2022.

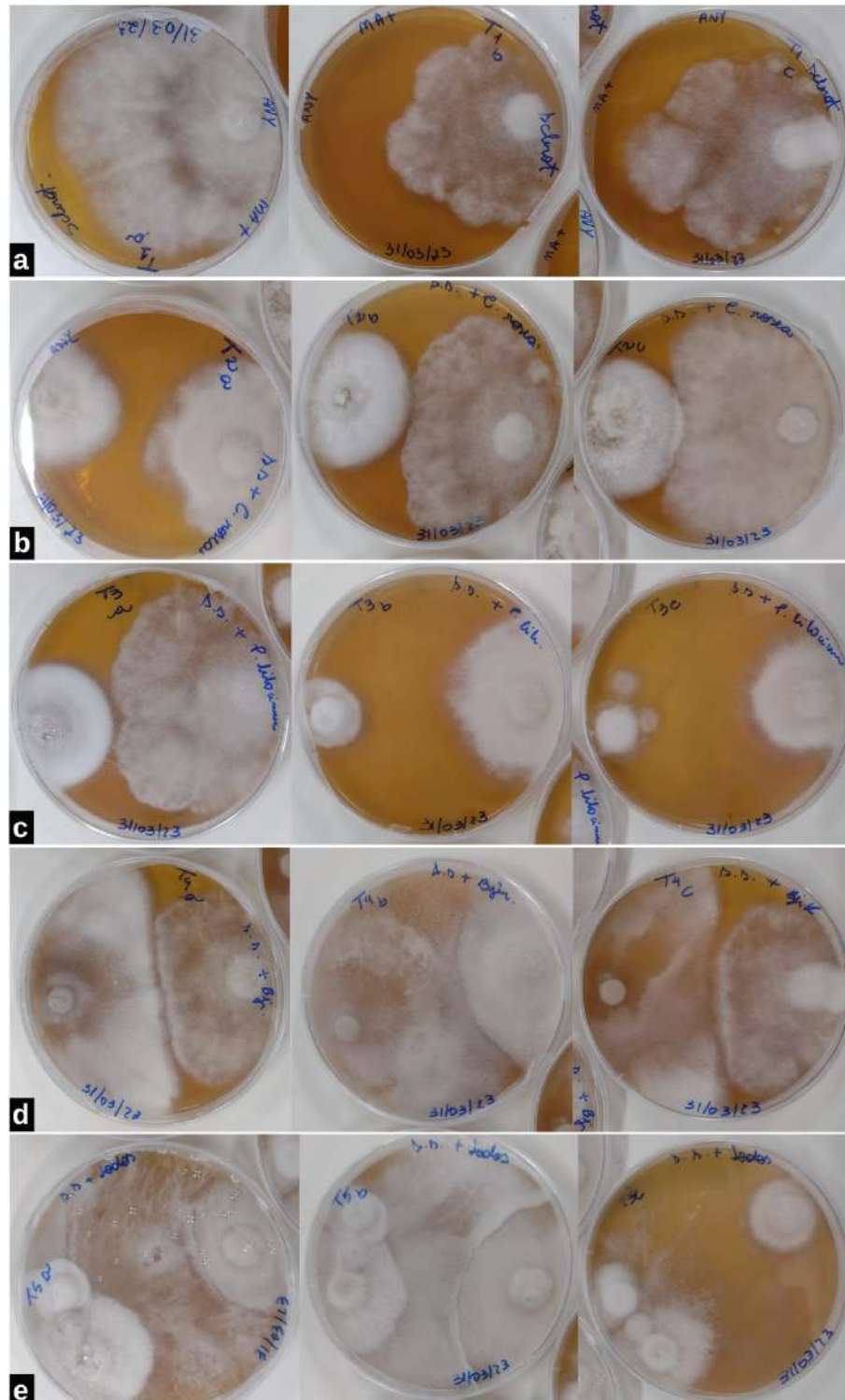
YU, Shu-Fan et al. Biocontrol of Three Severe Diseases in Soybean. **Agriculture**, v. 12, n. 9, p. 1391, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriculture12091391>. Acesso em: 16 out. 2022.

ZANATTA, Thais P. et al. Morphological and pathogenic characterization of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 8, p. 302-313, 2019. Disponível em: [10.5539/jas.v11n8p302](https://doi.org/10.5539/jas.v11n8p302). Acesso em: 05 dez. 2022.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A - Resultado do primeiro teste de cultura dupla

**Figura- Tréplicas dos tratamentos**

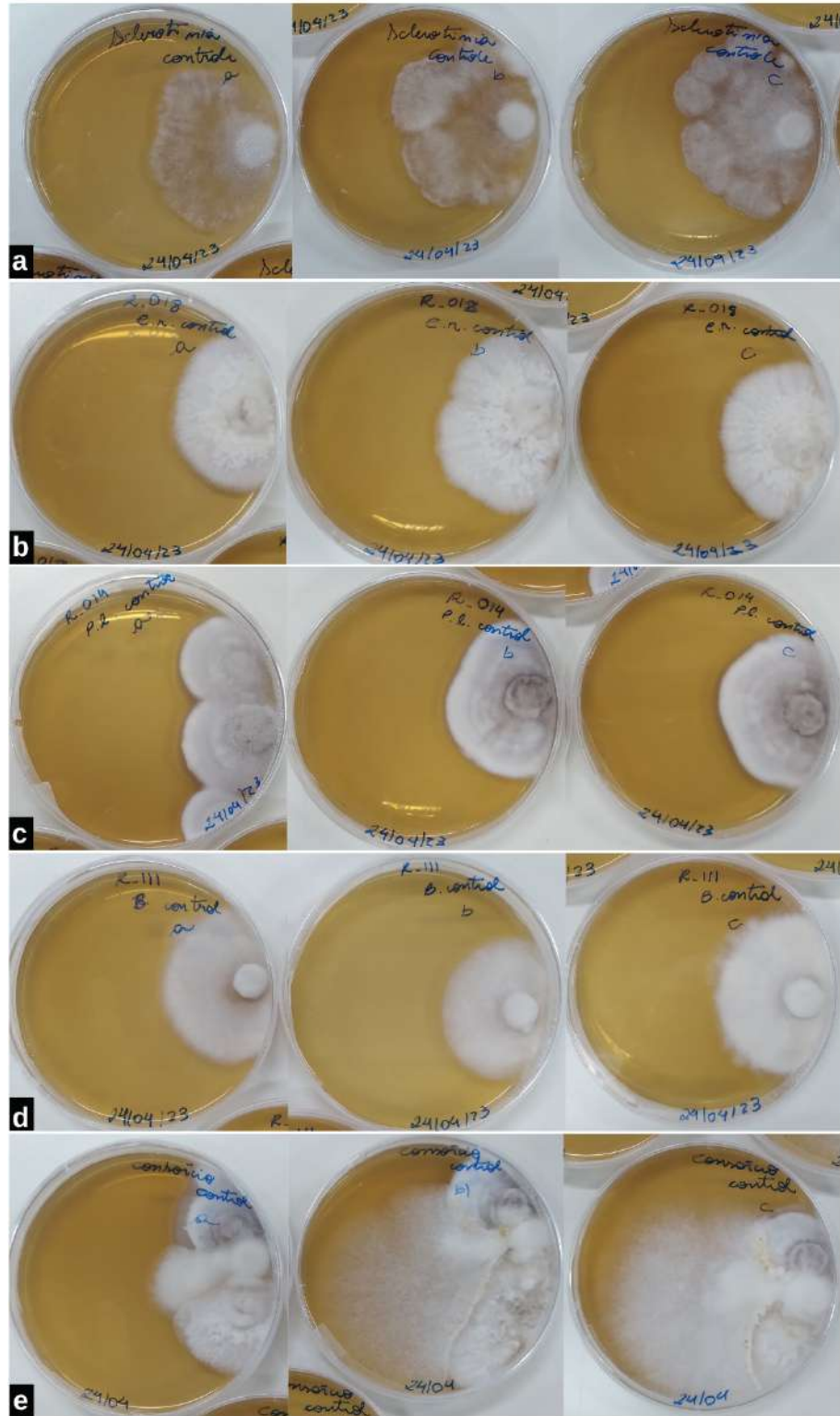


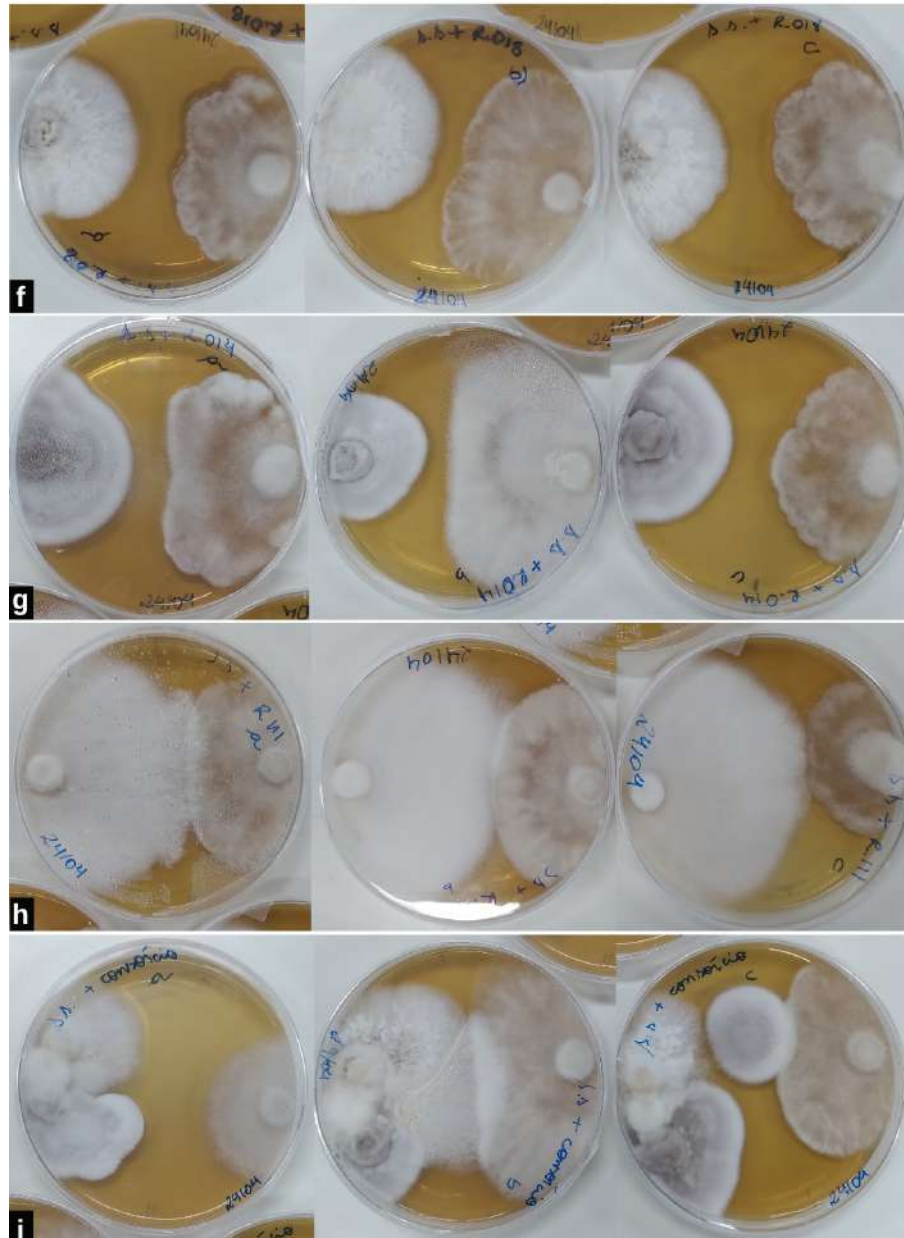
Legenda: Tréplicas do primeiro teste de cultura dupla. a) T1: Controle positivo de *S. sclerotiorum*; b) T2: *C. rosea* CCMIBA\_39 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); c) T3: *P. lilacinum* CCMIBA\_38 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); d) T4: *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); e) T5: Consórcio microbiano (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita).

Fonte: Autoria própria (2023).

APÊNDICE B - Resultado do segundo teste de cultura dupla

Figura- Tréplicas dos tratamentos



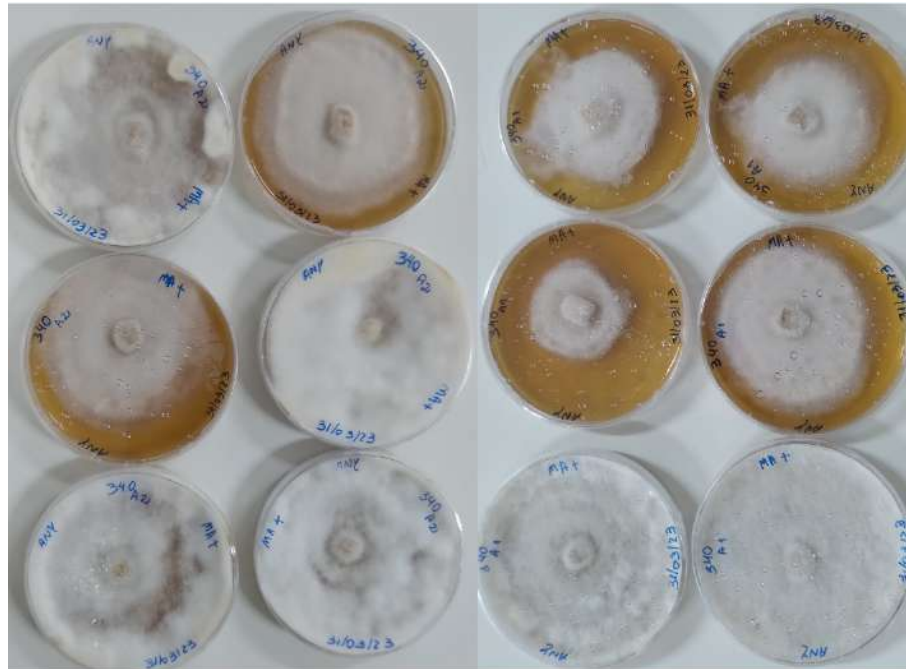


Legenda: Tréplicas do segundo teste de cultura dupla. a) Controle positivo de *S. sclerotiorum*; b) Controle positivo de *C. rosea* CCMIBA\_39; c) Controle positivo de *P. lilacinum* CCMIBA\_38; d) Controle positivo de *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40; e) Controle positivo do Consórcio microbiano; f) *C. rosea* CCMIBA\_39 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); g) *P. lilacinum* CCMIBA\_38 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); h) *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita); e i) Consórcio microbiano (esquerda) e *S. sclerotiorum* (direita).

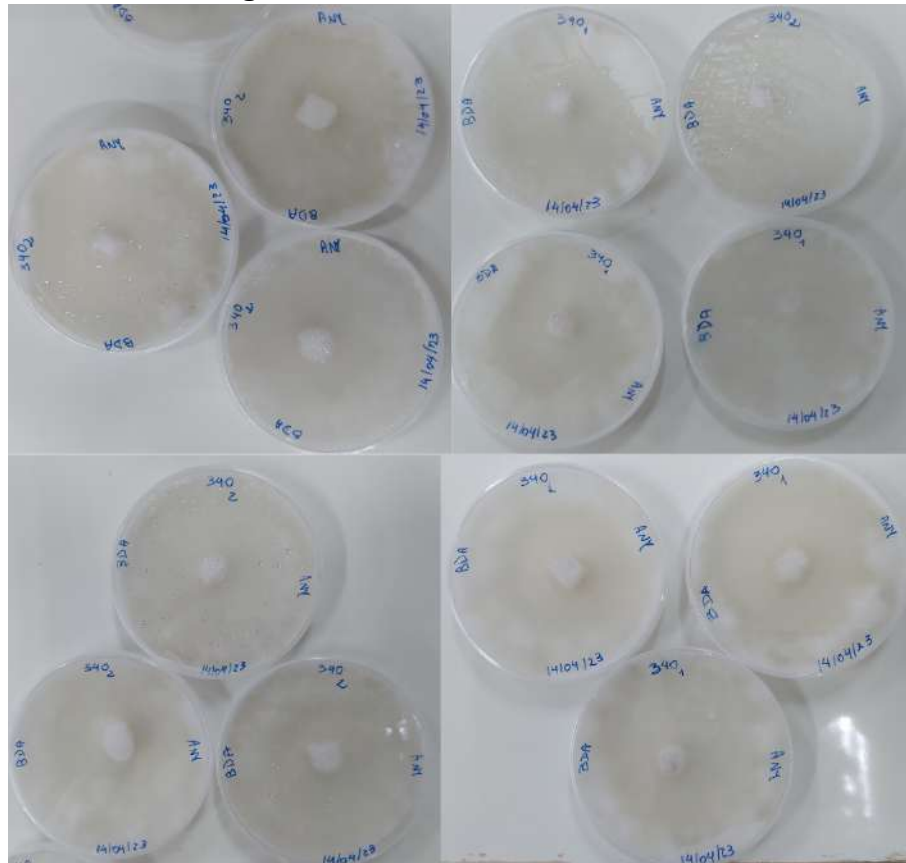
Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE C - Placas de crescimento de *S. sclerotiorum* a 20°C

**Figura-** Crescimento em meio malte enriquecido



**Figura-** Crescimento em meio BDA



Fonte: Autoria própria (2023).

## APÊNDICE D - Resultados dos testes de ANOVA e testes de Tukey

**Tabela-** Resultado teste de ANOVA para crescimento do fungo *S. sclerotiorum* no primeiro teste de cultura dupla. \* Indica diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

	Soma de quadrados	df	Quadrado médio	F	p (valor)
<b>Entre grupos</b>	33,1149	4	8,27872	19,18	0,0001105*
<b>Dentro dos grupos</b>	4,3156	10	0,43156		
<b>Total</b>	37,4305	14	0,00015		

**Tabela-** Resultado teste de Tukey para crescimento do fungo *S. sclerotiorum* no primeiro teste de cultura dupla. \* Indica diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

	Controle positivo	<i>C. rosea</i> CCMIBA_39	<i>P. lilacinum</i> CCMIBA_38	<i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_40	Consórcio microbiano
<b>Controle positivo</b>		0,01231*	0,002278*	0,0004058*	0,00007736*
<b><i>C. rosea</i> CCMIBA_39</b>	5,941		0,7716	0,1699	0,01849*
<b><i>P. lilacinum</i> CCMIBA_38</b>	7,585	1,643		0,6841	0,1111
<b><i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_40</b>	9,457	3,515	1,872		0,614
<b>Consórcio microbiano</b>	11,5	5,563	3,92	2,048	

**Tabela-** Resultado teste de ANOVA para crescimento do fungo *S. sclerotiorum* no segundo teste de cultura dupla. \* Indica diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

	<b>Soma de quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>p (valor)</b>
<b>Entre grupos</b>	4,27987	4	1,06997	6,619	0,007169*
<b>Dentro dos grupos</b>	1,61647	10	0,161647		
<b>Total</b>	5,89633	14	0,00881		

**Tabela-** Resultado teste de Tukey para crescimento do fungo *S. sclerotiorum* no segundo teste de cultura dupla. \* Indica diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

	<b>Controle positivo</b>	<b><i>C. rosea</i> CCMIBA_39</b>	<b><i>P. lilacinum</i> CCMIBA_38</b>	<b><i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_40</b>	<b>Consórcio microbiano</b>
<b>Controle positivo</b>		0,07655	0,3535	0,005427*	0,02505*
<b><i>C. rosea</i> CCMIBA_39</b>	4,265		0,8193	0,4561	0,9468
<b><i>P. lilacinum</i> CCMIBA_38</b>	2,757	1,508		0,106	0,4303
<b><i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_40</b>	6,721	2,456	3,963		0,8428
<b>Consórcio microbiano</b>	5,284	1,02	2,527	1,436	

**Tabela-** Resultado teste de ANOVA para crescimento do fungo *C. rosea* CCMIBA\_39 na presença e ausência de *S. sclerotiorum* ( $p < 0,05$ ).

	<b>Soma de quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>p (valor)</b>
<b>Entre grupos</b>	0,00735	1	0,00735	0,1559	0,7131
<b>Dentro dos grupos</b>	0,188533	4	0,0471333		
<b>Total</b>	0,195883	5	0,9016		

**Tabela-** Resultado teste de ANOVA para crescimento do fungo *P. lilacinum* CCMIBA\_38 na presença e ausência de *S. sclerotiorum* ( $p < 0,05$ ).

	<b>Soma de quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>p (valor)</b>
<b>Entre grupos</b>	0,12615	1	0,12615	1,974	0,2327
<b>Dentro dos grupos</b>	0,2556	4	0,0639		
<b>Total</b>	0,38175	5	0,3013		

**Tabela-** Resultado teste de ANOVA para crescimento do fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_40 na presença e ausência de *S. sclerotiorum*. \* Indica diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

	<b>Soma de quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>p (valor)</b>
<b>Entre grupos</b>	2,76082	1	2,76082	20,98	0,01018*
<b>Dentro dos grupos</b>	0,526467	4	0,131617		
<b>Total</b>	3,28728	5	0,1003		

**Tabela-** Resultado teste de ANOVA para crescimento do consórcio microbiano na presença e ausência de *S. sclerotiorum* ( $p < 0,05$ ).

	<b>Soma de quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>p (valor)</b>
<b>Entre grupos</b>	9,15135	1	9,15135	4,02	0,1155
<b>Dentro dos grupos</b>	9,1064	4	2,2766		
<b>Total</b>	18,2577	5	0,2007		

## APÊNDICE E - Tabelas adicionais

**Tabela-** Crescimento médio de *S. sclerotiorum* no primeiro teste de cultura dupla (incubação por dez dias a 28°C). Variação entre as réplicas no controle e na presença dos diferentes fungos de biocontrole.

Réplicas	Controle positivo	<i>C. rosea</i> CCMIBA_39	<i>P. lilacinum</i> CCMIBA_38	<i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_40	Consórcio microbiano
<b>A</b>	7,79	4,71	5,33	3,84	2,65
<b>B</b>	6,19	4,93	4,11	3,29	3,58
<b>C</b>	7,78	5,36	3,69	3,87	2,44
<b>Média</b>	7,25*	5*	4,38*	3,67*	2,89*

As médias seguidas de \* indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ANOVA ( $p < 0,05$ ).

**Tabela-** Crescimento médio de *S. sclerotiorum* no segundo teste de cultura dupla (incubação por oito dias a 28°C). Variação entre as réplicas no controle e na presença dos diferentes fungos de biocontrole.

Réplicas	Controle positivo	<i>C. rosea</i> CCMIBA_39	<i>P. lilacinum</i> CCMIBA_38	<i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_40	Consórcio microbiano
<b>A</b>	4,53	3,53	3,93	3,37	3,15
<b>B</b>	5,08	4,15	4,81	3,61	3,64
<b>C</b>	4,9	3,86	3,85	2,85	4,04
<b>Média</b>	4,84*	3,85	4,20	3,28*	3,61*

As médias seguidas de \* indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ANOVA ( $p < 0,05$ ).

**Tabela-** Crescimento médio dos fungos de biocontrole no segundo teste de cultura dupla (incubação por oito dias a 28°C). Variação entre as réplicas no controle (C+) e no tratamento com *S. sclerotiorum* (T).

Réplicas	<i>C. rosea</i> CCMIBA_39		<i>P. lilacinum</i> CCMIBA_38		<i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_40		Consórcio microbiano	
	C+	T	C+	T	C+	T	C+	T
<b>A</b>	3,47	3,73	3,43	3,62	3,85	5,04	4,41	3,86
<b>B</b>	4,02	3,71	3,88	3,23	3,58	4,86	8,02	3,8
<b>C</b>	3,66	3,5	3,97	3,56	4,1	5,7	7,73	5,09
<b>Média</b>	3,72	3,65	3,76	3,47	3,84*	5,2*	6,72	4,25
<b>% potencial antagonista</b>		42%		40%		60%		49%

As médias seguidas de \* indicam diferença significativa de acordo com o teste de ANOVA ( $p < 0,05$ ). As médias do tratamento (T), foram utilizadas na equação 1, para determinar o potencial de antagonismo dos fungos de biocontrole.