

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIA REGINA BARBIERI

**BIOLÓGICOS NO CONTROLE DE DOENÇAS, INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO NA CULTURA DA SOJA**

PATO BRANCO

2023

CLAUDIA REGINA BARBIERI

**BIOLÓGICOS NO CONTROLE DE DOENÇAS, INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO NA CULTURA DA SOJA**

**Biologicals in disease control, induction of resistance and promotion of growth
in soybean crop**

Tese apresentada como requisito para obtenção do
título de Doutor em Agronomia – Área de
Concentração: Produção Vegetal da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro
Coorientadora: Profa. Dra. Lilian de Souza Vismara

PATO BRANCO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco



CLAUDIA REGINA BARBIERI

**BIOLÓGICOS NO CONTROLE DE DOENÇAS, INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO NA CULTURA DA SOJA**

Trabalho de pesquisa de doutorado apresentado como
requisito para obtenção do título de Doutor Em Agronomia
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Área de concentração: Produção Vegetal.

Data de aprovação: 29 de Agosto de 2023

Sergio Miguel Mazaro, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Alfredo De Gouvea, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Claudia Manteli, Doutorado - União de Ensino do Sudoeste do Paraná (Unisep)

Dr. Gilmar Franzener, Doutorado - Universidade Federal da Fronteira Sul (Uffs)

Lucas Da Silva Domingues, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 29/08/2023.

Aos meus pais Claudino Luiz Barbieri e Idalina
Barbieri, por serem tão zelosos e amorosos, e,
principalmente, por sempre terem compreendido,
apoiado e respeitado minhas decisões.
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Gratidão primeiramente a Deus, que foi minha fortaleza nos momentos de maiores angústias, desespero e indecisões.

Ao meu orientador, professor e amigo Dr. Sérgio Miguel Mazaro. Minha eterna gratidão por ter me acolhido e enfrentado esse desafio juntamente comigo. Obrigada não só pelos ensinamentos, mas por ser um ser humano ímpar e um grande incentivador de pessoas. A você, todo meu respeito e admiração.

A minha coorientadora, professora Lilian de Souza Vismara, minha profunda gratidão por sua valiosa contribuição na análise dos dados, que apesar de desafiadora foi possível com sua contribuição. Sua orientação e expertise foram fundamentais.

À minha família por ter sido grande incentivadora nesta caminhada, e à parceria e incentivo integral de Yasa Rochelle Santos de Araújo, que não me deixou desistir nos momentos de maior desânimo.

À grande amiga e parceira Fabiana Di Domenico, por todo auxílio e pelas intermináveis conversas, sempre me fazendo enxergar com outros olhos as situações difíceis e sempre me encorajando a seguir em frente.

Aos meus amigos(as) Karine Oligini, Alberto Ricardo Stefani, Douglas A. Alamino, Paula Barbosa, Isadora Bischoff: obrigada por terem feito parte desta conquista, por cada conversa, cada risada, cada choro... Vocês foram fundamentais nesta caminhada. Os levarei para sempre no meu coração.

Às amigas Maira Schuster e Cristina V. Pereira, e aos amigos Joelinton Campani e Roberto Saburo, pela parceria, apoio nos experimentos e nos desafios do laboratório, o meu muito obrigada.

Às amigas Karina Guollo, Thayllane de Campos Siega e Marcieli da Silva, gratidão por sempre compartilharem tanto conhecimento, pelo apoio, incentivo e por serem mulheres tão fantásticas.

À empresa Ballagro Agro Tecnologia por todo o apoio e aporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UTFPR, e aos seus professores, mestres admiráveis, cada qual em sua área de conhecimento, obrigada por partilharem tantos saberes.

A todos os meus filhos “bichológicos”, Adamastor Pitáquio, Amanda Regina (*in memorian*), Antônio Carlos, Fofão, Gabriel Fernando, Joana Beatriç, João

Eustáquio Peposo (*in memorian*), Júlio Flock's, Negão, Pochonio, Sebastião Henrique, Toddy Aranha, Victor Hugo. Obrigada pelo amor incondicional nas madrugadas de estudos e em todos os demais momentos da minha trajetória.

Eu que estou sob a proteção do Altíssimo e moro
assombra do Onipotente direi ao senhor: “Meu
refúgio, minha fortaleza, meu Deus em quem
confio.” Ele me livrará do laço do caçador, da
peste funesta; Ele me cobrirá com suas penas,
sob suas asas encontrarei refúgio. Sua fidelidade
me servirá de escudo e couraça (SALMO 91, 1:4).

RESUMO

A crescente preocupação com a sustentabilidade e a redução do uso de defensivos químicos tem despertado o crescente interesse no uso de agentes de controle biológico (ou biológicos) como alternativa no manejo integrado de doenças. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial do produto comercial Pardella® à base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*, como agente de biocontrole, indução de resistência e promoção de crescimento na cultura da soja. Para isso foram realizados sete experimentos: (1) teste de pareamento direto e de crescimento micelial dos fungos *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Phomopsis*, *Fusarium*; (2) microscopia eletrônica das estruturas dos patógenos versus biológicos; (3) testes de germinação de sementes de soja na presença dos agente de controle biológico; (4) performance fisiológica de plantas de soja na presença de agente de controle biológico; (5) potencial de uso de agentes de controle biológico sobre o oídio na soja; (6) indução de resistência na soja por agentes de controle biológico; e (7) efeito de agentes de controle biológico sobre doenças de final de ciclo (DFCs). Todos os experimentos foram conduzidos nos laboratórios, casa de vegetação e área experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos-PR e Campus Pato Branco-PR, utilizando sementes de soja da cultivar P96Y90RR. Foi utilizado o ambiente de programação estatística R para a análise de dados. Para avaliar o crescimento micelial radial dos fungos patogênicos, adotou-se o Modelo Logístico de Crescimento de Verhulst. Os agentes de controle biológico testados neste estudo apresentaram elevado potencial *in vitro* como inibidores fungos fitopatogênicos, dentre eles, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Phomopsis*, *Fusarium*, causadores de doenças de importância na cultura da soja. Dentre os mecanismos envolvidos no controle estão a competição e micoparasitismo, por meio da inibição mecânica por estrangulamento, enovelamento e afinamento de hifas, e ruptura de septos. A aplicação do produto comercial à base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*, não proporcionou ganhos dos parâmetros de qualidade fisiológica de sementes e na performance fisiológica das plantas soja em condições ambientais naturais. Não se verificou efeito do agente de controle biológico sobre o oídio na soja em experimento em vasos sob condição de casa de vegetação. Os agentes de controle biológico, promoveram indução de resistência, com a ativação da enzima quitinase nos tecidos vegetais. Os agentes de controle biológico presentes no Pardella® apresentaram efeito positivo na redução da severidade de doenças de final de ciclo (DFCs) em condições de campo. No geral, o controle biológico com espécies de *Trichoderma* e *Bacillus amyloliquefaciens* se mostrou eficiente para aplicação visando o controle de patógenos, com uma consequente contribuição para diminuir a dependência de fungicidas químicos.

Palavras-chave: *Glycine max*; *Trichoderma*; *Bacillus amyloliquefaciens*; antagonistas; micoparasitismo.

ABSTRACT

The growing concern about sustainability and the reduction in the use of chemical pesticides has sparked growing interest in the use of biological control agents (or biologicals) as an alternative in the integrated management of diseases. The objective of the present study was to evaluate the potential of the commercial product Pardella® based on *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens*, as a biocontrol agent, resistance induction and growth promotion in soybean crops. For this, seven experiments were carried out: (1) Direct pairing and mycelial growth test of the fungi *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Phomopsis*, *Fusarium*; (2) electron microscopy of pathogen versus biological structures; (3) soybean germination in the presence of a biological control agent; (4) physiological performance of soybeans in the presence of biological control agents; (5) potential use of a biological control agent on powdery mildew in soybeans; (6) induction of resistance in soybeans by biological control agents; (7) effect of biological control agents on end-of-cycle diseases (CLDs). All experiments were conducted in the laboratories, greenhouse and experimental area of the Federal Technological University of Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos-PR and Campus Pato Branco-PR, using soybean seeds from the cultivar P96Y90RR. The R statistical programming environment was used for data analysis. To evaluate the mycelial radial growth of pathogenic fungi, the Verhulst Logistic Growth Model was adopted. The biological control agents tested in this study showed high in vitro potential as inhibitors for some phytopathogenic fungi, including *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Phomopsis*, *Fusarium*, which cause important diseases in soybean cultivation. Among the mechanisms involved in control are competition and mycoparasitism, through mechanical inhibition by strangulation, coiling and thinning of hyphae, and rupture of septa. The application of the commercial product based on *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens* did not provide gains in the physiological quality parameters of seeds and in the physiological performance of soybean plants under natural environmental conditions. There was no effect of the biological control agent on powdery mildew in soybeans in an experiment in pots under greenhouse conditions. Biological control agent, with the activation of the chitinase enzyme in plant tissues. The biological control agents present in Pardella® had a positive effect on reducing the severity of end-of-cycle diseases (CLDs) under field conditions. In general, biological control with species of *Trichoderma* and *Bacillus amyloliquefaciens* proved to be suitable for application aimed at controlling pathogens, with a consequent contribution to reducing dependence on fungicides.

Keywords: *Glycine max*; *Trichoderma*; *Bacillus amyloliquefaciens*; antagonists; mycoparasitism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da disposição do antagonista e patógeno em placa de Petri no teste de pareamento direto	40
Fotografia 1 - Preparação das sementes em papel Germitest®	43
Fotografia 2 - Avaliação da percentagem de germinação	44
Fotografia 3 - Avaliação do comprimento de plântula	45
Fotografia 4 - Experimento de promoção de crescimento de plantas de soja em tubos de PVC	47
Fotografia 5 - Experimento para avaliação de controle de oídio em vasos	49
Fotografia 6 - Avaliação da severidade do oídio	49
Figura 2 - Escala diagramática para severidade do oídio da soja	50
Fotografia 7 - Plantas inoculadas para avaliação bioquímica	51
Fotografia 8 - Amostras para testes bioquímicos	52
Fotografia 9 - Amostras para determinação das proteínas totais	53
Figura 3 - Escala diagramática para severidade de DFCs da soja	57
Gráfico 1 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de <i>Sclerotinia</i> : (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano	60
Fotografia 10 - Pareamentos em placas de Petri® entre <i>Trichoderma harzianum</i> x <i>S. sclerotiorum</i> (A), <i>Trichoderma asperellum</i> x <i>S. sclerotiorum</i> (B), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> x <i>S. sclerotiorum</i> (C), <i>Pardella</i> ® x <i>S. sclerotiorum</i> (D)	61
Gráfico 2 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de <i>Rhizoctonia</i> : (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano	63
Fotografia 11 - Pareamentos em placas de Petri® entre <i>Trichoderma harzianum</i> x <i>R. solani</i> (A), <i>Trichoderma asperellum</i> x <i>R. solani</i> (B), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> x <i>R. solani</i> (C), <i>Pardella</i> ® x <i>R. solani</i> (D)	64
Gráfico 3 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de <i>Macrophomina</i> : (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano	66
Fotografia 12 - Pareamentos em placas de Petri® entre <i>Trichoderma harzianum</i> x <i>M. phaseolina</i> (A), <i>Trichoderma asperellum</i> x <i>M. phaseolina</i> (B), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> x <i>M. phaseolina</i> (C), <i>Pardella</i> ® x <i>M. phaseolina</i> (D)	67
Gráfico 4 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de <i>Phomopsis</i> : (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano	69
Fotografia 13 - Pareamentos em placas de Petri® entre <i>Trichoderma harzianum</i> x <i>P. longicolla</i> (A), <i>Trichoderma asperellum</i> x <i>P. longicolla</i> (B), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> x <i>P. longicolla</i> (C), <i>Pardella</i> ® x <i>P. longicolla</i> (D)	70
Gráfico 5 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de <i>Fusarium</i> : (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano	72
Fotografia 14 - Pareamentos em placas de Petri® entre <i>Trichoderma harzianum</i> x <i>F. tucumaniae</i> (A), <i>Trichoderma asperellum</i> x <i>F. tucumaniae</i> (B), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> x <i>F. tucumaniae</i> (C), <i>Pardella</i> ® x <i>F. tucumaniae</i> (D)	73
Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre <i>Fusarium tucumaniae</i>	75

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica de <i>Trichoderma asperellum</i> sobre <i>Rhizoctonia solani</i>	76
Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica do produto comercial Pardella® sobre <i>Rhizoctonia solani</i>	77
Gráfico 6 - Box-plot dos níveis de vigor (A) alto, (B) médio e (C) baixo de sementes de soja tratadas com agente de controle biológico considerando a frequência absoluta (número de plântulas) para os tratamentos: (1) testemunha/controle e (2) agente de controle biológico	80
Gráfico 7 - Box-plot dos níveis de vigor (A) alto, (B) médio e (C) baixo de sementes de soja tratadas com agente de controle biológico considerando a frequência relativa (%) para os tratamentos: (1) testemunha/controle e (2) agente de controle biológico	81
Gráfico 8 - Box-plot das variáveis respostas: (A) comprimento da parte aérea (cm); (B) comprimento da raiz (cm); (C) massa fresca da parte aérea (cm); (D) massa fresca da raiz (g); (E) volume da raiz (mL); (F) massa seca da parte aérea (g); e (G) massa seca da raiz (g) para os tratamentos: (1) testemunha/controle e (2) agente de controle biológico	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de <i>Sclerotinia</i> para os tratamentos	59
Tabela 2 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de <i>Rhizoctonia</i> para os tratamentos	62
Tabela 3 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de <i>Macrophomina</i> para os tratamentos	65
Tabela 4 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de <i>Phomopsis</i> para os tratamentos	68
Tabela 5 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de <i>Fusarium</i> para os tratamentos.....	71
Tabela 6 - Graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM), coeficiente de variação (CV%) e médias da análise da variância do delineamento inteiramente casualizado, para os parâmetros de qualidade fisiológica de sementes de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico	78
Tabela 7 - Médias da variável massa seca (MS, g) de sementes de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico	78
Tabela 8 - Resultado do Teste de Kruskal-Wallis para os níveis de vigor (alto, médio e baixo) considerando a frequência absoluta (número de plântulas) e relativa (%), de sementes de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico	79
Tabela 9 - Resultado do Teste de Kruskal-Wallis para comprimento da parte aérea (CPA, m), comprimento da raiz (CR, m), massa fresca da parte aérea (MFPA, g), massa fresca da raiz (MFR, g), volume da raiz (VR, mL), massa seca da parte aérea (MSPA, g), e massa seca da raiz (MSR, g) de plantas de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico	82
Tabela 10 - Graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM) e coeficiente de variação (CV%) da análise da variância do experimento em parcelas subdivididas no tempo em blocos casualizados, para o número total de folhas por planta (NTFP), número total de folhas com oídio (NTFO), percentual de folhas com oídio (NTFO%), e número total de manchas de oídio (NTMO) em plantas de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico	85
Tabela 11 - Médias do número total de folhas por planta (NTFP); número total de folhas com oídio (NTFO); percentual de folhas com oídio (NTFO%); e número total de manchas de oídio (NTMO) em função do tempo (da avaliação) em plantas de soja tratadas com tratadas com agente de controle biológico em comparação com a testemunha	86
Tabela 12 - Graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM) e coeficiente de variação (CV%) da análise de variância do experimento em parcelas subdivididas no tempo em DIC, de plantas de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico e indutor de resistência, para compostos fenólicos (FEN, mg·100g ⁻¹), proteínas totais (PTNA, mg·g ⁻¹), fenilalanina amônia-liase (FAL, UA·mg ⁻¹), β-1,3-glucanase (GLU, UA·mg ⁻¹) e quitinase (QUI, UA·mg ⁻¹) ..	87

Tabela 13 - Atividade enzimática média da quitinase (QUI, UA·mg ⁻¹) em plantas de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico e indutor de resistência.....	88
Tabela 14 - Atividade média dos compostos fenólicos (FEN, mg·100g ⁻¹), proteínas totais (PTNA, mg·g ⁻¹), fenilalanina amônia-liase (FAL, UA·mg ⁻¹) e quitinase (QUI, UA·mg ⁻¹) em função do tempo de coleta (0 h, 48 h e 96 h) do material vegetal de soja testemunha e tratados com agente de controle biológico e indutor de resistência	89
Tabela 15 - Atividade enzimática média da fenilalanina amônia-liase (FAL, UA·mg ⁻¹) e da β-1,3-glucanase (GLU, UA·mg ⁻¹) em função do tratamento (agente de controle biológico, indutor de resistência e testemunha) e tempo de coleta (0 h, 48 h e 96 h) do material vegetal	90
Tabela 16 - Graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM) e coeficiente de variação (CV%) da análise de variância para o experimento bifatorial em DIC, com os fatores tempo (do ano de avaliação) e tratamento (testemunha e agente de controle biológico), para a 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a avaliação da severidade e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) na avaliação de severidade de DFCs (%)......	91
Tabela 17 - Médias da 3 ^o avaliação de severidade (%) e AACPD em função do tempo (ano) na avaliação de severidade de DFCs (%)......	91
Tabela 18 - Médias da 2 ^a e 3 ^a avaliação de severidade (%) e AACPD em função dos tratamentos (testemunha e agente de controle biológico) na avaliação de severidade de DFCs (%)......	92
Tabela 19 - Teste de médias para a 1 ^a e 2 ^a avaliação de severidade em função do tempo (ano) e do tratamento (testemunha e agente de controle biológico) na avaliação de severidade de DFCs (%)	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACPD	Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença
AIA	Ácido indol acético
ANAVA	Análise de Variância
ASB	Albumina de soro bovino
BDA	Batata Dextrose Ágar
CFGa	contagem final de germinação de plântulas anormais
CFGN	contagem final de germinação de plântulas normais
CIG	Contagem inicial de germinação
Cm	Centímetro
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
CPA	Comprimento de parte aérea
CR	Comprimento de raiz
DFC	Doenças de Final de Ciclo
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DBC	Delineamento em blocos casualizado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAL	Fenilalanina amônia-liase
HCl	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISR	Resistência sistêmica induzida
M	Molar
MCA	Metanol, clorofórmio e água
MS	Massa seca
NM	Nanômetro
PG	Porcentagem de germinação
pH	Potencial hidrogeniônico
PSD	Podridão das sementes de <i>Phomopsis</i>
PVP	polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RAS	Regras de Análises de Sementes
RPGPR	Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas
RPM	Rotações por minuto
RR	Resistente ao glifosato
SDS	Síndrome da morte súbita
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Radiação ultravioleta
v/v	Volume/Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau celsius
g	Grama
h	Hora
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
%	Porcentagem
®	Marca registrada
µL	Microlitro
Ø	Diâmetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	Controle biológico.....	20
2.1.1	Trichoderma	21
2.1.2	Trichoderma harzianum.....	22
2.1.3	Trichoderma asperellum.....	23
2.1.4	Bacillus amyloliquefaciens.....	24
2.2	Fungos de solo na cultura da soja.....	25
2.2.1	Rhizoctonia solani	26
2.2.2	Fusarium	27
2.2.3	Macrophomina phaseolina	27
2.2.4	Sclerotinia sclerotiorum	28
2.2.5	Phomopsis longicolla.....	29
2.3	Indução de resistência – Metabolismo secundário	29
2.3.1	Promotores de crescimento por biológicos.....	31
2.4	Controle biológico de doenças foliares de soja	33
2.5	Doenças da soja	34
2.5.1	Ferrugem da soja	34
2.5.2	Míldio.....	35
2.5.3	Oídio.....	36
2.5.4	Antracnose	36
2.5.5	Cercospora.....	37
2.5.6	Septoria	37
2.5.7	Mancha-alvo.....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Teste de pareamento direto, crescimento micelial e aplicação do Modelo de Crescimento Logístico [Verhulst].....	39
3.1.1	Análise estatística.....	41
3.2	Análise através de microscopia eletrônica das estruturas dos patógenos versus biológicos	42

3.3	Teste de germinação de sementes de soja na presença de agente de controle biológico	42
3.3.1	Caracterização dos lotes de sementes.....	42
3.3.2	Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com produto biológico	42
<u>3.3.2.1</u>	<u>Porcentagem de Germinação.....</u>	<u>43</u>
<u>3.3.2.2</u>	<u>Comprimento de plântula</u>	<u>44</u>
<u>3.3.2.3</u>	<u>Massa seca</u>	<u>45</u>
3.3.3	Análise estatística.....	46
3.4	Performance fisiológica de plantas de soja na presença de agente de controle biológico	46
3.4.1	Análise estatística.....	47
3.5	Estudo do potencial de uso de agente de controle biológico sobre o oídio na soja.....	48
3.5.1	Análise estatística.....	48
3.6	Estudo do potencial de indução de resistência na soja por agente de controle biológico	50
3.6.1	Análise estatística.....	51
3.6.2	Extratos proteicos.....	52
3.6.3	Proteínas totais.....	52
3.6.4	Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL)	53
3.6.5	Quantificação de compostos fenólicos totais.....	54
3.6.6	Atividade de quitinases e β -1,3-glucanases	54
3.7	Potencial uso de agentes de controle biológico no controle de doenças de final de ciclo (DFCs)	55
3.7.1	Análise estatística.....	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Teste de pareamento direto, crescimento micelial e aplicação do Modelo de Crescimento Logístico [Verhulst].....	58
4.2	Análise de microscopia eletrônica das estruturas dos patógenos versus biológicos	74
4.3	Germinação da soja na presença de agente de controle biológico.	78
4.4	Performance fisiológica de plantas de soja na presença de agente de controle biológico	82

4.5	Estudo do potencial de uso de agente de controle biológico sobre o oídio na soja.....	85
4.6	Estudo do potencial de indução de resistência na soja por agente de controle biológico	87
4.7	Potencial uso de agentes de controle biológico sobre doenças de final de ciclo (DFCs)	91
5	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) está entre as culturas de maior importância para o setor agrícola mundial. O Brasil é o maior produtor mundial do grão. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra agrícola 2022/2023 corresponde a 155.736,50 milhões de toneladas, sendo o Estado do Paraná, o segundo maior produtor nacional, apresentando uma produção média de 22.384,9 milhões de toneladas na safra 2022/2023 (CONAB, 2023). Porém, além da alta produtividade precisa apresentar qualidade para que o Brasil continue a ser um país produtor competitivo, para isso as pesquisas e as novas tecnologias tornam-se importantes para o setor.

Vários são os fatores que podem ocasionar as perdas de produtividades nas lavouras, e em geral, essas perdas estão relacionadas com a ocorrência de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, podendo ocasionar a perda total da cultura (MOTOYAMA *et al.*, 2003). Nesse contexto, a sanidade das lavouras tem sido objeto de muitos estudos, e paralelamente ao aumento das áreas cultivadas de soja no mundo, há o surgimento de novos patógenos e o aumento da severidade das doenças. Existe relato de mais de 100 espécies de patógenos, sendo que 35 apresentam grande importância econômica para a cultura da soja (SINCLAR; HARTMAN, 2008).

Parte dos defensivos químicos aplicados nos cultivos agrícolas, além de permanecerem no ambiente, podem se acumular no organismo humano. Assim, o uso indiscriminado de agrotóxicos se tornou um problema mundial, ocasionando a contaminação dos alimentos, água e de lençóis freáticos, solos, animais, intoxicação de agricultores e, conseqüentemente, causando o desequilíbrio biológico eliminando organismos benéficos e reduzindo a biodiversidade (BOHNER *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2018).

Diante disso, a opção por produtos alternativos que não causem danos ambientais e nem coloque em risco a saúde do homem torna-se cada vez mais necessário, assim como, estudos referentes às novas tecnologias de menor impacto para o meio ambiente e para o homem precisam ser ampliadas e levadas para as grandes culturas (PEREIRA *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o controle biológico de fitopatógenos se apresenta como uma alternativa cada vez mais difundida, utilizando antagonismo microbiano como uma

forma de defesa às culturas, ocasionando uma menor predisposição à resistência dos microrganismos alvo (BENITZ, 2010), sendo uma promissora opção no controle de patógenos de plantas.

Fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus* vem demonstrando eficiência como agentes biológicos de controle de fitopatógenos, seja por ação direta como antibiose, competição ou micoparasitismo, ou até mesmo ativando indução de resistência nas plantas aos patógenos. Ainda podem ter ação na promoção de crescimento e solubilização de nutrientes.

A partir do exposto, produtos que associem os agentes *Trichodermas* e *Bacillus* são existentes no Brasil e necessitam de estudos que permitam entender o potencial sobre doenças da cultura da soja, bem como capacidade de indução de resistência e promoção de crescimento.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial do produto comercial Pardella® à base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*, como agente de biocontrole, indução de resistência e promoção de crescimento na cultura da soja.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Controle biológico

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das *commodities* agrícolas que mais vem crescendo no Brasil, fazendo do país maior produtor e exportador mundial de soja em grão (XIMENES; COELHO, 2023). Logo, seu cultivo visa aumentar cada vez mais a sua produtividade. E nesse cenário, os pacotes tecnológicos são demasiadamente empregados, contudo, o uso intensivo de defensivos e fertilizantes, não apenas danificam os agroecossistemas, como aumentam a poluição ambiental, podendo deixar resíduos nos alimentos e no solo, prejudicando sua microbiota (GARCIA *et al.*, 2015).

O uso indiscriminado de insumos agrícolas e defensivos podem levar a um aumento desproporcional nos microrganismos e seleção de alguns fitopatógenos, que podem se tornar resistentes à algumas moléculas utilizadas, de modo que, a produção e a qualidade dos grãos podem ser diretamente afetadas por diversas doenças, principalmente àquelas causadas por fungos. Assim, técnicas menos agressivas ao meio ambiente e a sociedade como um todo, se mostram ferramentas importantes para a agricultura, como é o caso de estudos realizados com fungos e bactérias benéficas, que podem atuar como agentes promotores de crescimento e por vezes, colaborar na defesa das plantas contra fitopatógenos, sob condições estressantes (GARCIA *et al.*, 2015).

Nesse sentido, dentre as alternativas para redução do uso de agroquímicos, encontra-se o controle biológico, estratégia de manejo de pragas e doenças que utiliza organismos vivos visando reduzir a população de microrganismos patogênicos, bem como, das possíveis doenças que estes podem causar às plantas. Para isto, pode-se utilizar o controle biológico já existente na microbiota do solo, ou optar pela introdução de microrganismos antagônicos ou não, que promovam o processo de resistência nas plantas (PACHECO, 2012).

Dentre as vantagens do controle biológico em relação aos fungicidas convencionais, está a capacidade dos microrganismos em se reproduzirem e se estabelecerem no ecossistema à que foram introduzidos, colonizando assim aquela área, enquanto os fungicidas químicos necessitam de várias aplicações durante o desenvolvimento da cultura (ÁVILA *et al.*, 2005).

As formas de ação dos antagonistas no controle biológico, sobre os

fitopatógenos pode ser exercida de diferentes maneiras, dentre elas: a competição, onde os microrganismos antagonísticos competem por água, nutrientes e espaço com os fitopatógenos, limitando assim as condições para estes sobreviverem; o parasitismo, refere-se à ação direta do microrganismo em parasitar os patógenos, alimentando-se destes; na predação, os microrganismos matam e se alimentam dos patógenos, como por exemplo, o que ocorre em nematoides predados por fungos; a antibiose, processo que diminui a taxa de desenvolvimento do patógeno, através de compostos produzidos e liberados capazes de impedir o crescimento e desenvolvimento dos patógenos; já o processo de ativação das rotas metabólicas pode aumentar a resistência das plantas, sendo chamado de indução de resistência (MATTEI *et al.*, 2017; MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

No entanto, para que esses processos antagonistas ocorram de forma eficaz, se faz necessário o conhecimento sobre os mecanismos de ação e sobrevivência de cada microrganismo em questão (PACHECO, 2012; RUFINO *et al.*, 2018). Dentre os antagonistas de fitopatógenos mais pesquisados, estão os fungos do gênero *Trichoderma* e as bactérias do gênero *Bacillus*, ambos tem demonstrado resultados satisfatórios na redução de doenças em plantas e também como promotores de crescimento, podendo ser usados individualmente ou em conjunto com outras ações fitossanitárias (GABARDO *et al.*, 2020).

2.1.1 *Trichoderma*

Fungos do gênero *Trichoderma*, são fungos de solo facilmente encontrados e utilizados em controle biológico de fitopatógenos foliares e radiculares (CORABI-ADELL, 2004). São fungos imperfeitos que pertencem a classe Sordariomycetes, filo Ascomycota, ordem Hypocreales, família Hypocreaceae e gêneros *Hypocrea* na fase sexual e *Trichoderma* em fase assexuada (MYCOBANK, 2018).

Os fungos desse gênero possuem vida livre e permitem ação antagonista sobre grande variedade de outros fungos, podendo inibir ou degradar enzimas essenciais para a ação dos fitopatógenos, podendo gerar indução de resistência sistêmica e/ou localizada em plantas (HARMAN *et al.*, 2004).

Além da indução de resistência espécies desse gênero podem atuar na solubilização de micronutrientes insolúveis no solo, facilitando o processo de absorção e translocação de minerais pouco disponíveis no solo (RESENDE *et al.*, 2004). Além disso, algumas espécies apresentam resistência à herbicidas e fungicidas, ampliando

seu uso contra fitopatógenos foliares e patógenos de solo e produzirem substâncias antifúngicas, antibióticas e biorremediadoras (LOUZADA *et al.*, 2009).

Além de serem indutores de resistência em plantas, algumas espécies do gênero *Trichoderma* atuam no biocontrole de fitopatógenos de solo, podendo atuar de forma direta ou indireta e possuir capacidade de produção de compostos orgânicos voláteis, chamados de COVs, inibindo o crescimento micelial dos patógenos (SILVA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2016).

Portanto, o gênero *Trichoderma* apresenta fungos com alta capacidade de controle biológico através do antagonismo em fungos de solo e radiculares, apresentam rápido crescimento que acompanha o sistema radicular das plantas, proporcionando uma rápida e eficiente ação de controle nos patógenos (HOWELL, 2003).

2.1.2 *Trichoderma harzianum*

O fungo *Trichoderma harzianum* é encontrado tanto em solos temperados como em solos tropicais, atua como biofungicida através de processos como antibiose, competição e parasitismo. Dessa forma, é utilizado como antagonista no controle de fitopatógenos de solo *Fusarium* spp., *Phythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, entre outros (MARIANO *et al.*, 2005; ESPOSITO; SILVA, 1998).

Por controlar os fitopatógenos de solo, através de seu antagonismo *T. harzianum* tem apresentado resultados satisfatórios, reduzindo ou eliminando completamente o uso de fungicidas nas lavouras (HARMAN, 2000). Souza; Blum (2013), conduziram estudos comparando a eficácia de biofungicidas *T. harzianum* comerciais e fungicidas convencionais para controlar a podridão causada por *Sclerotium rolfsii* na cultura do alho (*Allium sativum*) e obtiveram resultados que mostraram que o tratamento contendo apenas *T. harzianum* apresentou redução de 93,6% na taxa de germinação de escleródios do isolado UB686 e redução de 51,6% do isolado UB193, demonstrando assim sua alta eficiência fungicida.

Zangh *et al.* (2016), em sua pesquisa para avaliar o potencial biológico de controle do *T. harzianum* isolado *T-aloe* em relação a *Sclerotinia sclerotiorum*, em lavouras de soja, observaram que o crescimento de ambas as espécies de microrganismos foi dificultado pela ação uma da outra, nos três dias iniciais de incubação. Já após sete dias de incubação, o controle exercido por *T-aloe* sobre *S.*

sclerotiorum foi de 56,3%, ocorrendo a supressão do fitopatógeno por *T.-aloe*. Os autores confirmaram ainda, que os micélios de *S. sclerotiorum* foram inibidos pelo isolado, além de observarem que um dos mecanismos de ação de *T.-aloe* é o parasitismo de hifas do fitopatógeno que causa mofo branco na cultura da soja.

2.1.3 *Trichoderma asperellum*

T. asperellum se destaca como uma espécie com ampla gama de utilização de substratos, alta produção de compostos antimicrobianos (CHUTRAKUL *et al.*, 2008) e capacidade de oportunismo ambiental (DING *et al.*, 2012). Essa espécie tem sido usada principalmente como agente de controle biológico contra uma ampla gama de organismos causadores de doenças de plantas, incluindo *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora megakarya*, outros fungos patogênicos e nematóides (SANTOS-VILLALOBOS *et al.* 2013; SHARON *et al.* 2007; SLUSARSKI; PIETR, 2009; TONDJE *et al.* 2007).

Em pesquisa avaliando a atividade antagônica de *T. asperellum* e *T. harzianum* *in vitro*, Kuzmanovska *et al.* (2018), observaram que ambos os fungos foram antagonistas em 18 isolados do patógeno *Botrytis cinerea*, responsável por causar mofo cinzento em frutas e hortaliças. *T. asperellum* apresentou inibição satisfatória do crescimento micelial de 74,3 a 96,9 % e *T. harzianum* inibiu de 71,1 a 95,9%. *T. asperellum* demonstrou maior controle antagonista para a maioria dos isolados estudados pelos autores. Os mesmos autores, ao analisarem as imagens das diferentes interações que ocorrem entre os antagonistas e patógenos, verificaram que o antagonista cresce paralelamente ao longo das hifas do patógeno. O crescimento dos fungos antagonistas e patógenos foi simultâneo, mas *T. asperellum* e *T. Harzianum* envolveram e degradaram as hifas dos patógenos.

Resultados semelhantes também foram observados por Widmer (2014), em seu estudo sobre a triagem de espécies de *Trichoderma* para atividade de controle biológico contra *Phytophthora ramorum* no solo, utilizando *T. asperellum* sobre o patógeno *P. ramorum*, o que demonstrou parasitismo e degradação das estruturas de sobrevivência e de reprodução do fitopatógeno pelo agente de biocontrole *T. asperellum*.

El_Komy *et al.* (2015), realizaram a caracterização de novos isolados de *Trichoderma asperellum* para selecionar agentes de biocontrole eficazes contra a murcha de *Fusarium* do tomateiro e observaram que os patógenos *Fusarium*

oxysporum f. sp. *lycopercisi* apresentaram danos morfológicos e degradação dos micélios nas áreas de contato com os isolados de *T. asperellum*.

As pesquisas de Widmer (2014), El_Komy *et al.* (2015) e Kuzmanovska *et al.* (2018), corroboram com o potencial dos fungos do gênero *Trichoderma*, que possuem alta capacidade de mico parasitismo, o que demonstra a importância dessa pesquisa.

2.1.4 *Bacillus amyloliquefaciens*

O gênero *Bacillus* detém bactérias frequentemente distribuídas ao redor do sistema radicular das plantas, e possuem ação antibacteriana. Apresentam diversas características de sobrevivência, sendo amplamente resistentes à diversos tratamentos, por vezes, fatais para determinadas espécies, como: exposição à radiação UV, tratamentos químicos e físicos, altas temperaturas e solventes orgânicos, e demonstram rápido crescimento em meio líquido (CALVO *et al.*, 2017).

Além dessas características supracitadas, as bactérias do gênero *Bacillus*, também auxiliam como promotoras de crescimento em plantas, contêm compostos com ação antibacteriana contra fitopatógenos, dentre outras substâncias, como solubilizantes minerais e alguns fitormônios (LEÓN *et al.*, 2009).

O *Bacillus amyloliquefaciens* é capaz de sintetizar substâncias que possuem propriedades antibacterianas, nematicidas e antibacterianas, como alguns lipopeptídeos (surfactina e iturina), policetídeos (bacteromicina, diffocina e macrolactina), e secretar antibióticos (fitoconazol e lotidina), todos antifúngicos e antibacterianos. Além da produção de diversos metabólitos secundários que atuam como antibióticos, impedindo que outras bactérias competidoras se desenvolvam na rizosfera das plantas (CALVO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2009).

As espécies *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*, possuem alta semelhança entre si, dificultando sua diferenciação com base em caracteres fenotípicos tradicionais, e até mesmo em nível de DNA, pois apresentam regiões complexas relacionadas ao elevado grau de conservação do gene (FAN *et al.*, 2017). Entretanto, *B. amyloliquefaciens* pode ser diferenciado de *B. subtilis*, dentre outras formas, pela alta porcentagem de bases nitrogenadas (guanina e citosina), além de produzirem mais α -amilase que *B. subtilis*, tornando essa espécie utilizada em larga escala no controle biológico em grandes culturas (BENITZ, 2010).

Chen *et al.* (2009), analisaram o potencial para o biocontrole de patógenos de plantas, sequenciando o genoma da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* cepa FZB42

e identificaram ampla capacidade de produção de metabólitos secundários supressores de fungos e bactérias. Chowdhury *et al.* (2015), estudaram o mecanismo de biocontrole de *B. amyloliquefaciens* FZB42, relataram que com exceção da surfactina, outras substâncias encontradas na rizosfera das plantas são relativamente baixas, tornando incerta sua ação direta na supressão de fitopatógenos. Sendo então, o estímulo da resistência sistêmica induzida (ISR) através dos metabólitos bacterianos, o provável agente responsável pela ação de biocontrole do FZB42 (CHOWDHURY *et al.*, 2015).

Gu *et al.* (2017), em seu estudo sobre a interação antagônica da lipopeptídeo bacilomicina D, produzida por FZB42 de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre o fungo fitopatogênico *Fusarium graminearum*, observaram alto grau de antagonismo sobre o fitopatógeno. E afirmam que a lipopeptídeo bacilomicina D é capaz de promover alterações na membrana plasmática e na parede celular, acarretando em morte celular do fungo *F. graminearum*.

Torres *et al.* (2017), em trabalho similar avaliaram atividade biológica do *Bacillus amyloliquefaciens* produtor de lipopeptídeos PGPBacCA1 sobre os patógenos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), os autores encontraram resultados positivos para antagonismo através da produção de surfactina, iturina e fengicina, essas substâncias causaram danos nos clamidósporos e escleródios de *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* e inibiram acima de 50% do crescimento dos patógenos: *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani* e *Penicillium* spp., o que demonstra o potencial de controle de PGPBacCA1, comprovando a importância das espécies do gênero *Bacillus* para o controle biológico.

2.2 Fungos de solo na cultura da soja

As doenças oriundas de fungos habitantes de solo impactam quase todas as culturas. Porém, as que se estabelecem na fase inicial de desenvolvimento das plântulas são as que causam maiores perdas a nível mundial (GOLL *et al.*, 2013; ZEUN *et al.*, 2013).

Uma das recomendações na tentativa de diminuir a incidência de doenças na cultura da soja, é a rotação de culturas, com objetivo de reduzir os números de inóculos que sobrevivem em restos culturais, porém, esta não é uma prática efetiva para fungos de solo pois estes apresentam escleródios, clamidósporos e oósporos que são conhecidos como estruturas de resistência que permitem que o fungo

sobreviva no solo por longos períodos, até que encontrem condições favoráveis para infectarem as plantas (AMORIM, 1995; DEBIASI *et al.*, 2015).

São inseridas nesse grupo os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora sojae* e *Macrophomina phaseolina*. Pode ainda ser incluído o gênero *Phomopsis* spp., que apesar de serem fungos relacionados aos órgãos aéreos das plantas, em estudos realizados por Reis *et al.* (2014), eles foram descritos como patógenos causadores de debilidade em plantas no final do ciclo, porém, associados a *M. phaseolina* causaram podridões radicais.

2.2.1 *Rhizoctonia solani*

O fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, parasita facultativo, é tido como um dos mais importantes devido à sua frequência nos diferentes tipos de solo e clima, causando diferentes sintomas nas plantas como podridões, mela, cancrios e, ainda, tombamentos de pré e pós-emergência em inúmeras culturas de importância econômica como a soja (HILLOCKS, 1992; AGRIOS, 2004).

O sintoma de *damping off* de pré-emergência é o impedimento da germinação das sementes devido ao escurecimento e a perda de rigidez dos tecidos moles, levando à redução da população de plantas. Por sua vez, o sintoma de *damping off* de pós-emergência apresenta o tombamento de plântulas, iniciando com manchas encharcadas no caulículo que tendem a crescer e escurecer rapidamente, progredindo para lesões deprimidas as quais provocam o fendilhamento do caule e posterior tombamento. Estes sintomas são agravados em situações de alta umidade (BEDENDO, 2011; BEDENDO, 1995).

Dentre as condições que favorecem o desenvolvimento da doença, a alta umidade do solo e temperaturas entre 15-18 °C são as mais significativas, por beneficiarem o desenvolvimento do patógeno (BEDENDO, 2011).

Uma das formas de sobrevivência do fungo *R. solani* se dá por meio de microescleródios que são as estruturas de resistência e micélios os quais exercem atividade saprofítica no solo e colonizam restos culturais e plantas hospedeiras, podendo ser disseminados por sementes contaminadas, consideradas como inóculo primário, assim como a irrigação, máquinas agrícolas, chuvas, ventos e ainda solos e restos de culturas contaminadas.

2.2.2 *Fusarium*

Patógenos do gênero *Fusarium* spp. provocam a destruição das raízes. A doença, conhecida como podridão vermelha da soja ou síndrome da morte súbita (SDS), causa grandes prejuízos para os produtores de soja. A SDS foi observada pela primeira vez na década de 70 apenas no estado do Arkansas. Nas décadas seguintes, a doença já havia se propagado nas demais regiões dos Estados Unidos (HARTMAN *et al.*, 2015).

Dentre as espécies de *Fusarium* difundidas geograficamente entre as Américas, estão: *F. virguliforme* nos Estados Unidos e Argentina, *F. brasiliense* no Brasil e Estados Unidos, *F. cuneirostrum* de ocorrência no Canadá, Japão, Estados Unidos e Brasil, *F. tucumaniae* no Brasil e na Argentina e *F. phaseoli* nos Estados Unidos. As espécies *F. virguliforme*, *F. brasiliense*, *F. tucumaniae* são conhecidas por causarem infecção na cultura da soja; o *F. phaseoli* é patogênico para a cultura do feijão; enquanto alguns isolados de *F. virguliforme* demonstram serem patogênicos para soja e feijão (AOKI *et al.*, 2005).

Os sintomas têm seu início na raiz, que apresenta mancha avermelhada, mais especificamente na raiz principal, podendo ser melhor observada próxima ao nível do solo. A mancha tende a se expandir, envolvendo a raiz e formando um anel vermelho arroxeado até a cor negra. Ocorre ainda, a degradação das raízes secundárias e as folhas apresentam amarelecimento e necrose entre as nervuras, o que pode levar a desfolha prematura (ALMEIDA *et al.*, 1997).

A doença é favorecida pelo excesso de umidade no solo durante os estádios vegetativos da soja. Temperaturas amenas antes do florescimento e enchimento de grãos também favorecem o avanço da doença (DORRANCE; LIPPS, 1998).

Scandiani *et al.* (2015), avaliaram os metabólitos produzidos pelas raízes da soja quando infectadas por *F. tucumaniae* e verificaram que nas plantas suscetíveis ocorreu o acúmulo do aminoácido aspartato que age como um agente regulador da relação carbono nitrogênio. Também foi verificado o acúmulo de glutamato, que juntamente com prolina e alanina, são indicadores de estresse biótico. *Fusarium brasiliense* se difere de *F. tucumaneae* por possuírem conídios mais curtos e largos.

2.2.3 *Macrophomina phaseolina*

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid é o patógeno causador da

doença conhecida como podridão do carvão, podendo acometer diversas culturas como milho, sorgo, algodão, soja e daninhas, afetando raízes e caule. Embora ele seja um fungo habitante do solo e sobreviva por meio das estruturas de resistências os microescleródios que permitem que ele sobreviva de 2 a 15 anos no solo atuando como fonte primária do inóculo, ele também pode ser transmitido via semente (ALMEIDA *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2012).

É considerado um patógeno de ampla distribuição geográfica se adaptando bem nas regiões de climas tropicais e subtropicais, causando grandes perdas em regiões mais suscetíveis à seca. *M. phaseolina* é considerado um fungo monotípico sendo composto somente pela espécie “*phaseolina*” (KAUR *et al.*, 2012).

A infecção pode ocorrer em qualquer estágio da planta, sendo mais comum na pós-floração. Temperaturas elevadas e solo seco favorecem o desenvolvimento do patógeno. A sintomologia apresenta lesões marrom-avermelhadas e superficiais no colo da planta, as radículas apresentam tecidos escuros. Em períodos de seca, as folhas tornam-se cloróticas, secam e ficam com coloração marrom. As raízes possuem cor cinza, apresentando microescleródios nos tecidos abaixo da epiderme e nos tecidos do caule. Assim, com o sistema radicular e epidérmico comprometidos pelos macroescleródios, as plantas morrem prematuramente (GUPTA *et al.*, 2012; HENNING *et al.*, 2014).

2.2.4 *Sclerotinia sclerotiorum*

A *Sclerotinia sclerotiorum* é um patógeno necrotrófico causador da doença do mofo branco da soja e em uma série de outras culturas, sobrevive no solo através de suas estruturas de resistência os escleródios que em temperaturas mais amenas e alta umidade germinam e desenvolvem os apotécios que por sua vez liberam os ascósporos que irão infectar as plantas, iniciando assim o ciclo progressivo da doença no campo (GÖRGEN *et al.*, 2010; HENNING *et al.*, 2014).

Entre os sintomas a planta pode apresentar lesões de encharcamento nas folhas que se estendem até o caule. Estes, por sua vez, se tornam fibrosos e esbranquiçados. Também podem ocorrer lesões em frutos, pecíolos e folhas e, nas infestações mais severas, a planta apresenta murcha podendo evoluir até a morte (PELTIER *et al.*, 2012; BOLTON *et al.*, 2006).

2.2.5 *Phomopsis longicolla*

Phomopsis longicolla T. W. Hobbs (syn. *Diaporthe longicolla*) é um patógeno altamente agressivo causador da podridão das sementes de *Phomopsis* (PSD) na cultura da soja. A contaminação por *Phomopsis* causa o enrugamento das sementes, fissuras, sementes alongadas e muitas vezes coloração esbranquiçada (LI *et al.*, 2017).

O clima quente e úmido favorece o desenvolvimento de PSD no estágio final de crescimento e enchimento das vagens. Os sintomas mais característicos aparecem nas vagens e ao longo das hastes e pecíolos, com a presença de picnídios, estes por sua vez são estruturas de sobrevivência de *P. longicolla* e são facilmente dispersados nas plantações pelos respingos das chuvas (BALDUCCHI; McGEE, 1987; HENNIN *et al.*, 2014).

A baixa qualidade de sementes causada pela PSD reflete na viabilidade das sementes, no baixo teor de óleo, grãos mofados e alterações químicas em sua composição, gerando perdas de valores, causando grandes prejuízos aos produtores (LI *et al.*, 2010).

Na tentativa de controlar a doença e interromper sua disseminação, as estratégias de manejo mais adequadas consistem na rotação de culturas não hospedeiras, uso de sementes saudáveis e tratadas, preparo adequado do solo. Ademais, *Phomopsis* spp. perde sua viabilidade quando as sementes são armazenadas em condições ambiente (HARTMAN *et al.*, 1999; HENNING *et al.*, 2014).

2.3 Indução de resistência – Metabolismo secundário

O controle biológico vêm sendo cada vez mais utilizados na proteção de plantas, na busca de incrementos para safras mais produtivas, rentáveis e com baixo impacto ambiental. As plantas possuem capacidade de reconhecerem o ataque de agentes patogênicos (microrganismos e/ou insetos) e apresentam mecanismos de defesa que são ativados por moléculas indutoras (ou elicitoras), desencadeando reações bioquímicas e fisiológicas, que promovem a defesa vegetal, e o processo de indução de resistência (BRUZAMARELLO *et al.*, 2018).

Assim que a planta detecta o ataque, ela reforça suas paredes celulares acumulando calose e lignina e dá início a produção de metabólitos secundários como as fitoalexinas, proteínas de defesa (quitinase e glucanase), e estas, por sua vez,

degradam a parede celular dos fitopatógenos e acumulam ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico. Esses fitormônios darão início às respostas imunes que ocorrerão em cadeia entre as células (MONTE *et al.*, 2019).

Estudos utilizando a indução de resistência em plantas contra patógenos vem ganhando cada vez mais espaço, sendo a resistência induzida capaz de aumentar o nível de resistência sistêmico da planta, através da aplicação de um indutor, podendo esta resistência ser sistêmica adquirida ou induzida. Ambas as resistências são processos distintos seja pela natureza do indutor (biótico ou abiótico) ou pelas rotas bioquímicas ativadas durante o processo (RODRIGUES *et al.*, 2019).

O sistema de defesa ativado com a resistência adquirida pode ser local ou sistêmico, dependendo do intervalo do tempo entre o tratamento inicial e a inoculação do patógeno, variando de alguns dias há várias semanas, ou ainda, podendo durar todo o ciclo de vida da planta, desenvolvendo uma proteção sistêmica do hospedeiro (PASCHOLATI *et al.*, 1995).

A resistência sistêmica adquirida (SAR) produz uma proteção ampla a todo o sistema da planta, podendo influenciar de variadas formas na relação entre hospedeiro e patógeno, ativando um processo eficiente no controle de doenças causadas por fungos, vírus e bactérias. Essa resistência pode ocorrer tanto em plantas susceptíveis, após o ataque de um fitopatógeno, quanto em resposta ao tratamento com elicitores bióticos ou abióticos (GUZZO, 2004).

Diferente da resistência sistêmica induzida (RSI), que envolve o processo de sinalização pelo ácido jasmônico e etileno (VAN LOON *et al.*, 1998). A resistência sistêmica adquirida, envolve alterações em nível de proteínas, relacionadas à patogênese (PR-proteínas), podendo haver síntese de metabolitos secundários, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e alterações estruturais, produzindo diferentes mecanismos de defesa nas plantas, em resposta ao ataque de diferentes fitopatógenos (TAIZ *et al.*, 2017).

Durante a indução de resistência adquirida, algumas enzimas são ativadas para hidrolisarem alguns compostos que compõem as paredes celulares dos fungos fitopatogênicos, como as quitinases (lise de quitinas) e β -1,3-glucanase (lise de polímeros de β -1,3-glucana) facilitando o seu controle (TAIZ *et al.*, 2017).

Nesse sentido, Tucci *et al.* (2012) observaram em seus estudos sobre os efeitos benéficos do gênero *Trichoderma* em tomateiro, que após o fungo *Trichoderma* penetrar as raízes da planta, há um controle da infecção do fungo patogênico, através

de formação de calos, aumento a atividade enzimática das quitinases e peroxidases, acumulando compostos fenólicos antimicrobianos, que podem se associar à expressão de fenilalanina amônia-liase (FAL), hidroxiperoxido liase e glucanase.

Dentre as muitas propriedades do *Trichoderma*, ele também atua como estimulante sistêmico para a defesa das plantas, controlando fungos filamentosos, oomicetos e bactérias. Ele não é reconhecido pela planta como um patógeno, graças a sua capacidade de utilizar os exsudatos das raízes em seu benefício para superar as respostas iniciais de defesa das plantas (MONTE *et al.*, 2019).

Em estudos realizados por Yedidia *et al.* (2000), observou-se que a inoculação utilizando *Trichoderma* em raízes de pepinos estimulou a ativação dos mecanismos de defesa glucanase, quitinase, celulase e peroxidase. Ribas (2014), testou treze isolados de *Trichoderma* spp. e relata que a indução de resistência em feijoeiro, promovida pelo aumento das atividades enzimáticas de quitinase e glucanase é causada pelo isolado de *Trichoderma* ICB05.

Ainda sobre os estudos que buscam elucidar os mecanismos de interação entre plantas e bactérias, Kloeper *et al.* (2004) descrevem que *B. subtilis* GB03 e *B. amyloliquefaciens* produzem 2,3 butanadiol, responsável por induzir respostas de defesa em plantas de *Arabidopsis thaliana*.

A síntese de enzimas como a peroxidase é estimulada na planta por *B. subtilis* na defesa contra a doença do crestamento bacteriano comum no feijoeiro e peroxidase e fenilalanina amônioliase na murcha bacteriana (SBALCHEIRO *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2013). Assim, nota-se a importância dos gêneros *Trichoderma* e *Bacillus*, para a indução de resistência em plantas.

2.3.1 Promotores de crescimento por biológicos

A agricultura brasileira sofre com problemas relacionados a fitossanidade, as perdas giram em 30 - 40 %, quando não realizado o manejo de forma correta podem chegar à 100 %. Grande parte desses prejuízos estão atrelados às doenças, as quais geralmente são controladas pela ação de fungicidas, essas aplicações têm aumentando os resíduos de defensivos agrícolas em alimentos, contaminação ambiental e seleção de alguns fitopatógenos, que podem se tornar resistentes à algumas moléculas utilizadas (DORIGHELLO, 2017). Diferente dos fungicidas químicos, os microrganismos são capazes de formar colônias e se estabelecer, formando um ecossistema próprio, enquanto os agroquímicos possuem controle

temporário e necessitam de várias aplicações durante o desenvolvimento da cultura (CHAGAS JÚNIOR *et al.*, 2014).

Nesse sentido, o uso de microrganismos vem sendo cada vez mais utilizado, dentre estes, estão as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPGPR). Estas são eficazes competidoras e são utilizadas no controle biológico de fitopatógenos por degradarem compostos prejudiciais às plantas, estimulam o crescimento vegetal e atuam como remediadoras na rizosfera, auxiliando no melhor aproveitamento de nutrientes (PELZER *et al.*, 2011). A rizosfera é compreendida como a área do solo sob influência das raízes, essa região apresenta grande atividade e quantidade de microrganismos, os quais podem influenciar diretamente no crescimento, desenvolvimento e produção das plantas (LUCON, 2009).

São vários os mecanismos ativados durante a associação entre microrganismos e plantas, que tornam as rizobactérias capazes de promoverem o crescimento de plantas, dentre eles: fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e solubilização de fosfatos minerais (BAR-NESS *et al.*, 1992), liberação de metabólitos antimicrobianos, degradação da parede celular dos fitopatógenos, indução de resistência em plantas (GARCIA *et al.*, 2015), produção de fitormônios como giberelinas e ácido indol acético (AIA) (FREITAS; GERMIDA, 1992).

O gênero *Bacillus* vem sendo estudado como produtor dos hormônios vegetais como a citocinina e auxina, dentre outros, que são excretadas na rizosfera das plantas estimulando assim seu crescimento. Eles também atuam na redução de Fe^{+3} e Fe^{+2} disponibilizando-os para as plantas. Existem, ainda, outros mecanismos que auxiliam na promoção de crescimento e aumento de biomassa que foram observados em bactérias promotoras de crescimento (SANTOYO; OROZCO; GOVINDAPPA, 2012).

Alguns estudos relatam que determinadas cepas de *Bacillus* produzem compostos voláteis como 2,3 butanodiol, acetoína, aldeídos, cetonas e álcoois, os quais estão envolvidos na promoção do crescimento de plantas e raízes (RYU *et al.*, 2003; GUTIÉRRIEZ-LUNA *et al.*, 2010).

Além das rizobactérias, alguns fungos como o gênero *Trichoderma*, também são capazes de promover o crescimento em plantas, bem como, possuem ação positiva sobre a germinação das sementes, emergência de plântulas, crescimento e desenvolvimento destas, resultando em uma maior produtividade de grãos (CHAGAS *et al.*, 2017). Sua capacidade é atribuída às aptidões que eles demonstraram na

proteção de plantas contra os fitopatógenos da rizosfera, sintetização de hormônios de crescimento, absorção de minerais e solubilização de diversos micronutrientes presentes no solo (YEDIDIA *et al.* 2001).

Isolados de *Trichoderma* foram estudados por Chagas *et al.* (2016), sendo responsáveis por uma maior síntese do ácido indol acético (AIA), relacionando a produção dos fitormônios com o aumento da produção de biomassa e, ocasionando também, um melhor aproveitamento de nutrientes como o fósforo.

Chagas *et al.* (2017), testaram isolados de *Trichoderma* no crescimento vegetal de milho, arroz, soja e feijão e verificaram que o isolado de *Trichoderma asperellum* UFT201 promoveu o crescimento inicial das plantas. Em um estudo similar, Hoyos-Carvajal; Orduz; Bisset (2009), também descrevem diferentes cepas de *Trichoderma* como promotoras de crescimento inicial em plantas de feijão.

Sendo assim, frente a necessidade de produção de alimentos de maneira mais sustentável, os microrganismos benéficos, como dos gêneros *Bacillus* e *Trichoderma*, são uma opção viável e que vem ganhando espaço nos últimos anos, a fim de reduzir o uso de agroquímicos nas lavouras (CASTRO; MELO, 2007; SHAHAROONA *et al.*, 2008), seja no processo de indução de resistência ou como promotores do crescimento.

2.4 Controle biológico de doenças foliares de soja

O crescimento da produção de soja intensifica alguns problemas fitossanitários ocasionados por vírus, bactérias, nematoides e principalmente fungos, gerando um consumo excessivo de insumos agrícolas e, em especial, o uso dos pesticidas, prejudiciais à saúde humana e geradores de resíduos tóxicos ao longo da cadeia trófica impactando o meio ambiente à longo prazo (SINCLAIR; HARTMAN, 2008; FORMIGHIERI *et al.*, 2010).

Diante disto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias alternativas de baixo impacto à saúde e ao ecossistema. Dentre essas alternativas, encontra-se o controle biológico de doenças e pragas. Muitos trabalhos descrevem um grande número de microrganismos que exercem controle biológico sobre fitopatógenos, dentre eles as bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Trichoderma*. Esses microrganismos demonstram boa eficiência no controle de patógenos do solo e recentemente trabalhos vêm sendo desenvolvidos para atestarem sua eficiência também no controle de doenças foliares (SEIXAS *et al.*, 2022;

BARBOSA; RODRIGUES; CABRAL, 2023).

Entretanto, ainda se fazem necessárias novas pesquisas com esses microrganismos, a fim de se comprovar suas eficiências no biocontrole de fitopatógenos. Nesse sentido, o presente estudo, busca contemplar novas informações a respeito de três agentes de controle biológico *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*, onde, conjuntamente os microrganismos promoveram a ação de biocontrole à fitopatógenos, promoção de crescimento e indução de resistência na cultura da soja.

2.5 Doenças da soja

Os principais fungos biotróficos que cometem a cultura da soja são a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow), míldio (*Peronospora manshurica* (Naumov) Syd. In Gaum.) e oídio (*Erysiphe diffusa*). Nesta seção, se apresentam as patologias: ferrugem da soja, míldio, oídio, antracnose, cercospora, septoria, mancha-alvo.

2.5.1 Ferrugem da soja

Dentre as doenças atuais mais importantes para a cultura da soja está a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, o qual gera grandes perdas na produtividade de grãos. O *P. Pachyrhizi* é um fungo biotrófico e necessita de hospedeiro vivo para sua sobrevivência no ambiente e produz teliósporos e uredósporos.

Os uredósporos são as estruturas responsáveis pela infecção das plantas, pois são facilmente disseminados pelo vento; os teliósporos, por sua vez, são produzidos em lesões que se encontram há mais tempo na planta (HARTMAN *et al.*, 1999; YORINORI *et al.*, 2005). A doença pode afetar a cultura da soja em qualquer um dos estádios de desenvolvimento, sendo melhor observada nas folhas na parte abaxial (SINCLAIR; HARTMAN, 1999).

Dorighello (2017), em seus estudos sobre a versatilidade de *Bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja, observou que isolados de *B. subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* inibiram a germinação dos esporos de *P. Pachyrizhi* em 72, 69 e 82%, respectivamente. No teste de folhas destacadas, o uso dos biofungicidas reduziram a severidade da doença, porém, a melhor eficiência foi demonstrada (96%) quando a aplicação ocorreu de

forma preventiva, em até 70% com a aplicação simultânea e em até 47% com a aplicação curativa, comprovando a eficácia do gênero *Bacillus* no controle no controle *in vitro* das doenças estudadas pelos autores.

Steffler *et al.* (2019), avaliando o efeito do uso de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre a produtividade de duas cultivares de soja, observaram que a bactéria atuou no biocontrole da ferrugem asiática, garantindo assim a produtividade de cultivares 601 BRS (RR - Resistente ao glifosato) e 7161 TMG (tecnologia INOX – presença de gene de resistência à ferrugem), testadas pelos autores.

Diante do exposto, fica clara a importância de novos estudos que possam comprovar a eficiência do controle biológico para a ferrugem asiática na cultura da soja. Assim como enfatizam os autores D'Agostino; Morandi (2009), em seus estudos sobre a análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos, que com base nas informações descritas por estes autores, ambas espécies do gênero *Bacillus* são promissoras, mas necessitam de novos estudos para a ferrugem asiática na soja.

2.5.2 Míldio

O míldio é uma doença considerada secundária na cultura da soja e é amplamente disseminada nas regiões produtoras do país. É causado pelo fungo *Peronospora manshurica* (Naumov) Syd., utilizam seus micélios e esporângios para colonizarem plantas hospedeiras e suas estruturas de resistência, os oósporos, permitem que sobrevivam nas mais diversas condições ambientais. Temperaturas entre 20 e 22° C e excesso de molhamento foliar favorecem a doença que tem início nas folhas unifolioladas, podendo se estender por toda a parte aérea da planta (KOWATA, 2008; HENNING *et al.*, 2014). Por ser uma doença secundária e não causar maiores prejuízos econômicos para produtores, não existem muitas técnicas de controle, o que favorece surtos da doença pelo país (REGGINATO, 2008).

Michel; Cavalcanti (2019) testaram a eficiência de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* sobre o míldio em videiras e observaram a eficiência na proteção da cultura de 47,22% para *B. subtilis* e 66,57% para *B. amyloliquefaciens*, atribuindo esses resultados a inativação dos esporângios promovida pelos *Bacillus*. Porém, são escassos os estudos envolvendo o controle biológico para míldio na cultura da soja. Dessa forma, se fazem necessários novos estudos especialmente com a utilização de controle biológico, como alternativa sustentável para o cultivo dessa oleaginosa.

2.5.3 Oídio

O fungo *Erysiphe difusa* é responsável pela doença do oídio na cultura da soja. Sobrevive através de micélios e conídios em plantas hospedeiras e é facilmente disseminado pelo vento e por respingos da chuva (BEDENDO; MASSOLA; AMORIM, 2011).

A baixa umidade do ar (50 a 70%) e temperaturas em torno de 18 a 24 °C, favorecem o desenvolvimento do fungo. A infecção precoce da doença afeta diretamente o rendimento podendo causar danos significativos de 30 a 40% em cultivares suscetíveis. O patógeno cresce e se espalha pela superfície foliar comprometendo fotossíntese e respiração; os esporos também causam estresse na planta fazendo com que ela perca água afetando diretamente a produtividade e qualidade dos grãos (MIGNUCCI; CHAMBERLAN, 1978; MARTINELLI *et al.*, 2004; GODOY *et al.*, 2014).

Dorighello (2017), em seus estudos sobre a versatilidade de *Bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja, utilizou biofungicidas à base de *B. subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* e observou que a severidade do oídio da soja não foi reduzido. Assim, esses relatos indicam há necessidade de novos estudos envolvendo o controle biológico em doenças foliares da soja.

2.5.4 Antracnose

Outra doença de grande importância para a cultura da soja é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* que pode ser transmitida por restos culturais deixados no campo, por sementes infectadas e pela parte aérea das folhas. Uma das características da doença é a presença de pontos negros conhecidos como acérvulos (WRATHER; KOENNING, 2009; HENNING *et al.*, 2014).

A umidade favorece o ataque da doença ocasionando o apodrecimento e queda das folhas e vagens. A doença pode ainda reduzir a germinação e ocasionar o tombamento de plântulas (PESQUEIRA *et al.*, 2016).

Em experimentos realizados *in vitro* por Gabardo *et al.* (2020), foi utilizado *T. Asperellum* e *B. subtilis* no teste de culturas pareadas. O *T. Asperellum* colonizou e produziu esporos sobre *C. truncatum* e produziu metabólitos tóxicos contra o

patógeno, o que não permitiu a formação de escleródios. *B. subtilis* não demonstrou ser um bom antagonista para *C. truncatum*.

Observações semelhantes foram relatadas por Es-Soufi *et al.* (2020). Em estudos utilizando *T. Harzianum* e *B. amyloliquefaciens* contra *C. acutatum*, ambos os agentes inibiram o micélio em mais de 50%. Substâncias não voláteis produzidas pelos antagonistas inibiram o crescimento em 99%, e em contrapartida os compostos voláteis demonstraram uma baixa inibição com 30%, exceto *B. amylolyquefaciens* Bc2 que inibiu 70% do crescimento micelial.

2.5.5 Cercospora

A doença olho-de-rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina* Hara, ocorre em qualquer estágio da planta, sendo mais comum se manifestar na fase de florescimento. A fase inicial da doença apresenta pontos de encharcamento, evoluindo para manchas castanho-claras no centro com bordas castanho-avermelhadas na parte superior das folhas e, na parte inferior, apresentam coloração cinza, onde ocorre a esporulação (HENNING *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 1997).

Apesar de ser um patógeno foliar *C. sojina*, também pode ocorrer em caules, vagens e sementes. Sobrevive saprofiticamente em forma de micélio em restos culturais e sementes, sendo estas as principais fontes de inóculos primários. Sua disseminação ocorre pelo vento. Temperaturas médias de 25 °C e umidade acima de 90% são as condições ideais para que ocorra a infecção; a alta umidade pode lesionar caule e vagens na fase de maturação da planta, podendo causar enrugamento das vagens, escurecimento ou apodrecimento das sementes (GÓMEZ, 2011; CORDEIRO *et al.*, 1992).

2.5.6 Septoria

O fungo *Septoria glycines* Hemmi é responsável por causar a doença conhecida como mancha-parda da soja ou septoriose. A infecção inicial pode ser observada nas folhas primárias cerca de duas semanas após a emergência. Os sintomas apresentados são lesões circulares de coloração vinho, evoluindo para manchas necróticas. Na fase de início da formação das vagens, a doença costuma ser mais intensa e, em situações mais favoráveis, os três primeiros trifolíolos podem ser comprometidos causando a desfolha em plantas de 35-40 dias. Chuvas intensas

e frequentes são as condições ideais para o estabelecimento do patógeno (ALMEIDA *et al.*, 1997; ALMEIDA, 2001; HENNING *et al.*, 2014).

Apesar da septoriose ser uma doença de final de ciclo, quando ela ocorre na fase inicial da cultura, ela pode reduzir a produtividade em até 30% (GODOY *et al.*, 2016). No estágio final de maturação, a doença evolui rapidamente atingindo as partes superiores causando o amarelecimento, a desfolha prematura das plantas e redução no peso das sementes (MARTINS, 2003).

2.5.7 Mancha-alvo

A doença conhecida como mancha-alvo da soja é causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* e está presente nas regiões produtoras de soja. As plantas infectadas apresentam lesões necróticas circulares nas folhas que normalmente podem variar de castanho claro a castanho escuro, com mancha escura no centro, lembrando um alvo. Podem também causar infecções nas raízes. Em sistemas de plantio direto, *C. cassiicola* pode causar podridão radicular com intensa esporulação (YORINORI *et al.*, 2009; HENNING *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Temperaturas elevadas acima dos 25 °C e alta umidade favorecem a doença. O patógeno sobrevive no solo através de suas estruturas de resistência, os clamidóporos, que permitem sua sobrevivência em condições desfavoráveis, em restos culturais, sementes e plantas hospedeiras, sendo disseminado pelo vento e por respingos da chuva (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Em cultivares suscetíveis, pode ocorrer a desfolha prematura, manchas no caule, nas vagens e nas sementes, podendo ocorrer perdas de 18 a 32% para esses cultivares (ALMEIDA *et al.* 2005; GODOY, 2015). No geral, de acordo com Molina (2018), as perdas de produtividade ocasionadas pela mancha-alvo em lavouras correspondem de 8 a 40%.

Dentre as recomendações de manejo, está o plantio de cultivares resistentes, uso de fungicidas, rotação de culturas com gramíneas e o tratamento de sementes (HENNING *et al.*, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi baseado na condução de experimentos utilizando o produto comercial Pardella®, o qual contém a associação dos biológicos *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Os experimentos compreenderam:

- Teste de pareamento direto de patógenos versus agentes de controle biológico (ou biológicos) e estudo do crescimento micelial radial via aplicação do Modelo de Crescimento Logístico [Verhulst];
- Análise através de microscopia eletrônica das estruturas dos patógenos *versus* biológicos;
- Testes de germinação de sementes de soja na presença de agentes de controle biológico;
- Performance fisiológica de plantas de soja na presença de agente de controle biológico;
- Potencial de uso de agentes de controle biológico sobre o oídio na soja;
- Estudo do potencial de indução de resistência na soja por agente de controle biológico.
- Potencial uso de agentes de controle biológico no controle de doenças de final de ciclo (DFCs).

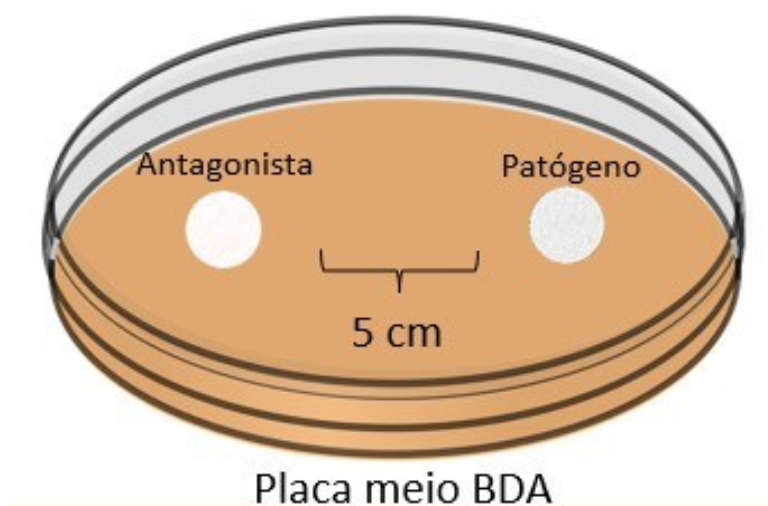
Todos os experimentos foram conduzidos nos laboratórios, casa de vegetação e área experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos-PR, com exceção da microscopia eletrônica de varredura que foi realizada no Campus Pato Branco-PR.

3.1 Teste de pareamento direto, crescimento micelial e aplicação do Modelo de Crescimento Logístico [Verhulst]

A realização do teste de pareamento direto, tem como objetivo verificar o crescimento da colônia do patógeno em sentido oposto aos agentes biológicos. O teste foi conduzido em placas de Petri (90 mm) contendo 20 mL de meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) onde foi disposto um disco de 0,7 cm contendo os agentes de biocontrole (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus amyloliquefaciens*) que foi disposto em uma das extremidades da placa. Para o tratamento, aonde utilizou-se o produto Pardella® foi diluído 0,015g do produto em

água destilada autoclavada e pipetado 20 μ L da solução na placa de Petri. Paralelamente a estes, 5 cm distantes, foi disposto um disco da colônia do fungo de 0,7 cm de diâmetro (Figura 1).

Figura 1 - Representação da disposição do antagonista e patógeno em placa de Petri no teste de pareamento direto



Fonte: Autoria própria, 2023

Logo em seguida, a placa de Petri® foi fechada e sobre a tampa realizado a demarcação com duas linhas, uma longitudinal e outra paralela sobre o tratamento e sobre o disco da colônia do fungo. As mesmas foram utilizadas como referência para medições diárias do crescimento da colônia em direção ao tratamento, e lateralmente ao mesmo.

Na sequência as placas foram vedadas com plástico filme e mantidas em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. As medições foram realizadas a cada 24 horas, para verificar o índice de crescimento diário da colônia do fungo. Medindo-se por 168 horas as colônias dos fungos *F. brasiliense* e *F. tucumaniae*, e por 96 horas as colônias dos fungos *R. solani*, *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum* e *P. longicolla*. Para crescimento micelial final foram considerados somente os dados do último dia de análise sendo constituído por quatro tratamentos, sendo eles *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus amyloliquefaciens* e produto comercial Pardella.

De acordo com Vismara (2019), análise de dados deste tipo de experimento nas Ciências Agrárias, em geral, segue uma abordagem frequentista; consequentemente, envolve o uso de um modelo estatístico baseado em um

delineamento experimental, seguido pela verificação de pressupostos de normalidade e homogeneidade da variância. Em seguida, realiza-se a análise de variância e, dependendo do tipo de tratamento, testes de comparação de médias ou análise de regressão. Se os pressupostos não forem atendidos, os dados são transformados. E, se a transformação não for suficiente, a análise não paramétrica é realizada, seguida pela comparação de tratamentos, mas perdendo informações quantitativas dos dados (VISMARA, 2019).

A fim de contornar este problema de estimação, para avaliar o crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Phomopsis*, *Fusarium* em função do tempo (dia), adotou-se o Modelo Logístico de Crescimento de Verhulst (CRAMER, 2004; BACAËR, 2011 *apud* VISMARA, 2019):

$$Y = \frac{\beta_1}{1 + e^{\frac{\beta_2 - X}{\beta_3}}} = \frac{\beta_1}{1 + e^{[-\beta_3(X - \beta_2)]}} \quad (1)$$

onde:

Y é o valor observado para o crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm);

X é o número de dias da observação;

β_1 é a constante que representa o valor assintótico que, em particular, corresponde ao diâmetro ($\emptyset$, mm) da placa de Petri®;

β_2 é o parâmetro que corresponde à inflexão da curva, i.e, está relacionada ao valor observado inicial e a proporção do valor assintótico a ser ganho;

β_3 é a taxa de crescimento que indica quão rápido se atinge a assíntota, i.e, indica a velocidade com que o valor observado se aproxima do máximo observado. Logo, β_3 determina a eficiência do tratamento (ROSSI; SANTOS, 2014 *apud* VISMARA, 2019).

3.1.1 Análise estatística

Para análise dos dados utilizou-se a ferramenta computacional R (R Core Team, 2023). Também foram necessários os pacotes nlme (PINHEIRO *et al.*, 2019), multcomp (HOTHORN *et al.*, 2008) e tidyverse (WICKHAM, 2017). Então, para estimação dos parâmetros do modelo (1), procedeu-se conforme Vismara *et al.* (2015) e Vismara (2019). Ou seja, os dados de crescimento micelial ($\emptyset$, mm) foram organizados de modo que os preditores de cada tratamento fossem dados em colunas

diferentes via uma abordagem em que um nível hierárquico adicional "tratamento" foi usado no ajuste do modelo. Tal reorganização permitiu o ajuste do modelo multivariado usando um procedimento de ajuste de modelo univariado (GOLDSTEIN, 2011).

3.2 Análise através de microscopia eletrônica das estruturas dos patógenos versus biológicos

Para o estudo da interação entre as estruturas dos patógenos versus biológicos, pela técnica de microscopia eletrônica, foram utilizadas as placas do teste de pareamento direto. Para tanto, as áreas do confronto entre as colônias foram identificadas e aderidas sobre suporte metálico (*stubs*) através de fita de carbono dupla face e as visualizações foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura, na central de análises da UTFPR Campus Pato Branco.

3.3 Teste de germinação de sementes de soja na presença de agente de controle biológico

3.3.1 Caracterização dos lotes de sementes

Foram utilizadas sementes de soja cultivar P96Y90RR, oriundas da safra 2020/2021, sem a utilização de tratamento com fungicidas.

3.3.2 Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com produto biológico

Após a homogeneização e redução para obtenção das amostras de trabalho, as sementes de soja foram pesadas para determinar a dose de tratamento. As sementes foram separadas em sacos de polietileno, e identificados de acordo com cada tratamento.

No tratamento utilizado foram manipulados 0,15 g do biofungicida comercial, diluído em 1,5 mL de água destilada e posteriormente aplicado diretamente sobre 250 g de sementes que estavam condicionadas nos sacos, sendo então homogeneizadas.

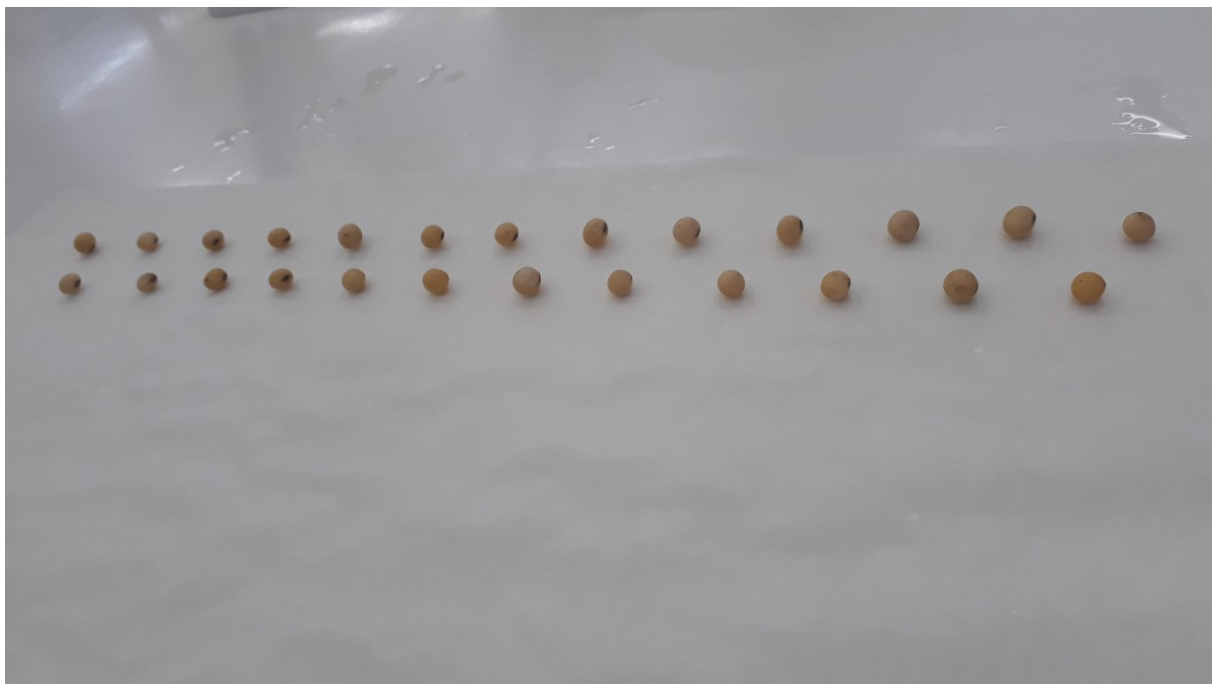
Para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram analisados: contagem inicial de germinação (CIG), contagem final de germinação de plântulas normais (CFGN), contagem final de germinação de plântulas anormais (CFGA), comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm) e massa seca

(MS, g), as quais são descritas a seguir. Os testes de análise de sementes foram realizados conforme recomendações das Regras de Análises de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

3.3.2.1 Porcentagem de Germinação

Para análise de porcentagem de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. Como substrato foi utilizado papel Germitest® umedecido com água destilada, em quantidade equivalente a duas vezes e meia a sua massa (NAKAGAWA *et al.*, 1999) (Fotografia 1).

Fotografia 1 - Preparação das sementes em papel Germitest®



Fonte: Autoria própria, 2023

Após as sementes serem dispostas no substrato papel, os mesmos foram enrolados e envoltos em filme plástico para evitar perda de umidade. Os rolos de papel foram mantidos em câmara germinadora modelo Mangelsdorf, previamente regulada a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por oito dias. Ao quinto e oitavo dia foram avaliados a porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas (Fotografia 2), seguindo as orientações descritas das Regras de Análises de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

Fotografia 2 - Avaliação da percentagem de germinação



Fonte: Autoria própria, 2023

3.3.2.2 Comprimento de plântula

Para a avaliação de comprimento de plântula utilizou-se quatro repetições de 25 sementes, as quais foram dispostas em papel Germitest® umedecido com água destilada, em quantidade equivalente a duas vezes e meia a sua massa (BRASIL, 2009). As sementes foram dispostas com a micrópila voltada para a parte inferior do papel. Os rolos de papel foram acondicionados e mantidos nas mesmas condições que no teste de germinação.

Após oito dias, foi realizada a avaliação da parte aérea e raiz primária de plântulas normais. Para avaliação foi utilizada folha de papel milimetrado e, os resultados expressos em centímetro por planta, especificamente para os comprimentos da parte aérea (CPA, cm) e raiz (CR, cm) e então foram computados obtendo-se os valores médios destas variáveis por repetição (Fotografia 3).

Fotografia 3 - Avaliação do comprimento de plântula



Fonte: Autoria própria, 2023

3.3.2.3 Massa seca

Para a matéria seca foram utilizadas as plântulas obtidas no teste de comprimento de plântula. Para tal, foram separadas parte aérea e raiz, descartando-se os cotilédones. O material foi disposto separadamente em sacos de papel do tipo Kraft, e em seguida acondicionados em estufa de circulação de ar forçado, em temperatura de 60 °C por 7 dias (NAKAGAWA *et al.*, 1999). Após esse período, o material foi alocado em dessecador contendo sílica, para resfriamento sem absorção de umidade. Cada repetição teve a massa determinada, utilizando-se balança de precisão. Os resultados médios obtidos foram expressos em miligrama (mg) por plântula e, então computados os valores médios por repetição em gramas (g).

3.3.3 Análise estatística

Para análise de dados utilizou-se o software R (R Core Team, 2023) e o pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2021). O experimento foi em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 4 repetições. A variável preditora (tratamento) consistiu em 2 tratamentos qualitativos: controle/testemunha (1) e agente de controle biológico (2). As variáveis repostas observadas foram: contagem inicial de germinação (CIG, %); contagem final de germinação de plântulas normais (CFGN, %); contagem final de germinação de plântulas anormais (CFGPA, %); comprimento da parte aérea (CPA, cm); comprimento da raiz (CR, cm); massa seca (MS, g). Por inspeção visual, se observou o vigor das sementes, segundo os níveis: alto, médio vigor e baixo vigor.

Após a avaliação dos experimentos e compilação das variáveis observadas neste experimento, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de Bartlett para verificação da homogeneidade da variância, ao nível de 5% de significância. Quando atendidas as pressuposições do modelo DIC, procedeu-se a análise de variância (ANOVA) e, quando significativa ($p \leq 0,05$), deu-se sequência ao teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$). Para as variáveis que não atenderam aos pressupostos da ANOVA, procedeu-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de tratamentos (CONOVER; CONOVER, 1980). Para análise do vigor das sementes, se procedeu o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de tratamentos (CONOVER; CONOVER, 1980).

3.4 Performance fisiológica de plantas de soja na presença de agente de controle biológico

Em 20 tubos de PVC com dimensões de 0,7x0,2 m (Fotografia 4), contendo substrato comercial foram semeadas quatro sementes de soja. Esses tubos foram mantidos em condições naturais, onde receberam irrigação diária de forma manual. No estágio fenológico V2 (duas folhas verdadeiras), foram descartadas três plantas e mantida uma planta em cada tubo até o final do experimento, estágio fenológico V6. O T1 correspondeu ao tratamento controle, sem nenhuma aplicação, e o T2 correspondeu a aplicação do biofungicida, com 10 repetições por tratamento.

Fotografia 4 - Experimento de promoção de crescimento de plantas de soja em tubos de PVC



Fonte: Autoria própria, 2023

No estágio fenológico V6, foram avaliados os efeitos sobre o crescimento das plantas, através da determinação do comprimento da parte aérea e da raiz primária das plantas e, na sequência obtida a massa de matéria seca.

3.4.1 Análise estatística

Para análise de dados utilizou-se o software R (R Core Team, 2023) e o pacote ExpDes.pt (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2021). O experimento foi em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com 10 blocos com 2 repetições, totalizando 20 unidades experimentais por tratamento. A variável preditora (tratamento) consistiu em 2 tratamentos qualitativos: controle/testemunha (1) e agente de controle biológico (2).

As variáveis repostas observadas foram: comprimento da Parte Aérea (CPA, cm); comprimento da Raiz (CR, cm); massa fresca da parte aérea (MFPA, g); massa fresca da raiz (MFR, g); volume da raiz (VR, mL); massa seca da parte aérea (MSPA, g); e massa seca da raiz (MSR, g).

O efeito de bloco não foi significativo; logo, considerando o princípio da parcimônia que recomenda o modelo estatístico mais simples, procedeu-se a

inferência com o modelo estatístico em DIC, com 20 repetições. Porém, não foram atendidos os pressupostos da ANAVA, então adotou-se a inferência não paramétrica via o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância ($p \leq 0,05$).

3.5 Estudo do potencial de uso de agente de controle biológico sobre o oídio na soja

Para avaliação da severidade de oídio em plantas de soja, os testes foram conduzidos em casa de vegetação, com temperatura média de 25 ± 3 °C e fotoperíodo médio de 12 h. As sementes foram semeadas em vasos de polietileno com capacidade para 10 litros, contendo solo proveniente de lavoura de soja (Fotografia 5), tendo as plantas recebido irrigação manual diária.

Foi realizada uma pulverização noturna com os agentes de controle biológico de forma preventiva quando as plantas estavam no estágio V4, com concentração de acordo com recomendação do fabricante. A avaliação ocorreu no estágio V5/V6 de desenvolvimento da cultura.

A severidade de oídio foi estimada visualmente pela porcentagem de área foliar coberta pelo micélio do fungo, em relação à área foliar total (Fotografia 6). Para tal, foi utilizada a escala diagramática apresentada na Figura 2, a qual foi desenvolvida por Mattiazzi (2003).

3.5.1 Análise estatística

Para análise de dados utilizou-se o software R (R Core Team, 2023) e o pacote ExpDes.pt (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2021). O experimento foi delineado em parcelas subdivididas no tempo (3 tempos de medição/coleta de dados) em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com 10 blocos com 2 repetições, totalizando 20 unidades experimentais por tratamento. A variável preditora (tratamento) consistiu em 2 tratamentos qualitativos: (1) controle/testemunha e (2) agente de controle biológico (2). Avaliou-se o número total de folhas por planta (NTFP), número total de folhas com oídio (NTFO), percentual de folhas com oídio (NTFO%) e número total de manchas de oídio (NTMO). Procedeu-se a ANAVA e quando significativa ($p \leq 0,05$), procedeu-se o teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Fotografia 5 - Experimento para avaliação de controle de oídio em vasos



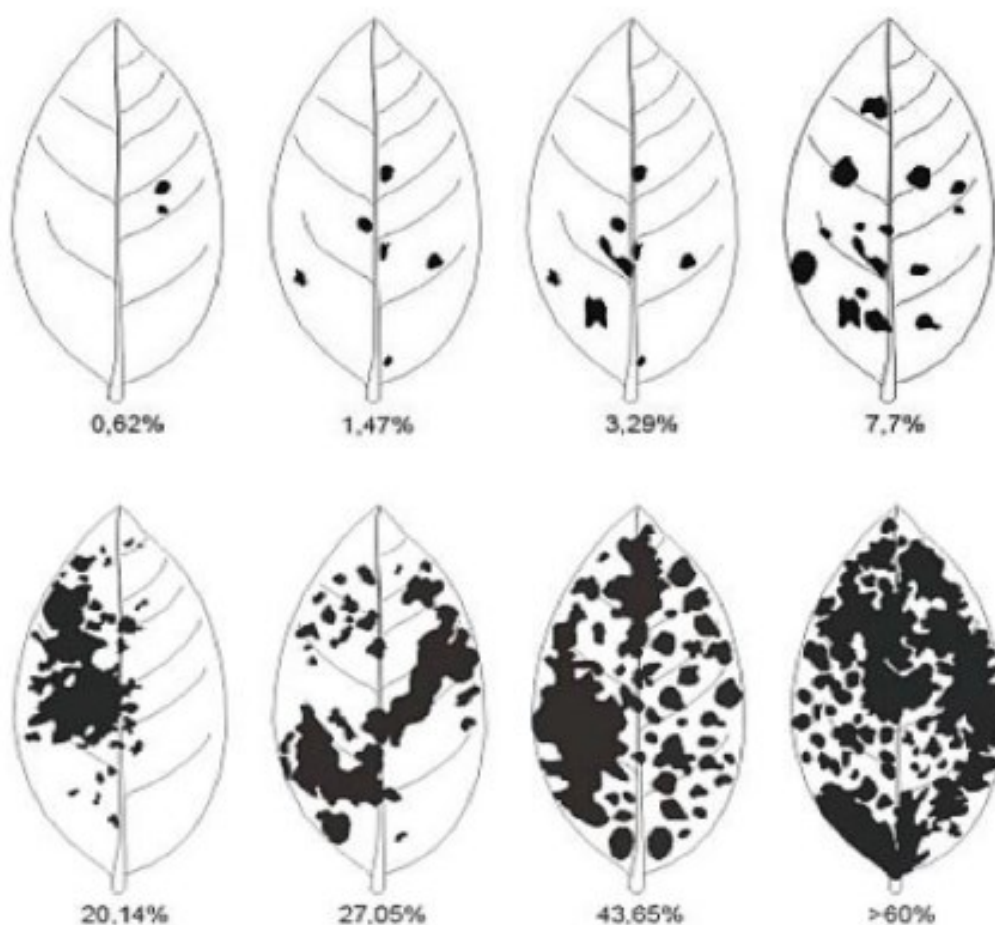
Fonte: Autoria própria, 2023

Fotografia 6 - Avaliação da severidade do oídio



Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 2 - Escala diagramática para severidade do oídio da soja



Fonte: Mattiazzi, 2003

3.6 Estudo do potencial de indução de resistência na soja por agente de controle biológico

Foram semeadas quatro sementes de soja em vasos de polietileno com capacidade para 10 litros, contendo solo proveniente de lavoura de soja. No estágio V5 procedeu-se o desafio com patógenos, com a aspersão de uma solução contendo agentes causadores de doenças foliares em soja, o que se denominou 'mix' de patógenos, e então realizou-se uma câmara úmida, sendo os vasos e planta envolvidos por sacos plásticos de polietileno com espessura 80 µm (Fotografia 7).

Fotografia 7 - Plantas inoculadas para avaliação bioquímica



Fonte: Autoria própria, 2023

3.6.1 Análise estatística

Para análise de dados utilizou-se o software R (R Core Team, 2023) e o pacote ExpDes.pt (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2021). O experimento foi delineado em parcelas subdivididas no tempo (3 tempos de medição/coleta de dados) em DIC, com 5 repetições. A variável preditora consistiu em 3 tratamentos qualitativos: (1) controle/testemunha, (2) agente de controle biológico (Pardella®), e (3) indutor de resistência/referência Acibenzolar-S-Metilico.

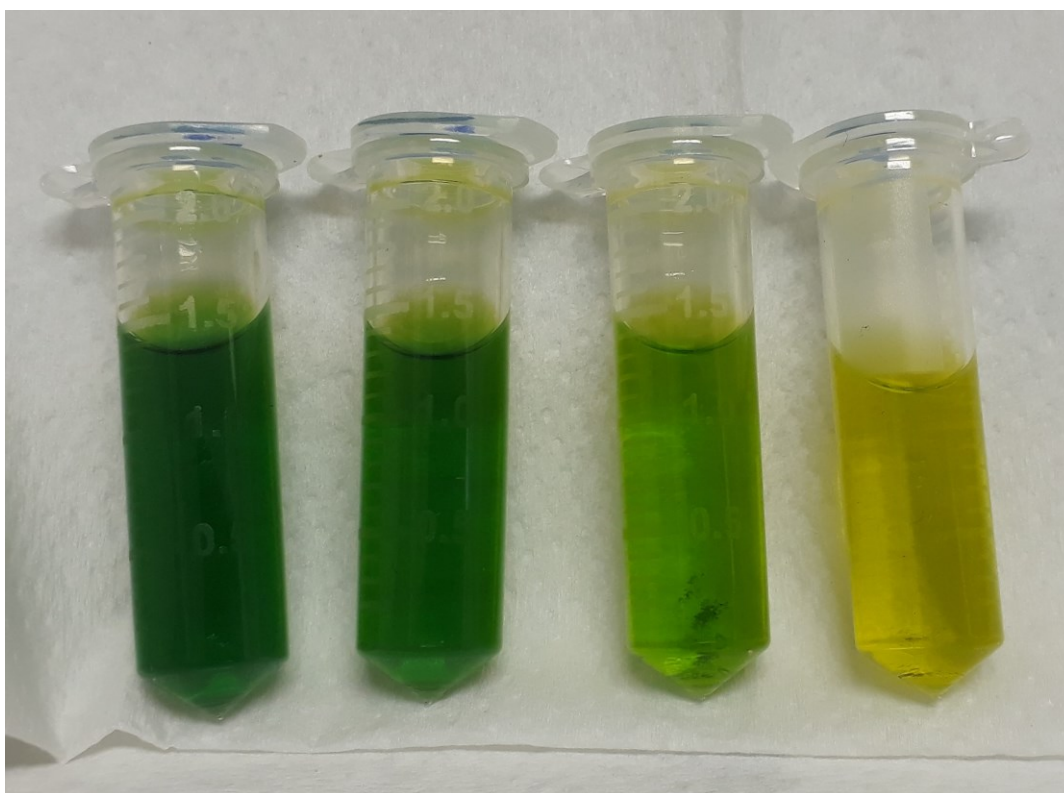
Para isto, folhas das plantas foram coletadas do primeiro trifólio melhor desenvolvido (do ápice para a base) nos tempos 0, 48 e 96 horas após os tratamentos. De cada planta foram coletadas três folhas, totalizando três folhas amostradas por repetição (vaso). Nas coletas, os folíolos foram dispostos em envelopes de papel-alumínio e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras permaneceram armazenadas em freezer, até serem processadas para as diferentes análises bioquímicas.

As variáveis respostas observadas foram: concentração de proteínas totais ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL, $\text{UA}\cdot\text{mg}^{-1}$), concentração de compostos fenólicos ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$), atividade da enzima quitinase ($\text{UA}\cdot\text{mg}^{-1}$) e atividade da enzima β -1,3-glucanase ($\text{UA}\cdot\text{mg}^{-1}$).

3.6.2 Extratos proteicos

Os extratos proteicos foram obtidos pela maceração das amostras das folhas (0,5 g a 1 g) em 4 mL de tampão de extração, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), com 0,3 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 0,2 g de EDTA, com o objetivo de proporcionar a absorção e inibição da oxidação de enzimas e compostos fenólicos presentes nas folhas. O extrato foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático (Fotografia 8).

Fotografia 8 - Amostras para testes bioquímicos

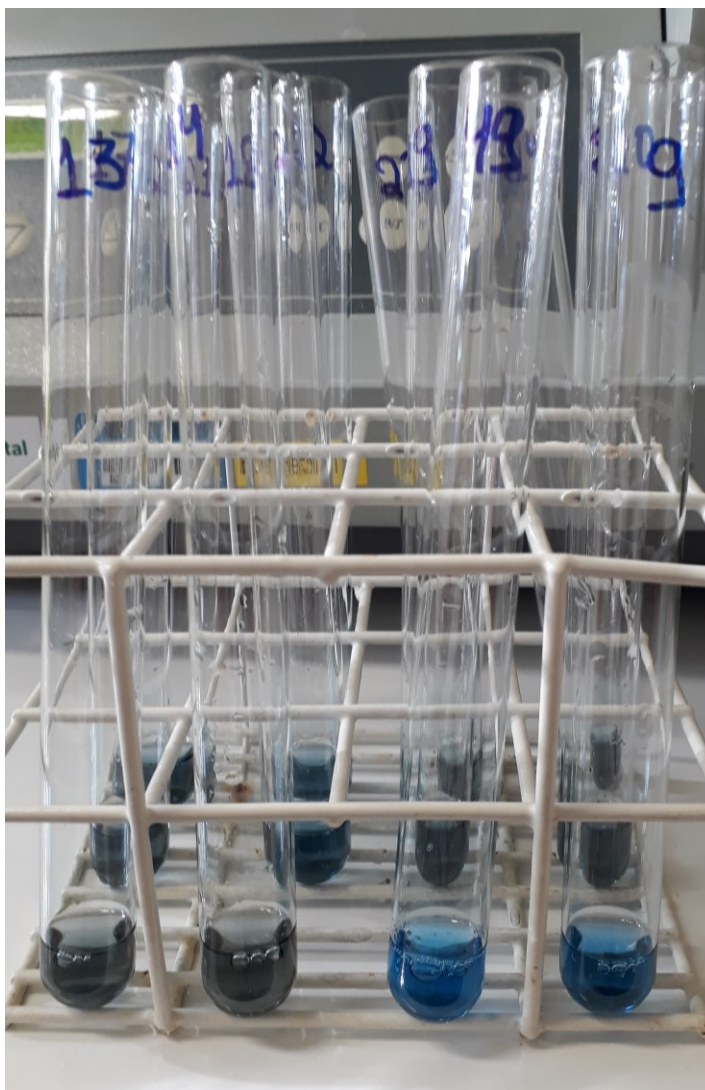


Fonte: Autoria própria, 2023

3.6.3 Proteínas totais

Os teores de proteína foram determinados usando o teste proposto por Bradford (1976), com tampão fosfato 0,2 molar (0,2 M), pH 7,5 e reagente Bio-Rad®. Para realização do mesmo, adicionou-se 40 µL do sobrenadante do extrato vegetal para tubos de ensaio, 460 µL de água destilada e 1 mL de reagente concentrado de Bradford. A mistura foi agitada em vórtex, e após dez minutos realizou-se a leitura de absorbância a 595 nm (Fotografia 9).

Fotografia 9 - Amostras para determinação das proteínas totais



Fonte: Autoria própria, 2023

A concentração de proteínas de cada amostra foi expressa em μg equivalentes de albumina de soro bovino (ASB), utilizando-se de curva-padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 $\mu\text{g/mL}$. A atividade das enzimas relacionadas à patogênese, foi expressa em relação ao conteúdo total de proteínas das amostras.

3.6.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL)

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina segundo Kuhn (2007), com algumas modificações. A mistura da reação, 100 μL do extrato proteico, 400 μL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 μL de L-fenilalanina (49,6 mg/mL),

e incubada a 40 °C por uma hora.

A reação foi cessada pela adição de 200 µL de HCl 0,5N e banho de gelo (cinco minutos). A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, e as leituras de absorbância foram interpretadas em relação a uma curva padrão preparada com o ácido trans-cinâmico. A atividade enzimática foi expressa em mg de ácido trans-cinâmico min⁻¹. mg⁻¹ de proteína.

3.6.5 Quantificação de compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada em duas etapas, seguindo o método adaptado de Bielecki; Turner (1966). A primeira conteve a extração dos fenóis totais, realizada a partir da adição de 4 mL da solução metanol, clorofórmio e água (MCA), na relação 6:2,5:1,5 v/v, no material vegetal, com trituração em almofariz à temperatura ambiente, seguida de uma centrifugação a 6.000 rpm por 20 min, sendo coletado o sobrenadante. Posteriormente, realizou-se uma nova extração do resíduo remanescente, adicionando-se 4 mL de MCA, seguido de uma nova centrifugação a 6.000 rpm por 20 minutos, adicionando o sobrenadante ao primeiro, obtendo-se o extrato MCA. Sobre este extrato obtido, foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, realizando nova centrifugação a 6.000 rpm por 15 minutos para separação das fases.

A segunda etapa consistiu na determinação de fenóis totais, realizada pelo método adaptado de Jennings (1991). A quantificação de fenóis foi feita através de uma curva padrão utilizando tirosina. As amostras foram preparadas a partir da retirada de uma alíquota de 0,5 mL da parte superior do tubo de extração dos fenóis (extrato MCA), na sequência, foram adicionados 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 15 minutos, foram adicionados 5 mL do reagente alcalino "A" (preparado com carbonato de sódio a 2 % em uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N), permanecendo durante 50 minutos até a leitura da absorbância em 760 nm, em espectrofotômetro. No controle negativo, foi usada água destilada no mesmo volume do extrato vegetal. O resultado foi expresso em mg.g⁻¹ de tecido vegetal fresco.

3.6.6 Atividade de quitinases e β-1,3-glucanases

Para dosagem das atividades de quitinases e β-1,3-glucanases, as amostras

foram maceradas em 4,0 mL de tampão de extração de acetato 100 mM (pH 5,0), seguido de centrifugação (20.000 rpm por 25 min, a 4 °C). O sobrenadante (extrato proteico) foi coletado e 200 µL utilizados para a avaliação da atividade das enzimas.

A atividade enzimática das quitinases foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. Para tanto, 200 µL do extrato foram misturados a 600 µL do mesmo tampão de extração e a 200 µL de “CM-chitin-RBV” (2,0 mg.mL⁻¹). Após incubação por 20 minutos a 40 °C a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1,0 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000 rpm por cinco minutos. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada como referência e os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹ (mg de proteína)⁻¹, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 µL de tampão de extração + 200 µL de “CM-chitinRBV”).

Para a determinação espectrofotométrica das atividades de β-1,3-glucanases nos extratos foi utilizada, como substrato uma solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg.ml⁻¹, Loewe Biochemica GmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por Wirth; Wolf (1992) e com o procedimento descrito por Guzzo; Martins (1996). Para tanto, 200 µL do extrato protéico foram misturados com 600 µL do mesmo tampão de extração e 200 µL de CM-curdlan-RBB (4,0 mg.mL⁻¹). Após incubação por 20 minutos a 40 °C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1,0 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000 rpm por cinco minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 600 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹ (mg.proteína)⁻¹.

3.7 Potencial uso de agentes de controle biológico no controle de doenças de final de ciclo (DFCs)

Foram conduzidos três experimentos, entre os anos de 2020 e 2021 na estação experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *Campus* Dois Vizinhos. A área está localizada a aproximadamente 530 metros acima do nível do mar, Latitude de 25° 45' 00" S, Longitude de 53° 03' 25" W. Segundo a classificação de Köppen, o clima local é subtropical úmido Cfa, o solo da cidade de Dois Vizinhos é predominantemente nitossolos e latossolos, apresentando solos profundos, porosos e bem permeáveis como característica (ALVAREZ *et al.*, 2013).

Os tratamentos foram constituídos de uma testemunha, onde não houve

aplicação, e um tratamento de controle biológico, onde houveram duas aplicações do produto comercial Pardella®, sendo a primeira no estágio fenológico da cultura da soja V3 e a segunda aplicação em V5, em parcelas de 4 x 10 metros, com quatro repetições à campo. A dose utilizada foi de 150 g.ha⁻¹ do produto comercial, sendo as aplicações realizadas com um pulverizador de CO₂, com calibração do volume de calda de 150 L.ha⁻¹.

As variáveis resposta analisadas foram relacionadas à severidade das doenças, sendo realizadas três avaliações, iniciando assim que surgiram os primeiros sintomas por ocorrência natural (R3), e as demais com intervalos de 20 dias, constituído a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). As avaliações de severidade foram com o uso de escalas diagramáticas para DFC (Figura 3). Para cada dado obtido calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) usando a equação abaixo (SHANER; FINNEY, 1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(X_i + X_{i+1})]/2(t_{i+1} - t_i) \quad (2)$$

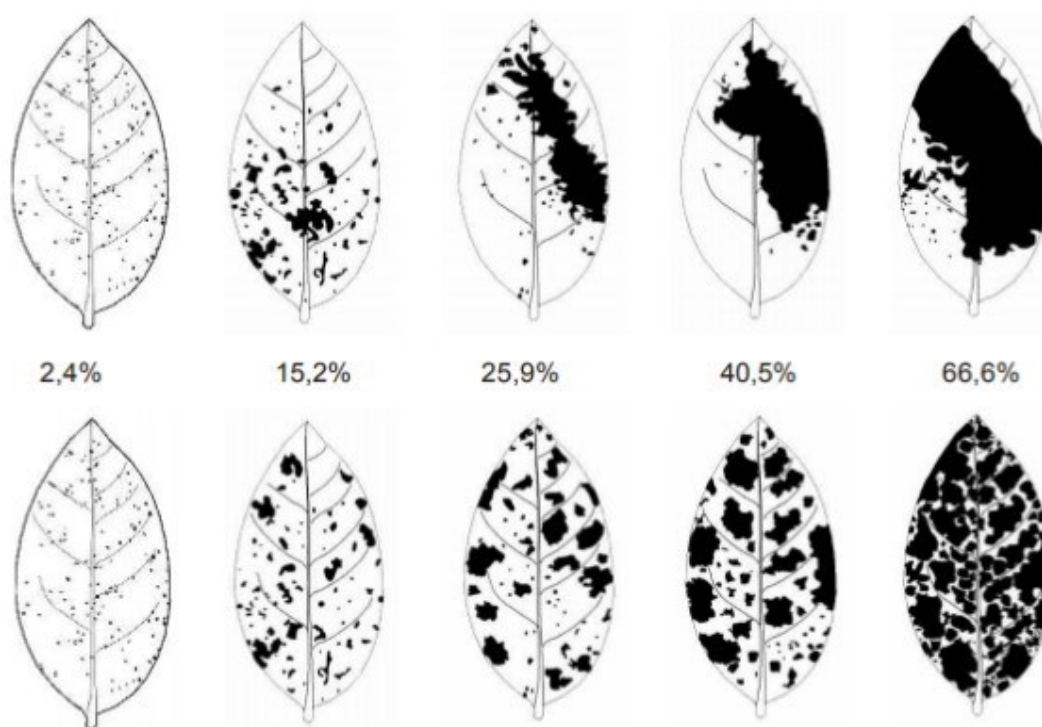
Onde:

n é o número de avaliações;

x é a severidade da doença;

t é o intervalo de tempo entre avaliações consecutivas i e i+1, com i=1, 2, 3.

Figura 3 - Escala diagramática para severidade de DFCs da soja



Fonte: Martins *et al.*, 2004.

3.7.1 Análise estatística

O experimento foi o bifatorial em DIC, com os fatores tempo (do ano de avaliação) e tratamento (testemunha e agente de controle biológico), para a 1ª, 2ª e 3ª avaliação da severidade e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), com quatro repetições. Procedeu-se a análise de variância e, quando significativa, procedeu-se o teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de pareamento direto, crescimento micelial e aplicação do Modelo de Crescimento Logístico [Verhulst]

O potencial antagonico e inibitório dos agentes de controle biológico contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis longicolla*, *Fusarium tucumaniae* foi verificado pelo teste de pareamento direto.

Para *Sclerotinia sclerotiorum*, no parâmetro β_1 , o qual representa a assíntota, o *Trichoderma asperellum* apresentou o menor valor quando comparado aos demais tratamentos, sugerindo que esse tratamento foi mais efetivo na inibição do crescimento micelial radial de *Sclerotinia* na placa de Petri® no teste de cultura pareada. Contudo, todos os agentes de controle biológicos foram antagonistas eficientes no controle de *S. sclerotiorum* quando comparados com a testemunha (Tabela 1 e Gráfico 1).

O impacto direto do *Trichoderma* nos patógenos inclui a produção de enzimas de degradação da parede celular, competição por espaço e nutrientes e estabelecimento de uma relação parasitária direta com o patógeno fúngico. O tipo de mecanismo envolvido é muitas vezes uma característica da cepa e depende do tipo de interação entre o microrganismo antagonista e o patógeno (TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022).

Trichoderma spp. são considerados eficazes no controle de *S. sclerotiorum* em várias culturas (SHARMA; SAIN, 2010; ELIAS *et al.*, 2016; SUMIDA *et al.*, 2018), incluindo soja. Estudos anteriores mostraram que espécies de *Trichoderma* variaram de 62% a 100% de inibição da germinação micelial de *S. sclerotiorum* quando aplicado diretamente aos esclerócios (HADDAD *et al.*, 2017; SUMIDA *et al.*, 2018). A eficácia do uso do *Trichoderma* no manejo de *S. sclerotiorum* está relacionada à sua capacidade de parasitar e degradar escleródios (SILVA *et al.*, 2022).

O menor valor de β_2 observado para o *Bacillus amyloliquefaciens* e o produto comercial Pardella® em confronto com o *S. sclerotiorum* sugere que nesses tratamentos a desaceleração do crescimento micelial de *Sclerotinia* foi atingida mais cedo, o que pode ser confirmado ao se observar o ponto de inflexão desses dois tratamentos (Tabela 1 e Gráfico 1).

Os tratamentos com o *Bacillus amyloliquefaciens* e o produto comercial Pardella® também diferiram estatisticamente da testemunha em relação ao parâmetro

β_3 , o qual representa a taxa de crescimento micelial, o que sinaliza que o fechamento da placa com micélios foi atingido em espaço de tempo mais curto (Tabela 1 e Gráfico 1). Ou seja, os isolados antagonistas apresentaram velocidade de crescimento estatisticamente superiores ao patógeno.

Em todos os tratamentos houve inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. O micélio de *T. asperellum* ocupou todo o espaço disponível na placa, sobrepondo o fungo patogênico (Fotografia 10B), possivelmente por meio do micoparasitismo e competição, com maior destaque para o primeiro modo de ação, pois nesse caso o antagonista cresceu em direção ao fungo patogênico e se envolveu a ele. Essa interação resulta em primeiro estágio de esmagamento, seguido de reações que degradam a parede celular do fungo por meio da secreção de enzimas líticas, limitando o crescimento e a atividade do patógeno (BARROS, 2014).

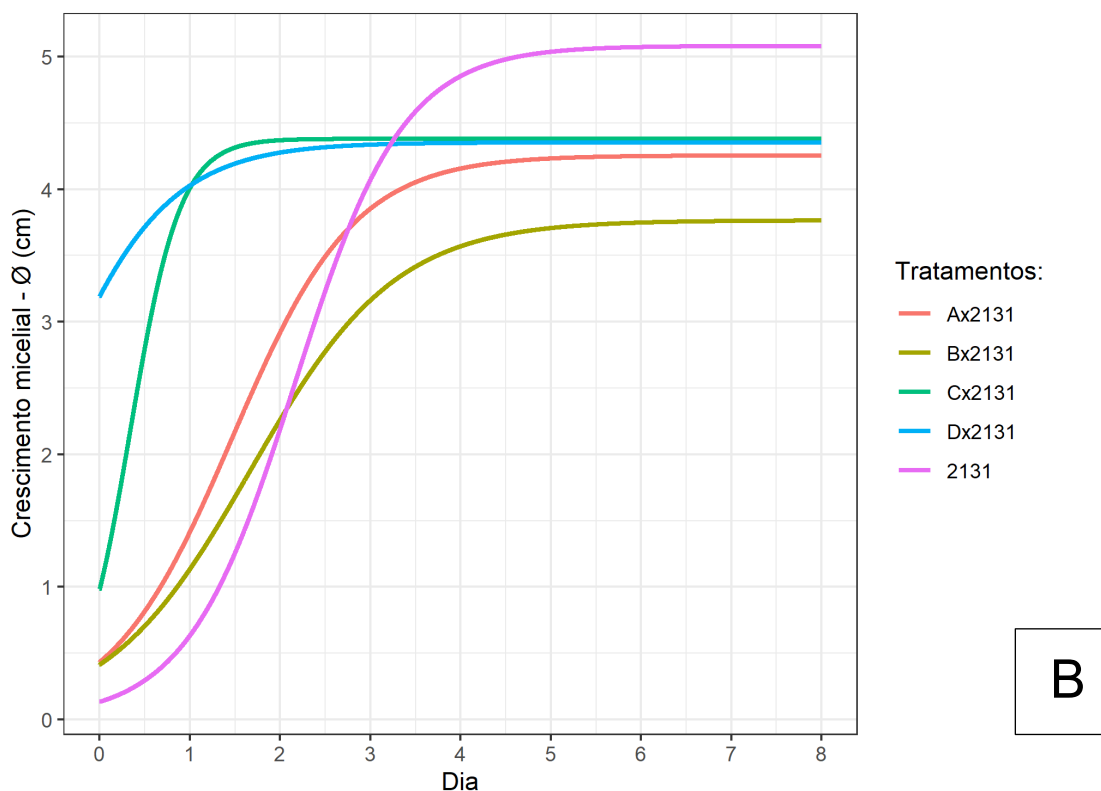
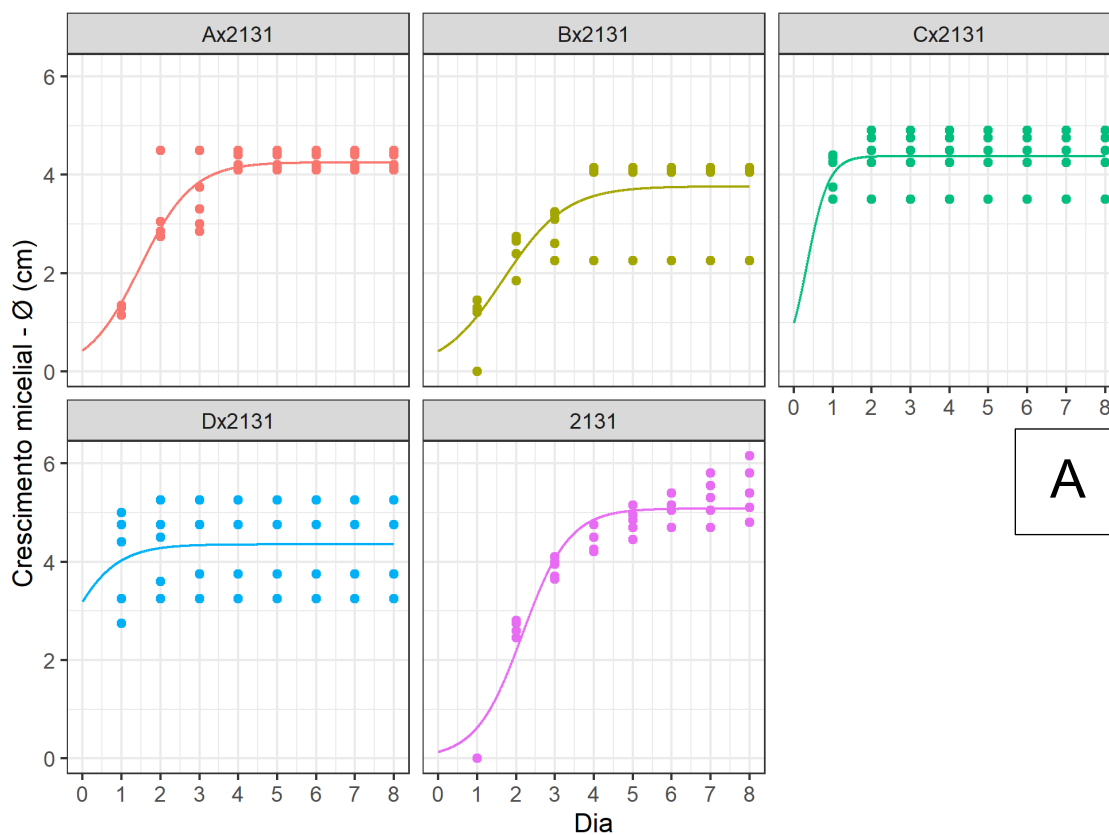
Para *Bacillus amyloliquefaciens* e produto comercial Pardella®, é possível que tenha ocorrido a produção de metabolitos secundários, com atividade antifúngica. A liberação de enzimas líticas, antibióticos ou voláteis como mecanismo para controlar o crescimento de patógenos e a produção de micotoxinas na interação fúngica já foi relatado para antagonistas como *Trichoderma* (TIAN *et al.*, 2020). Da mesma forma, ensaio *in vitro* mostrou que *Bacillus* podem produzir compostos orgânicos voláteis e inibem o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (MASSAWE *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de *Sclerotinia* para os tratamentos

Parâmetro	Tratamento	Q(2,5)	Estimativa	Q(97,5)	*
β_1 (assíntota)	2131	4,8743	5,1250	5,3758	a
	Ax2131	4,0416	4,2811	4,5206	b
	Bx2131	3,5289	3,7917	4,0544	c
	Cx2131	4,1942	4,3808	4,5674	b
	Dx2131	4,1531	4,3396	4,5261	b
β_2 (inflexão)	2131	1,9627	2,1796	2,3964	a
	Ax2131	1,1681	1,4450	1,7219	b
	Bx2131	1,2818	1,6358	1,9897	ab
	Cx2131	0,1932	0,3985	0,6037	c
	Dx2131	0,1825	0,3917	0,6010	c
β_3 (taxa de crescimento)	2131	1,0684	1,4815	1,8945	b
	Ax2131	0,8771	1,3107	1,7443	b
	Bx2131	0,7063	1,1091	1,5120	b
	Cx2131	2,2770	4,1655	6,0539	a
	Dx2131	2,2306	4,2062	6,1817	a

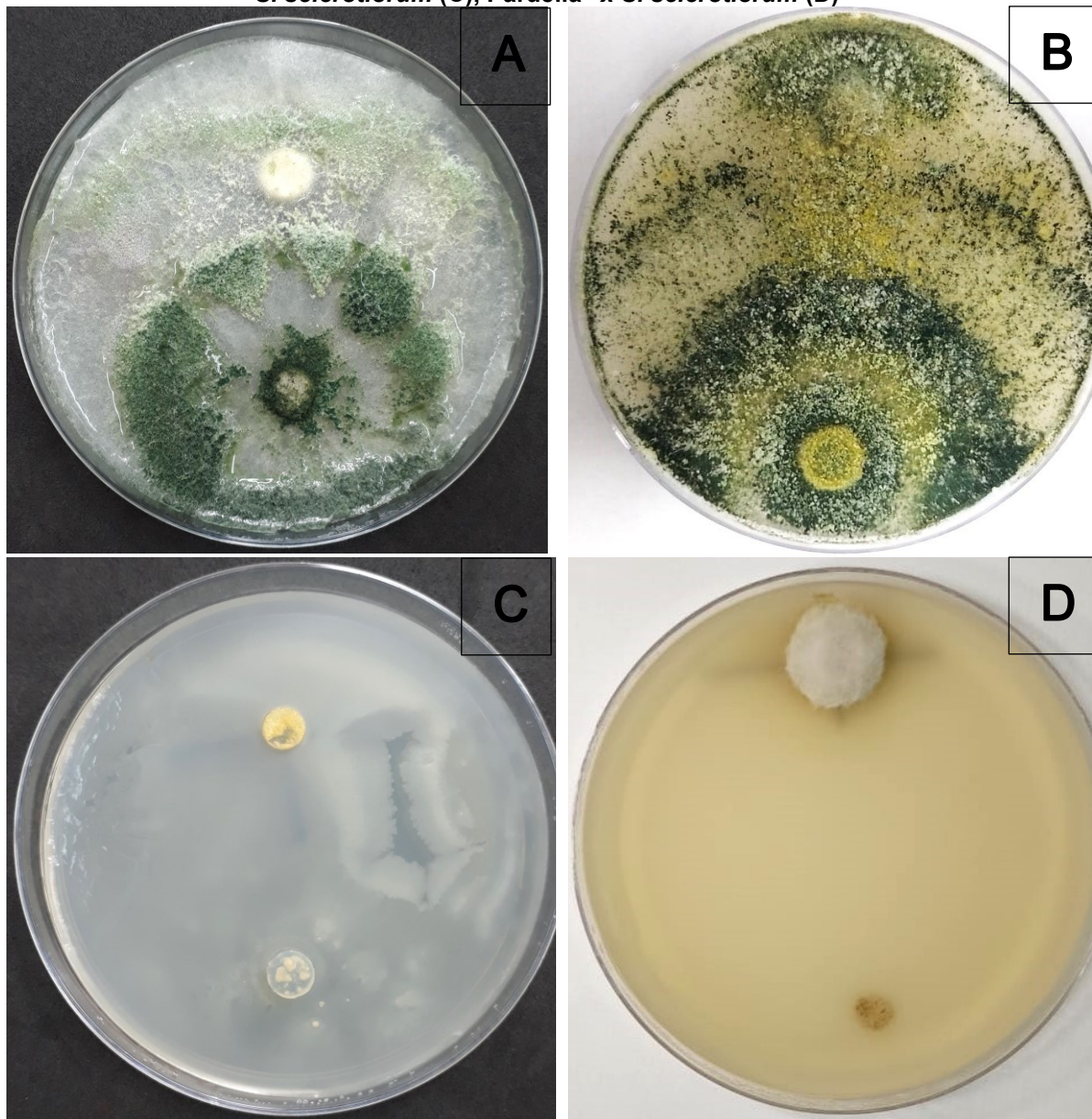
2131= *Sclerotinia sclerotiorum*; Ax2131= *Trichoderma harzianum* x *S. sclerotiorum*
 Bx2131= *Trichoderma asperellum* x *S. sclerotiorum*; Cx2131= *Bacillus amyloliquefaciens* x *S. sclerotiorum*; Dx2131= Pardella® x *S. sclerotiorum*. *Estimativas dos tratamentos não seguidas por mesma letra na coluna, diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade de erro. Fonte: Autoria própria, 2023

Gráfico 1 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de *Sclerotinia*: (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano



2131= *Sclerotinia sclerotiorum*; Ax2131= *Trichoderma harzianum* x *S. sclerotiorum*
 Bx2131= *Trichoderma asperellum* x *S. sclerotiorum*; Cx2131= *Bacillus amyloliquefaciens* x *S. sclerotiorum*; Dx2131= *Pardella*® x *S. sclerotiorum*. Fonte: Autoria própria, 2023

Fotografia 10 - Pareamentos em placas de Petri® entre *Trichoderma harzianum* x *S. sclerotiorum* (A), *Trichoderma asperellum* x *S. sclerotiorum* (B), *Bacillus amyloliquefaciens* x *S. sclerotiorum* (C), *Pardella*® x *S. sclerotiorum* (D)



Fonte: Autoria própria, 2023

Para *Rhizoctonia solani* os isolados de *T. harzianum* (Ax1861) e *T. asperellum* (Bx1861) apresentaram maior inibição micelial do patógeno no teste de cultura pareada, quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 2 e Gráfico 2). Resultados semelhantes foram relatados por Mayo *et al.* (2015), onde isolados de *Trichoderma* inibiram o desenvolvimento de *R. solani* em condições *in vitro*, com inibição de crescimento em até 72,77% nos ensaios de confrontação direta em placas de Petri.

Trichoderma spp. possuem um conjunto diverso de genes que produzem compostos secundários que podem parasitar e antagonizar *R. solani* (ABBAS *et al.*, 2022). Além disso, há a competição por nutrientes, sendo que *Trichoderma* spp., compete com *R. solani* por nutrientes, principalmente carbono (SARROCCO *et al.*, 2009).

A área micelial de *R. solani* foi reduzida quando cultivado em meio contendo micélios de *Trichoderma harzianum* (Fotografia 11A) e *Trichoderma asperellum* (Fotografia 11B). Zambrano; Parra; Ortiz (2021) ao realizarem testes de inibição do crescimento micelial com isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro*, observaram característica micoparasitária típica, onde os isolados de *Trichoderma* cresceram sobre as hifas de *R. solani*.

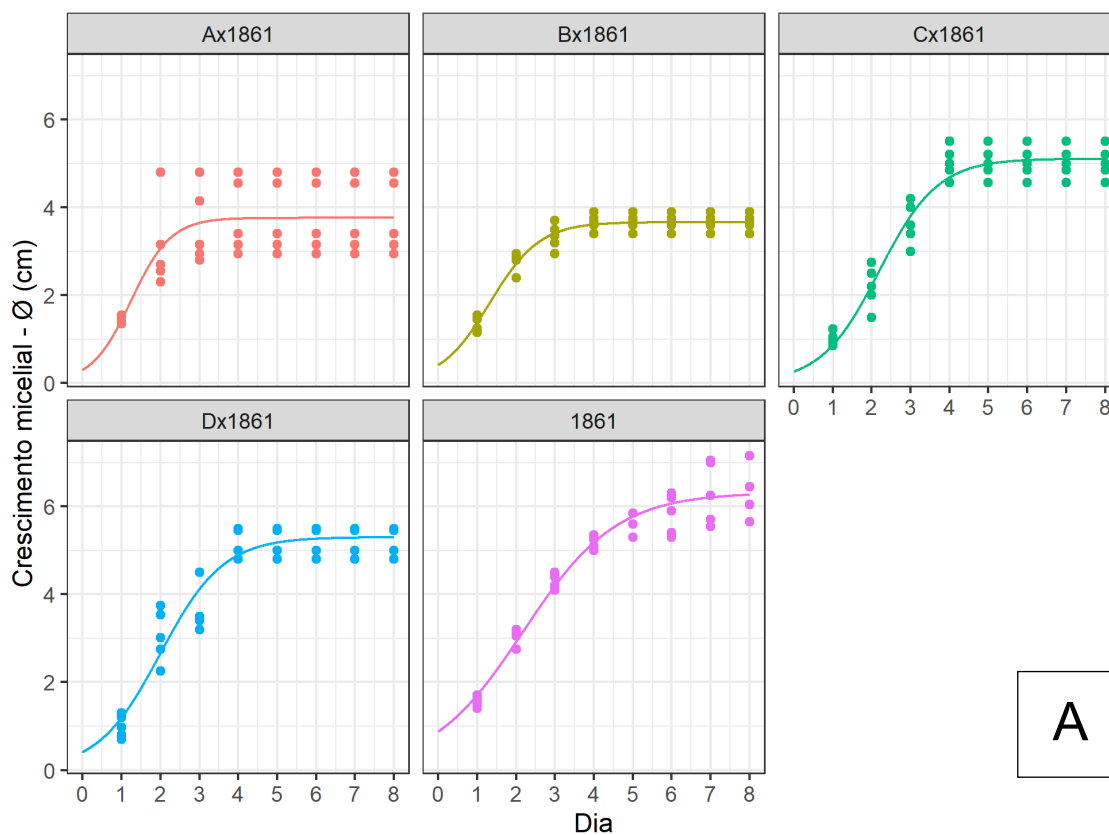
No confronto direto com *Bacillus amyloliquefaciens* é possível observar uma zona de inibição (Fotografia 11C), quando ocorre o contato dos micélios de *R. solani* com *Bacillus amyloliquefaciens*. Isso sugere que produziram metabólitos orgânicos voláteis e não voláteis (antibiose) que impediram o avanço do patógeno. Essa hipótese é corroborada em experimento realizado por Souto *et al.* (2004), onde uma cepa de *Bacillus* excretou metabólitos com atividade antifúngica contra o crescimento micelial de *R. solani* quando confrontados *in vitro*.

Tabela 2 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de Rhizoctonia para os tratamentos

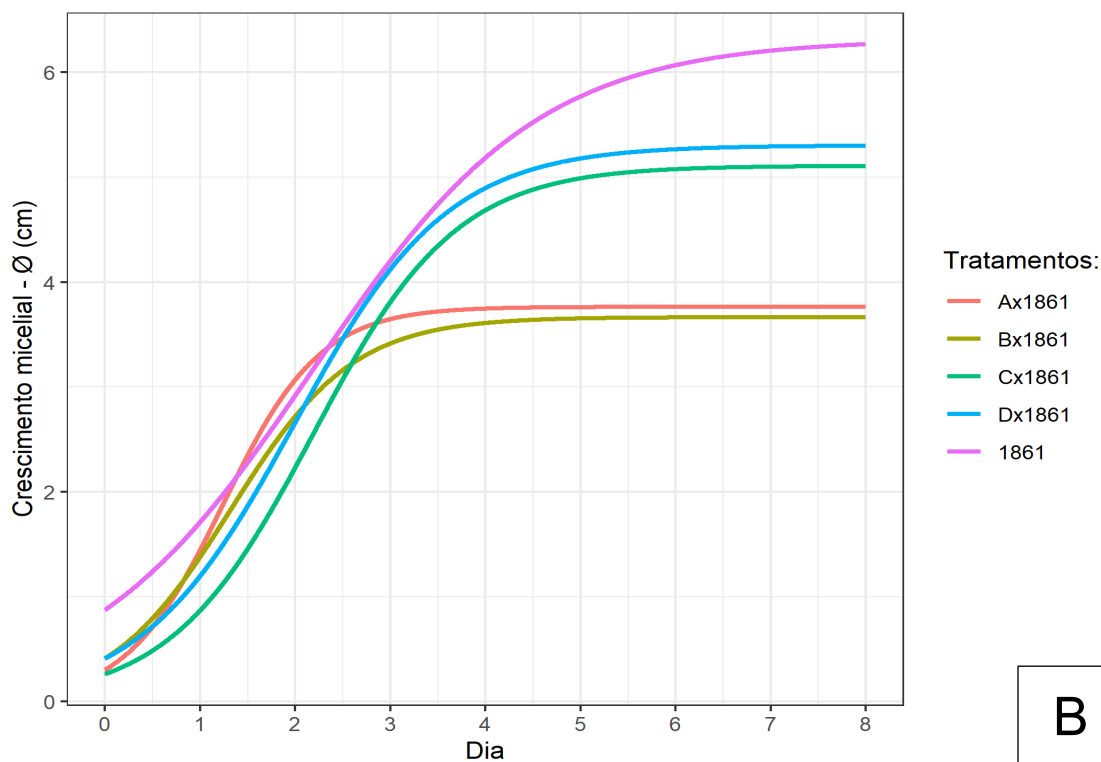
Parâmetro	Tratamento	Q(2,5)	Estimativa	Q(97,5)	*
β_1 (assíntota)	1861	6,0079	6,2794	6,551	a
	Ax1861	3,6079	3,7893	3,971	c
	Bx1861	3,4945	3,6858	3,877	c
	Cx1861	4,9128	5,1345	5,356	b
	Dx1861	5,1042	5,3243	5,544	b
β_2 (inflexão)	1861	1,9582	2,1792	2,400	a
	Ax1861	0,9574	1,1845	1,412	b
	Bx1861	1,0135	1,2720	1,530	b
	Cx1861	1,9589	2,1634	2,368	a
	Dx1861	1,7730	1,9749	2,177	a
β_3 (taxa de crescimento)	1861	0,7222	0,8767	1,031	b
	Ax1861	1,0606	1,5719	2,083	a
	Bx1861	0,9119	1,3453	1,779	ab
	Cx1861	0,9494	1,2119	1,474	ab
	Dx1861	0,9205	1,1630	1,406	ab

1861= *Rhizoctonia solani*; Ax1861= *Trichoderma harzianum* x *R. solani*; Bx1861= *Trichoderma asperellum* x *R. solani*; Cx1861= *Bacillus amyloliquefaciens* x *R. solani*; Dx1861= *Pardella*® x *R. solani*. *Estimativas dos tratamentos não seguidas por mesma letra na coluna, diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade de erro. Fonte: Autoria própria, 2023.

Gráfico 2 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de *Rhizoctonia*: (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano



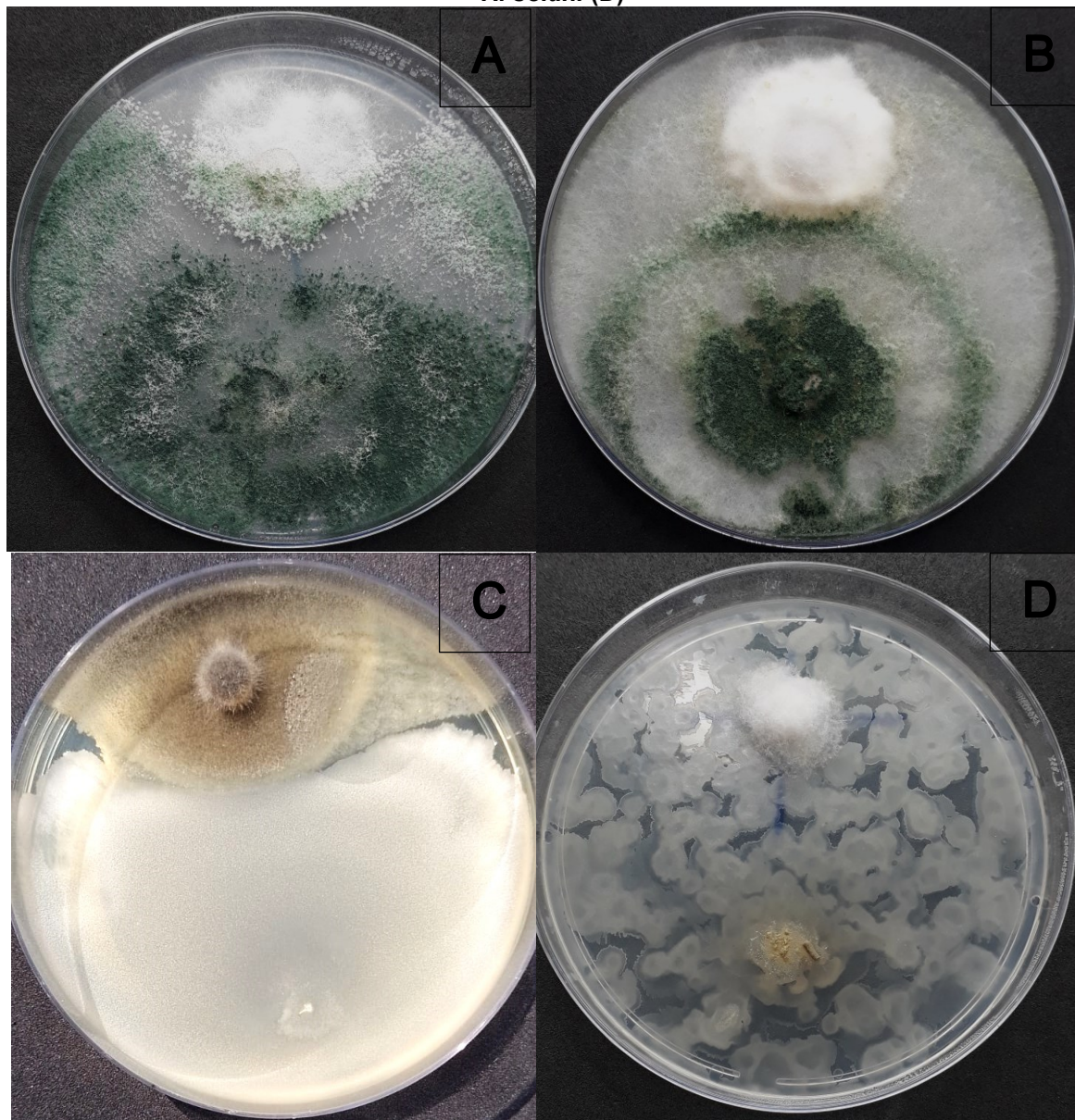
A



B

1861= *Rhizoctonia solani*; Ax1861= *Trichoderma harzianum* x *R. solani*; Bx1861= *Trichoderma asperellum* x *R. solani*; Cx1861= *Bacillus amyloliquefaciens* x *R. solani*; Dx1861= *Pardella*® x *R. solani*. Fonte: Autoria própria, 2023

Fotografia 11 - Pareamentos em placas de Petri® entre *Trichoderma harzianum* x *R. solani* (A), *Trichoderma asperellum* x *R. solani* (B), *Bacillus amyloliquefaciens* x *R. solani* (C), Pardella® x *R. solani* (D)



Fonte: Autoria própria, 2023

O crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* foi maior na testemunha quando comparado com os agentes de controle testados. Contudo o nível de controle variou entre os tratamentos. O *Bacillus amyloliquefaciens* se mostrou o agente antagonista de *Macrophomina phaseolina* mais eficiente (Cx1574), inibindo o crescimento micelial. O produto comercial Pardella® foi o segundo mais eficiente (Dx1574), seguido pelo *Trichoderma harzianum* (Ax1574) e *Trichoderma asperellum* (Bx1574). O tratamento com *Bacillus amyloliquefaciens* se diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, com maior valor de β_3 , indicando que reduziu a velocidade de crescimento de *Macrophomina phaseolina in vitro* (Tabela 3 e Gráfico 3).

A atividade antagonista de *B. amyloliquefaciens* contra *M. phaseolina* já foi relatada anteriormente. Duas cepas de *B. amyloliquefaciens* mostraram antagonismo contra *M. phaseolina* por inibir o crescimento micelial *in vitro*, com inibição de 62,8% a 66,8% aos 5 dias de incubação (RANGEL-MONTOYA *et al.*, 2022).

Bacillus amyloliquefaciens mostrou sinais de atividade antagonista *in vitro* contra *M. phaseolina* (Fotografia 12C), sendo que a colônia do patógeno ocupou uma pequena área da superfície da placa de Petri®, com formação de halo de inibição, indicando haver antagonismo. O mesmo perfil foi observado para o produto comercial Pardella® (Fotografia 12D). Por outro lado, *Trichoderma harzianum* e *T. asperellum* apresentaram menor potencial de controle do fungo patogênico, mas apresentaram inibição do crescimento de *M. phaseolina* por competição por nutrientes, quando pareada em meio de cultura (Fotografia 12A e B).

Isolados de *B. amyloliquefaciens*, produzem compostos voláteis e difusíveis que inibem o crescimento micelial de *M. phaseolina* e diminuem a produção de microescleródio (RANGEL-MONTOYA *et al.*, 2022). Entre os compostos difusíveis produzidos por *B. amyloliquefaciens* estão os lipopeptídeos como bacilomicina D, macrolactina, iturina A, surfactina e fengicina, os quais mostraram alta atividade antagônica contra *M. phaseolina* (TORRES *et al.*, 2016).

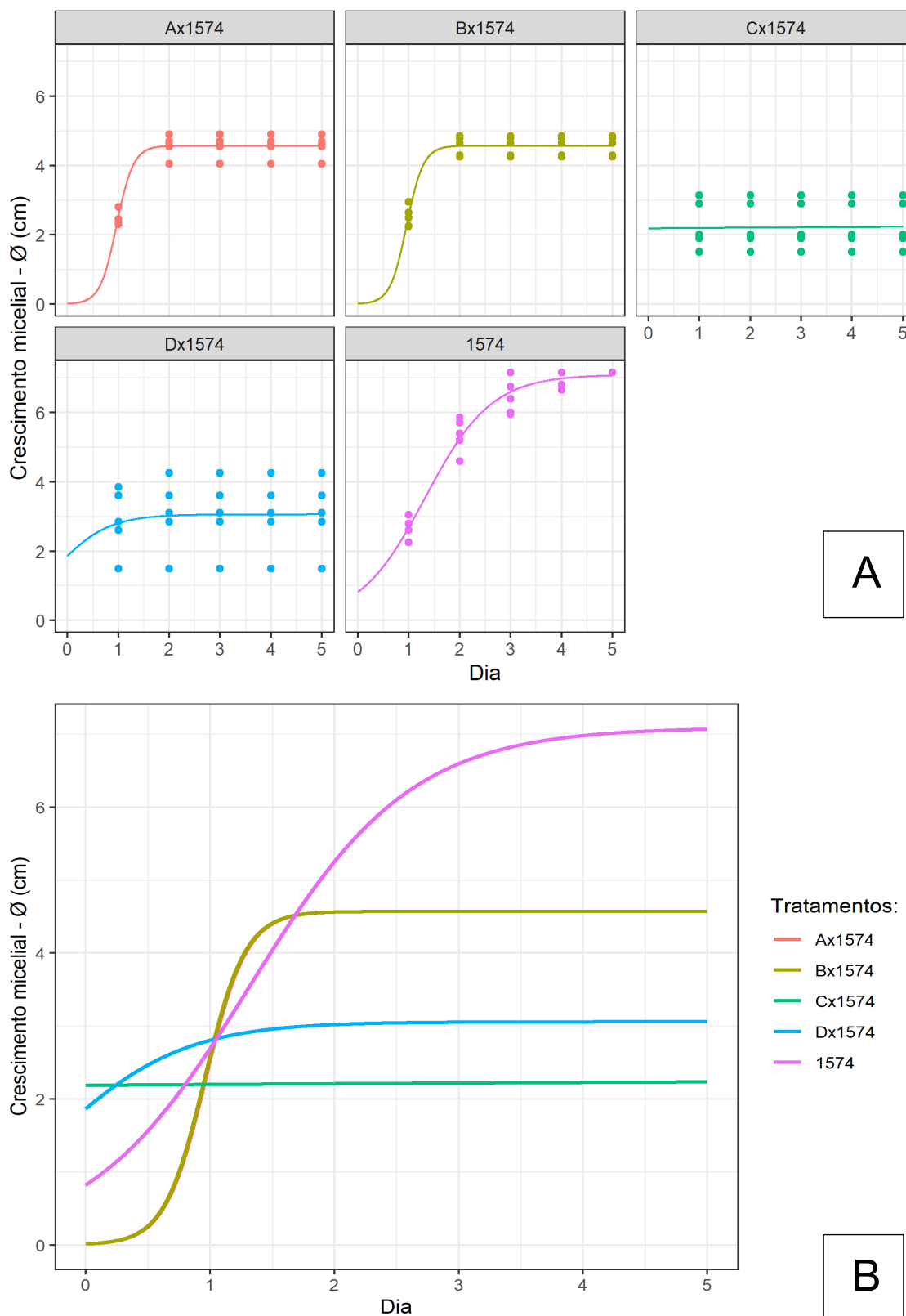
Tabela 3 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de *Macrophomina* para os tratamentos

Parâmetro	Tratamento	Q(2,5)	Estimativa	Q(97,5)	*
β_1 (assíntota)	1574	6,73014	7,06853	7,4069	a
	Ax1574	4,37610	4,64168	4,9073	b
	Bx1574	4,37428	4,63839	4,9025	b
	Cx1574	2,05771	2,29000	2,5223	d
	Dx1574	2,82621	3,06088	3,2956	c
β_2 (inflexão)	1574	1,16533	1,32109	1,4769	b
	Ax1574	0,69587	0,86924	1,0426	c
	Bx1574	0,67696	0,85030	1,0236	c
	Cx1574	-334470,66050	0,03838	334470,7373	a
	Dx1574	0,02093	0,30515	0,5894	d
β_3 (taxa de crescimento)	1574	1,25141	1,59882	1,9462	b
	Ax1574	1,41371	2,29888	3,1841	b
	Bx1574	1,42530	2,30804	3,1908	b
	Cx1574	-186271886,17230	21,37491	186271928,9221	a
	Dx1574	0,85827	3,98409	7,1099	b

1574=*Macrophomina phaseolina*; Ax1574= *Trichoderma harzianum* x *M. phaseolina*; Bx1574= *Trichoderma asperellum* x *M. phaseolina*; Cx1574= *Bacillus amyloliquefaciens* x *M. phaseolina*; Dx1574= Pardella® x *M. phaseolina*. *Estimativas dos tratamentos não seguidas por mesma letra na coluna, diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade de erro.

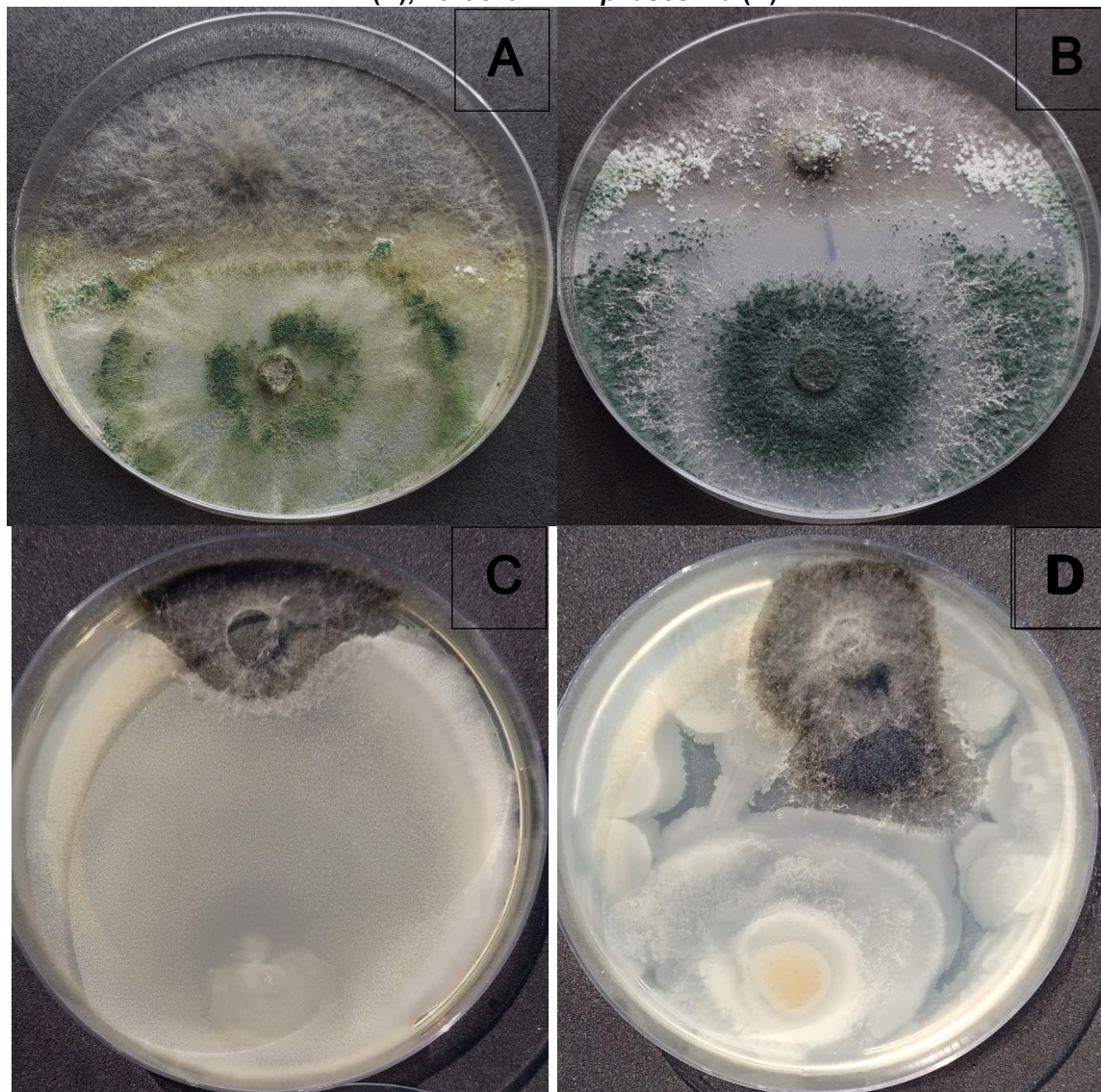
Fonte: Autoria própria, 2023

Gráfico 3 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de *Macrophomina*: (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano



1574=*Macrophomina phaseolina*; Ax1574= *Trichoderma harzianum* x *M. phaseolina*; Bx1574= *Trichoderma asperellum* x *M. phaseolina*; Cx1574= *Bacillus amyloliquefaciens* x *M. phaseolina*; Dx1574 *Pardella*® x *M. phaseolina*. Fonte: Autoria própria, 2023.

Fotografia 12 - Pareamentos em placas de Petri® entre *Trichoderma harzianum* x *M. phaseolina* (A), *Trichoderma asperellum* x *M. phaseolina* (B), *Bacillus amyloliquefaciens* x *M. phaseolina* (C), *Pardella*® x *M. phaseolina* (D)



Fonte: Autoria própria, 2023

T. harzianum (Ax1582) e *T. asperellum* (Bx1582) foram os tratamentos mais eficientes na redução do crescimento micelial de *Phomopsis longicolla* (Tabela 4 e Gráfico 4).

Apesar de poucos relatos na literatura sobre controle biológico de *Phomopsis longicolla*, a utilização do *Trichoderma* spp. se mostra uma abordagem promissora para o biocontrole da doença. Em experimento realizado no Vietnã, *Trichoderma* spp. apresentou eficiência antagônica de 81,8% contra *P. longicolla*, corroborando com os resultados obtidos no presente experimento (NGHIA; NHUT, 2020).

O fungo patogênico *P. longicolla* sofreu inibição por *T. harzianum* (Fotografia 13A) e *T. asperellum* (Fotografia 13B), sugerindo que estes se comportaram como bons competidores por espaço.

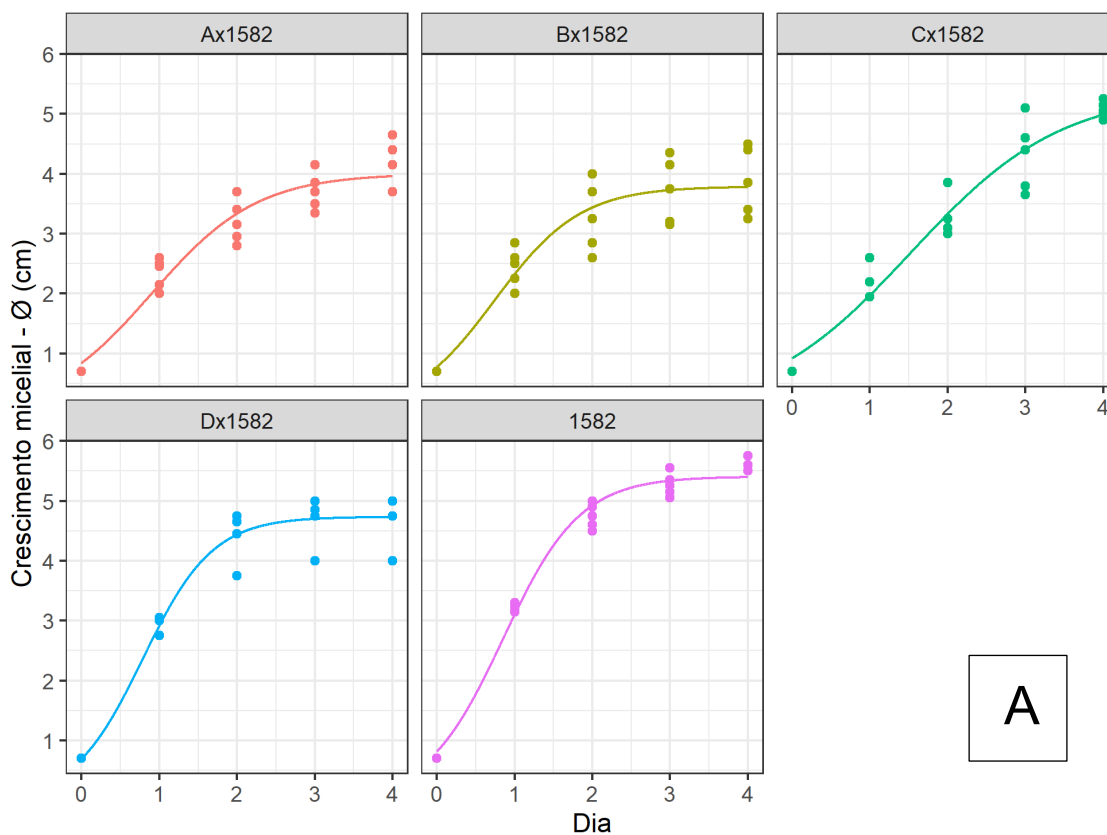
Esses resultados foram consistentes com as observações de (AHMED; SÁNCHEZ; CANDELA 2010). A inibição significativa do crescimento do patógeno por *Trichoderma* mostrou sua capacidade antagônica contra *P. longicolla*. No presente estudo, o rápido crescimento dos isolados de *Trichoderma* mostrou que sua alta capacidade de esporulação e competição lhes permitiu colonizar mais espaço na placa de Petri. Taxa de esporulação rápida e alta capacidade de colonização são as principais características de um excelente antagonista (HARMAN *et al.*, 2004), o que foi observado para *Trichoderma* nesse trabalho.

Tabela 4 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de *Phomopsis* para os tratamentos

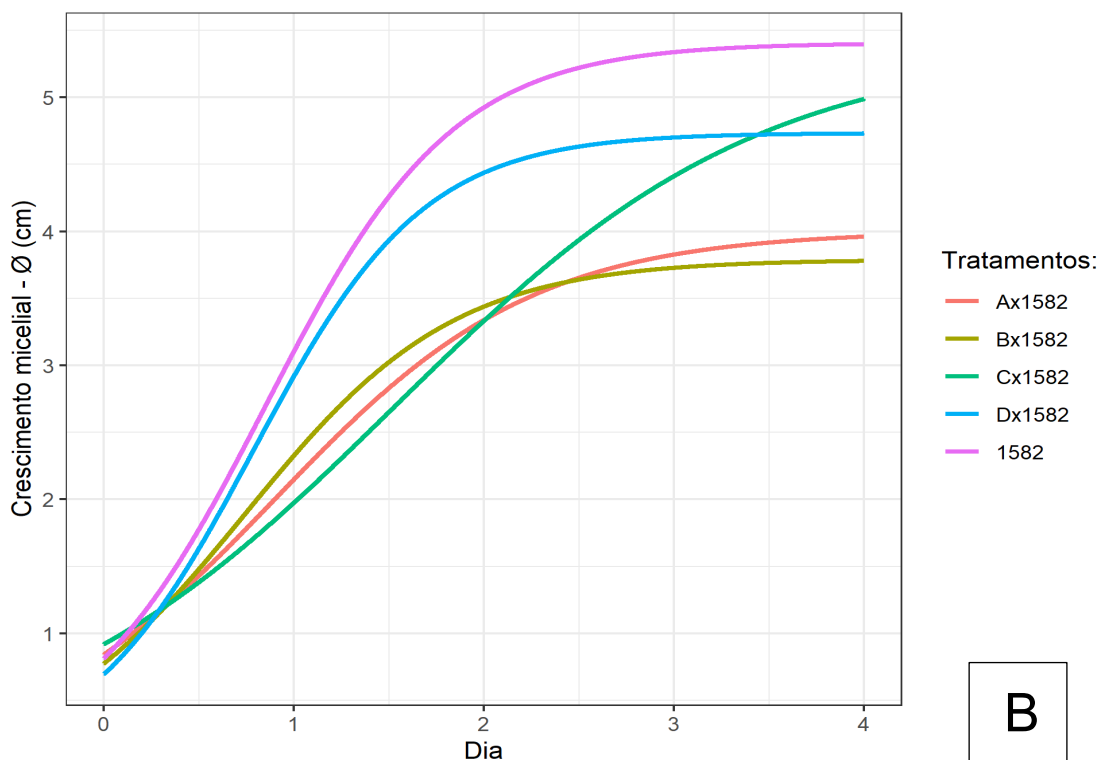
Parâmetro	Tratamento	Q(2,5)	Estimativa	Q(97,5)	*
β_1 (assíntota)	1582	5,1831	5,4049	5,6267	a
	Ax1582	3,7186	4,0012	4,2838	c
	Bx1582	3,5597	3,7886	4,0175	c
	Cx1582	4,8039	5,3737	5,9436	a
	Dx1582	4,5256	4,7330	4,9404	ab
β_2 (inflexão)	1582	0,7392	0,8508	0,9624	b
	Ax1582	0,6913	0,8969	1,1025	b
	Bx1582	0,5687	0,7427	0,9167	b
	Cx1582	1,2153	1,5239	1,8325	a
	Dx1582	0,6674	0,7854	0,9034	b
β_3 (taxa de crescimento)	1582	1,6030	2,0283	2,4535	a
	Ax1582	1,0502	1,4691	1,8880	ab
	Bx1582	1,2887	1,8210	2,3533	a
	Cx1582	0,7789	1,0333	1,2878	b
	Dx1582	1,7004	2,2344	2,7684	a

1582= *Phomopsis longicolla*; Ax1582= *Trichoderma harzianum* x *P. longicolla*; Bx1582= *Trichoderma asperellum* x *P. longicolla*; Cx1582= *Bacillus amyloliquefaciens* x *P. longicolla*; Dx1582= *Pardella*® x *P. longicolla*. *Estimativas dos tratamentos não seguidas por mesma letra na coluna, diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade de erro. Fonte: Autoria própria, 2023

Gráfico 4 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de *Phomopsis*: (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano



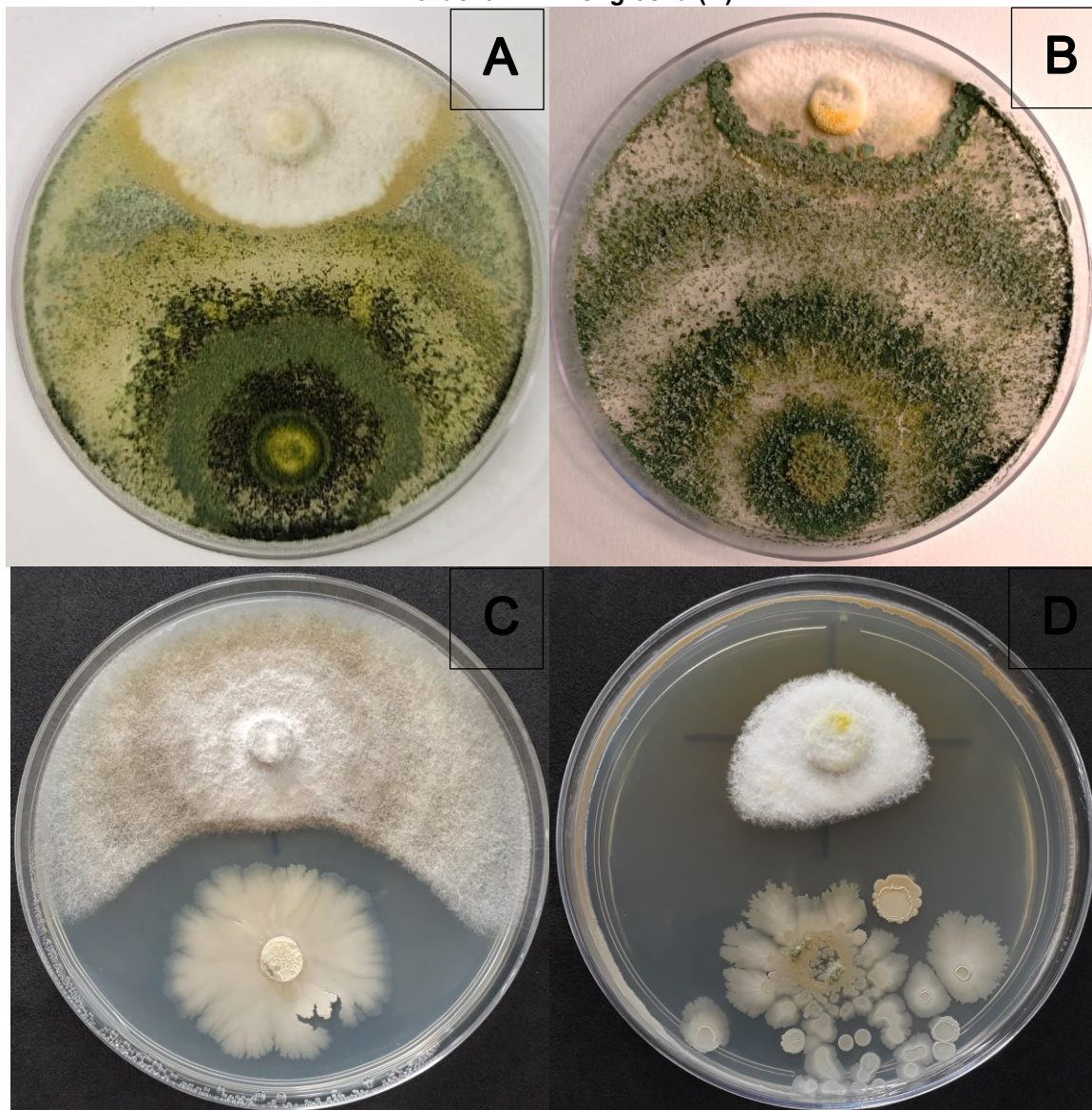
A



B

1582= *Phomopsis longicolla*; Ax1582= *Trichoderma harzianum* x *P. longicolla*; Bx1582= *Trichoderma asperellum* x *P. longicolla*; Cx1582= *Bacillus amyloliquefaciens* x *P. longicolla*; Dx1582= *Pardella*® x *P. longicolla*. Fonte: Autoria própria, 2023

Fotografia 13 - Pareamentos em placas de Petri® entre *Trichoderma harzianum* x *P. longicolla* (A), *Trichoderma asperellum* x *P. longicolla* (B), *Bacillus amyloliquefaciens* x *P. longicolla* (C), *Pardella*® x *P. longicolla* (D)



Fonte: Autoria própria, 2023

O produto comercial *Pardella*® (Dx25) e o *Bacillus amyloliquefaciens* (Cx25) apresentaram o melhor desempenho no controle de *Fusarium tucumaniae*, porém este último não diferiu estatisticamente dos tratamentos com *Trichoderma harzianum* (Ax25) e *Trichoderma asperellum* (Bx25) (Tabela 5 e Gráfico 5).

A inibição do crescimento micelial de *F. tucumaniae* pelo produto comercial *Pardella*® e pelo *Bacillus amyloliquefaciens* (Fotografia 14), provavelmente esteja relacionada à capacidade de produção de substâncias antibióticas por esses antagonistas, o que afetou o desenvolvimento do patógeno. Campbell (1989) relatou

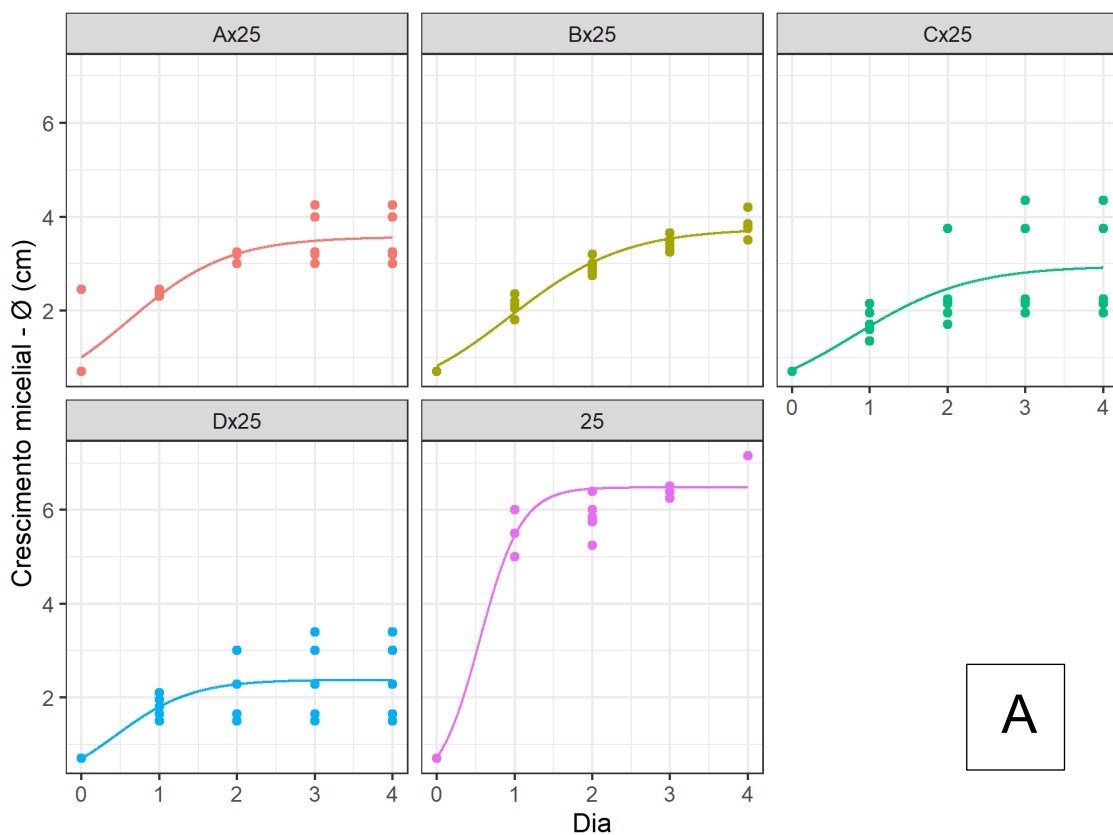
alguns efeitos causados por substâncias antibióticas liberadas por antagonistas como redução ou paralisia do crescimento micelial e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções nas hifas e plasmólise.

Tabela 5 - Estimativas e intervalos de confiança de 95% probabilidade, onde Q(2,5) é o limite inferior e Q(97,5) o superior, para o modelo logístico de crescimento [Verhulst] micelial radial de *Fusarium* para os tratamentos

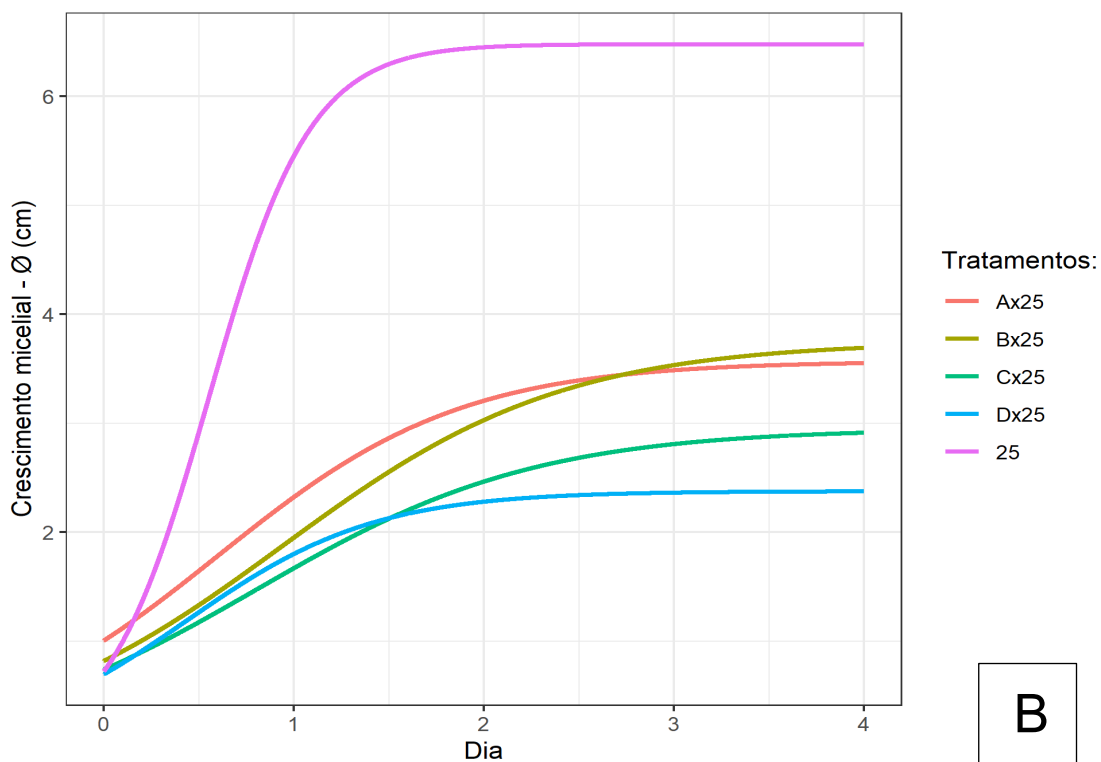
Parâmetro	Tratamento	Q(2,5)	Estimativa	Q(97,5)	*
β_1 (assíntota)	25	6,19888	6,4794	6,7599	a
	Ax25	3,17689	3,5691	3,9612	b
	Bx25	3,26103	3,7498	4,2386	b
	Cx25	2,48359	2,9503	3,4169	bc
	Dx25	2,05376	2,3756	2,6974	c
β_2 (inflexão)	25	0,42292	0,5521	0,6813	a
	Ax25	0,25492	0,5984	0,9418	a
	Bx25	0,55651	0,9381	1,3197	a
	Cx25	0,33042	0,8021	1,2738	a
	Dx25	0,02676	0,4329	0,8391	a
β_3 (taxa de crescimento)	25	2,78901	3,7478	4,7065	a
	Ax25	0,76075	1,5586	2,3565	b
	Bx25	0,69095	1,3560	2,0210	b
	Cx25	0,49570	1,3590	2,2223	b
	Dx25	0,51204	2,0222	3,5323	ab

25= *Fusarium tucumaniae*; Ax25= *Trichoderma harzianum* x *F. tucumaniae*; Bx25= *Trichoderma asperellum* x *F. tucumaniae*; Cx25= *Bacillus amyloliquefaciens* x *F. tucumaniae*; Dx25= *Pardella*® x *F. tucumaniae*. *Estimativas dos tratamentos não seguidas por mesma letra na coluna, diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade de erro. Fonte: Autoria própria, 2023.

Gráfico 5 - Curvas de crescimento micelial radial ($\emptyset$, mm) de *Fusarium*: (A) Curvas e dispersão dos dados por tratamento, e (B) Curvas no mesmo plano cartesiano



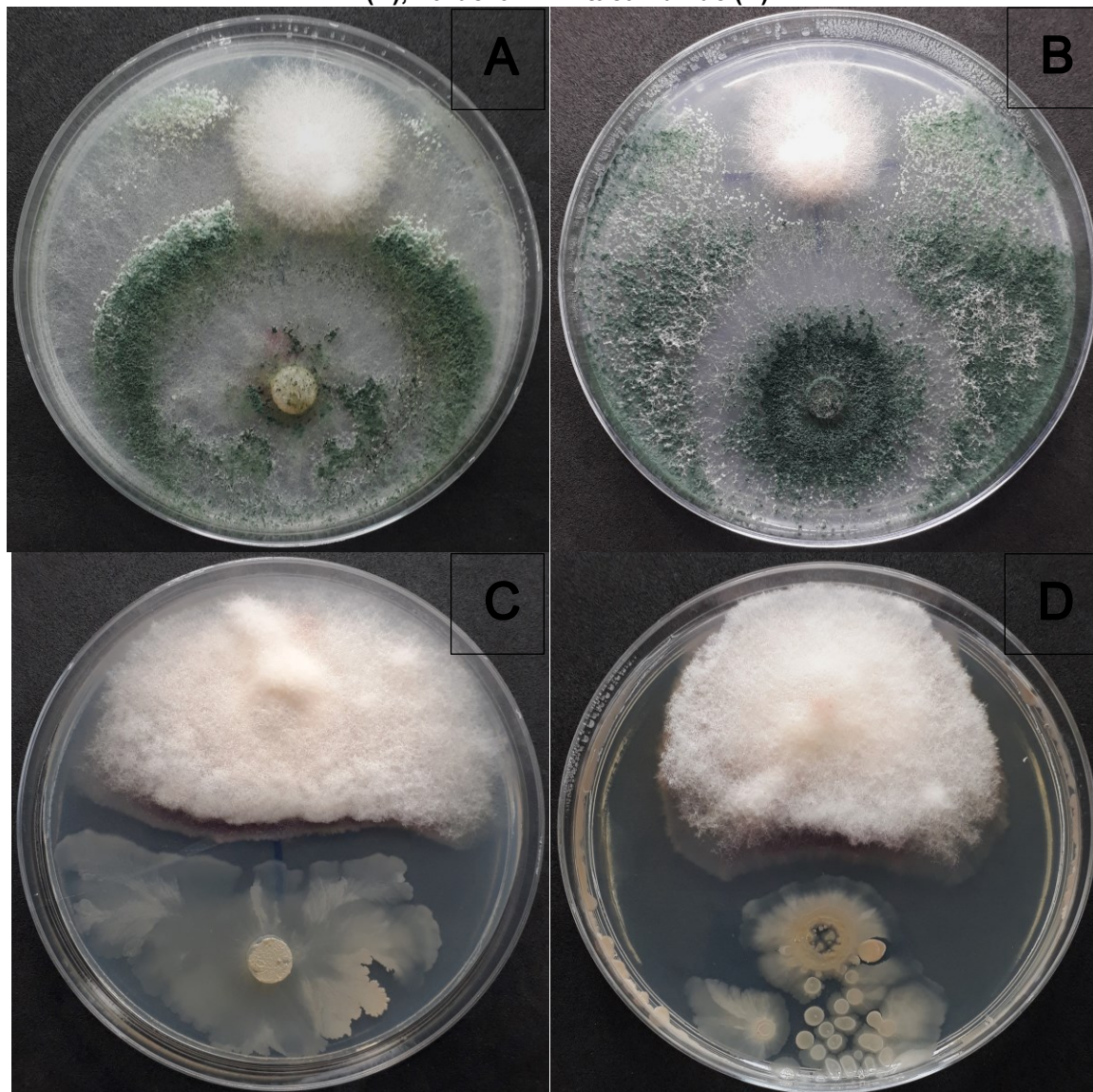
A



B

25= *Fusarium tucumaniae*; Ax25= *Trichoderma harzianum* x *F. tucumaniae*; Bx25= *Trichoderma asperellum* x *F. tucumaniae*; Cx25= *Bacillus amyloliquefaciens* x *F. tucumaniae*; Dx25= *Pardella*® x *F. tucumaniae*. Fonte: Autoria própria, 2023

Fotografia 14 - Pareamentos em placas de Petri® entre *Trichoderma harzianum* x *F. tucumaniae* (A), *Trichoderma asperellum* x *F. tucumaniae* (B), *Bacillus amyloliquefaciens* x *F. tucumaniae* (C), *Pardella*® x *F. tucumaniae* (D)



Fonte: Autoria própria, 2023

4.2 Análise de microscopia eletrônica das estruturas dos patógenos versus biológicos

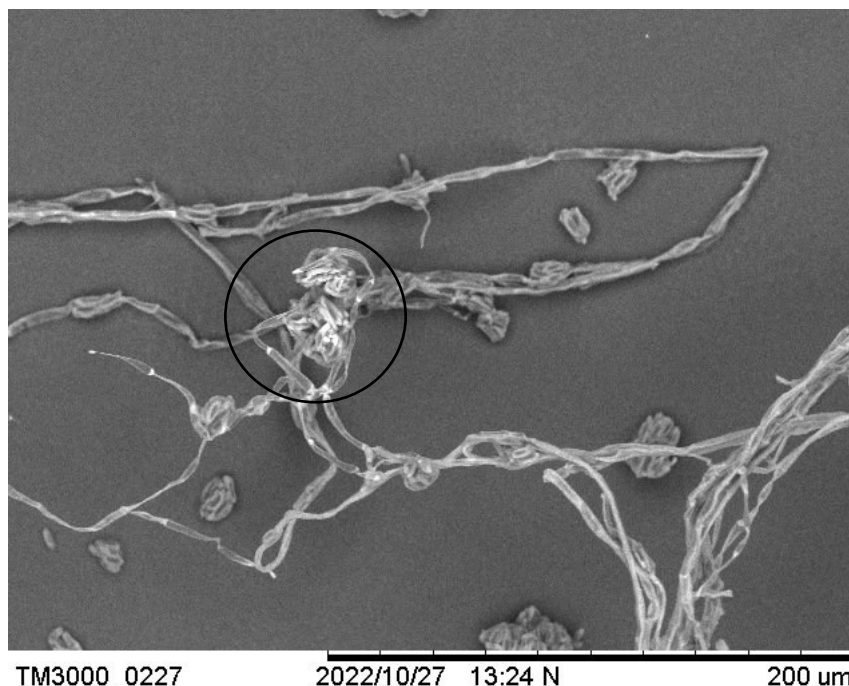
No presente estudo, a microscopia eletrônica permitiu entender as interações *in vitro* entre os agentes de controle biológico e fungos patogênicos. A técnica de microscopia eletrônica representa uma ferramenta importante para melhor compreensão das interações endofíticas e oferece vantagens únicas como alta resolução e grande profundidade de campo (PAMPHILE *et al.*, 2008).

Os agentes de controle biológico mostraram capacidade de ocupar espaços na placa de Petri com meio BDA e/ou de crescer sobre o micélio do patógeno. A zona de contato entre patógenos e agentes de controle biológicos foi observada microscopicamente. Devido às limitações do equipamento utilizado, foi possível documentar as interações entre hifas de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium tucumaniae*, *Trichoderma asperellum* sobre *Rhizoctonia solani* e o produto comercial Pardella® versus *Rhizoctonia solani*.

A microscopia eletrônica de varredura das interações das hifas mostrou que o micoparasitismo do isolado de *T. harzianum* contra *F. tucumaniae*. O *Trichoderma* foi capaz de restringir o crescimento do fungo patogênico, onde o agente de controle biológico se mostrou enrolado em torno de hifas de *Fusarium tucumaniae* (Figura 4).

O *Trichoderma* possui a capacidade de se enrolar ao redor das hifas de outros fungos e, assim, impedir o crescimento e desenvolvimento desses patógenos. Esse mecanismo é uma estratégia competitiva que permite que o *Trichoderma* ocupe espaço e nutrientes que seriam usados por fungos patogênicos. Esse evento de enovelamento das hifas é desencadeado por proteínas adesivas conhecidas como lectinas e hidrofobinas, presentes na parede celular do patógeno (RIBEIRO, 2017). Embora seja uma ocorrência comum, inclusive reportado para outros fungos, como *S. sclerotiorum* (GOMES, 2015), esse enovelamento não se limita ao processo de micoparasitismo. Além do enovelamento físico, o *Trichoderma* também libera metabólitos secundários com propriedades antifúngicas e enzimas de degradação da parede celular do fungo (RIBEIRO, 2017). Inclusive no teste de pareamento direto foi possível verificar que a colônia do patógeno ocupou uma pequena área da superfície da placa de Petri (Fotografia 14A).

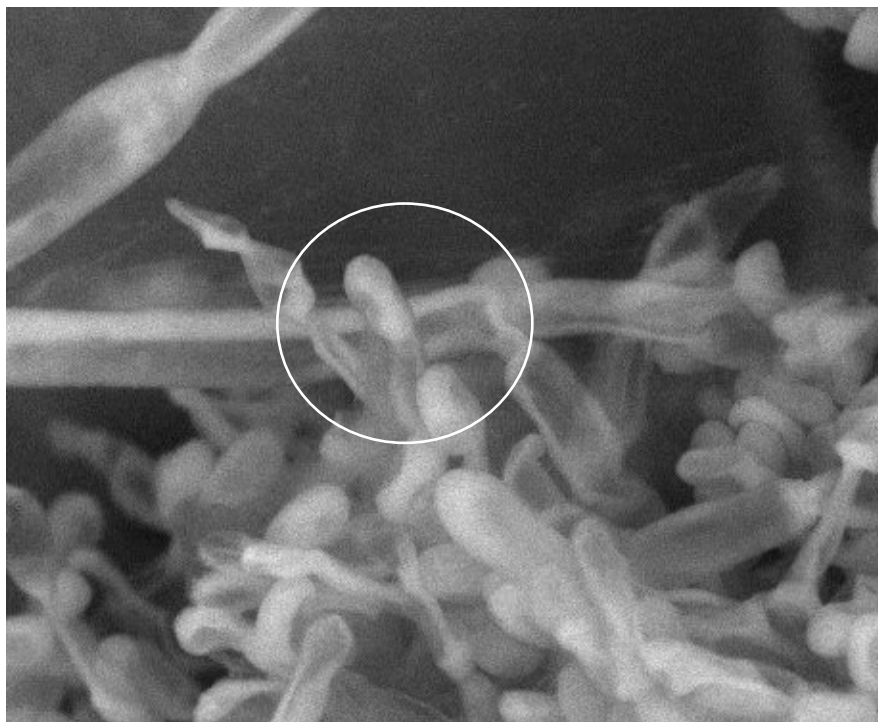
Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium tucumaniae*



Fonte: Autoria própria, 2023

Em relação à interação entre o patógeno *Rhizoctonia solani* e o antagonista *T. asperellum* observou-se helicoidização das hifas endofíticas, que envolveram as hifas de *R. solani*, sugerindo uma inibição mecânica por estrangulamento (Figura 5). Esses resultados corroboram com relatos da literatura sobre interações de *Trichoderma* com *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Ceratocystis paradoxa* e *S. sclerotiorum* (EZIASHI; OMAMOR; ODIGIE, 2007; LOUZADA *et al.*, 2009; VILLAMIZAR-GALLARDO; ORTÍZ-RODRIGUEZ; ESCOBAR, 2017; JULIATTI *et al.*, 2019; SONKAR, 2019). Esse processo de estrangulamento indica o comportamento hiperparasitário do *Trichoderma*, no qual esse fungo detecta as hifas do patógeno devido a estímulos químicos produzidos pela própria hifa hospedeira (JULIATTI *et al.*, 2019; SONKAR, 2019). Inclusive, na placa de Petri do teste de pareamento direto foi possível verificar que o micélio de *T. asperellum* ocupou quase todo o espaço disponível na placa, sobrepondo o fungo patogênico (Fotografia 11B)

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica de *Trichoderma asperellum* sobre *Rhizoctonia solani*



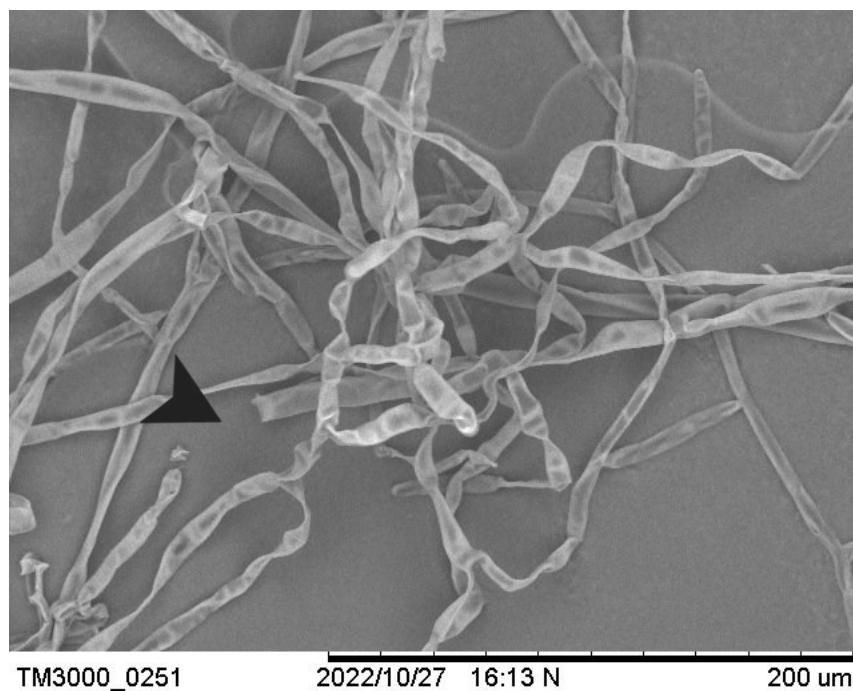
Fonte: Autoria própria, 2023

Os resultados do presente estudo sugerem que o produto comercial Pardella® apresentou efeitos inibitórios no crescimento e morfologia das colônias de *Rhizoctonia solani*, por meio do afinamento de hifas e ruptura de septos (Figura 6). Porém, a zona de inibição observada pela microscopia eletrônica demonstrou nenhum contato hifal (Figura 6), sugerindo que a ação antagonista pode ter resultado da produção de compostos voláteis pelos agentes de controles biológicos presentes na formulação do produto Pardella®. Essa hipótese é apoiada pelo resultado do teste de pareamento direto, onde identificou-se a inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* possivelmente em função dos compostos antifúngicos secretados pelos agentes de controle biológico presentes no Pardella® (Fitografia 11D).

Resultados semelhantes foram obtidos em experimento que avaliou a espessura de hifas de *S. sclerotiorum* após exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma spp.*, onde os resultados mostraram hifas mais finas em relação às hifas do patógeno no tratamento controle (micélios não expostos a compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma spp.*), com redução de espessura de aproximadamente 31% (SILVA et al., 2019). Alterações nas hifas de *S. sclerotiorum* também foram relatadas com compostos orgânicos voláteis de seis diferentes

rizobactérias, com hifas mais finas quando comparado ao tratamento controle (GIORGIO *et al.*, 2015), corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica do produto comercial Pardella® sobre *Rhizoctonia solani*



Fonte: Autoria própria, 2023

Portanto, os resultados mostraram que o produto comercial Pardella® foi eficaz na inibição do crescimento de *M. solani*, o que possivelmente foi atribuído à liberação de compostos capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno, conforme verificado no teste de pareamento direto (Fotografia 11D).

4.3 Germinação da soja na presença de agente de controle biológico

A análise da variância evidenciou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos somente para a variável massa seca (Tabela 6). A ausência de efeito dos agentes de controle biológico (produto comercial Pardella®), na germinação das sementes, mostra que apesar de não ter promovido incrementos, não acarretou em prejuízos aos parâmetros de qualidade fisiológica das sementes de soja.

Tabela 6 - Graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM), coeficiente de variação (CV%) e médias da análise da variância do delineamento inteiramente casualizado, para os parâmetros de qualidade fisiológica de sementes de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico

Causa da Variação	GL	QM					
		CIG	CFGN	CFGa	CPA	CR	MS
Tratamento	1	0,001 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,001 ^{ns}	3,61 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,26 *
Resíduo	6	0,003	0,003	0,003	0,64	0,25	0,015
Média		43,1	43,1	6,87	11,29	19,51	1,91
CV(%)		7,19	7,19	45,13	7,13	2,59	6,57

CIG: contagem inicial de germinação; CFGN: Contagem final de germinação de plântulas normais; CFGa: Contagem final de germinação de plântulas anormais; CPA: comprimento de parte aérea; CR: comprimento de raiz (cm); MS: massa seca (g). *Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F ($p \leq 0,05$), ^{ns}Não significativo. Fonte: Autoria própria, 2023

A testemunha apresentou maior massa seca (2,10 g), quando comparada com o tratamento com agente de controle biológico (1,73 g), conforme apresentado na Tabela 7. Uma hipótese para justificar esse resultado é que os *Trichoderma* spp. presentes no Pardella®, necessitam de recursos para seu desenvolvimento, principalmente carbono, nitrogênio e ferro, o que não foi fornecido no substrato utilizado no experimento, o papel Germitest® umedecido com água destilada. Isso porque o crescimento do *Trichoderma* depende da entrada de energia e nutrição, os quais geralmente são obtidos por meio da decomposição da matéria orgânica no solo, o qual o fungo utiliza para suas atividades e propagação da população (PRASETYO *et al.*, 2019).

Tabela 7 - Médias da variável massa seca (MS, g) de sementes de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico

Tratamento	Massa Seca (MS, g)
Testemunha	2,10 a
Agente de controle biológico	1,74 b

*Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria, 2023.

Para avaliar os diferentes níveis de vigor das sementes (alto, médio e baixo), se apresentam os Gráficos box-plot 6 e 7. Tais representações visuais fornecem uma visão abrangente da distribuição dos dados, destacando a mediana, os quartis, a amplitude interquartil e possíveis valores discrepantes; tornando-se uma ferramenta útil para identificar padrões e discrepâncias nos dados. Em particular, os Gráficos 6 e 7 sugerem que não há diferenças significativas para o vigor (número e percentual de plântulas) o que se confirma com o teste de hipótese de Kruskal-Wallis, apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultado do Teste de Kruskal-Wallis para os níveis de vigor (alto, médio e baixo) considerando a frequência absoluta (número de plântulas) e relativa (%), de sementes de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico

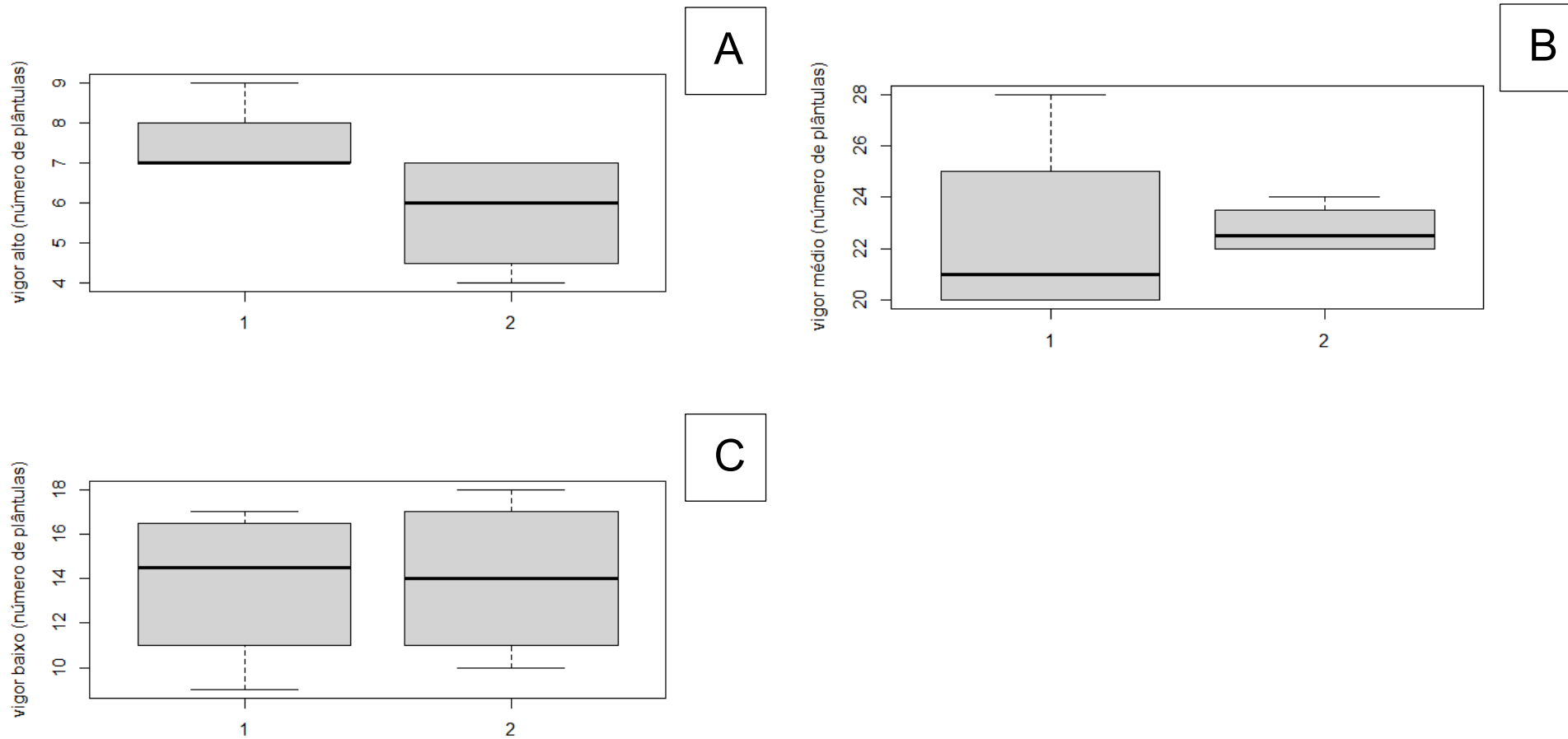
Informações do teste	Níveis da variável vigor					
	Alto	Médio	Baixo	Alto (%)	Médio (%)	Baixo (%)
Qui-quadrado	2,7344	0,7975	0,0211	2,1875	0,5271	0,0000
p-valor	0,0981	0,3719	0,8845	0,1391	0,4678	1,0000

Fonte: Autoria própria, 2023

A partir da Tabela 8, conclui-se que as plântulas de soja não apresentaram diferenças significativas quanto ao vigor, indicando que a aplicação do agente de controle biológico não influenciou na classificação de vigor das plântulas. Assim, sugere-se que a ausência de resultados significativos (Tabela 8) na germinação de sementes e índice de vigor de plântulas no ensaio em condições de laboratório, usando o método de papel Germitest®, pode estar relacionada ao fato do ensaio considerar somente a fase inicial da planta em condições controladas, fator distinto de quando ocorre as relações biológicas nos cultivos à campo, contemplando os estresses bióticos e abióticos.

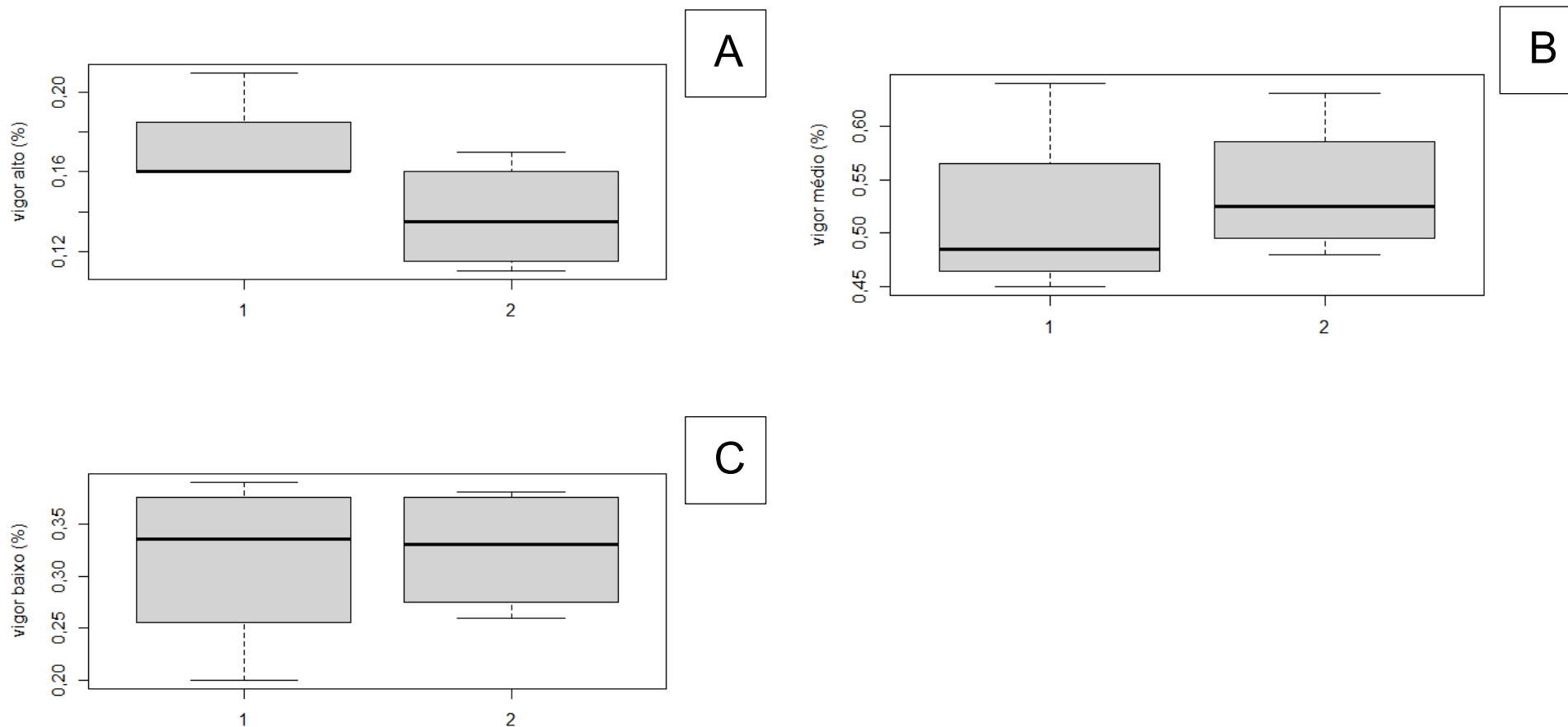
Silva *et al.* (2022) avaliando a germinação e o vigor de mudas de algodoeiro após tratamento de sementes com *Trichoderma*, obtiveram resultados que corroboram esse cenário. No teste conduzido em laboratório, o tratamento de sementes com diferentes concentrações de *Trichoderma asperelloides* e *T. lentiforme* não apresentaram diferenças significativas para germinação de sementes e vigor inicial de mudas de algodoeiro, quando comparado ao controle.

Gráfico 6 - Box-plot dos níveis de vigor (A) alto, (B) médio e (C) baixo de sementes de soja tratadas com agente de controle biológico considerando a frequência absoluta (número de plântulas) para os tratamentos: (1) testemunha/controle e (2) agente de controle biológico



Fonte: Autoria própria, 2023

Gráfico 7 - Box-plot dos níveis de vigor (A) alto, (B) médio e (C) baixo de sementes de soja tratadas com agente de controle biológico considerando a frequência relativa (%) para os tratamentos: (1) testemunha/controle e (2) agente de controle biológico



Fonte: Autoria própria, 2023

4.4 Performance fisiológica de plantas de soja na presença de agente de controle biológico

O produto comercial a base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*, foi testado quanto à sua capacidade de promover o crescimento da soja em vasos (tubo PVC) e condições ambientais naturais (Fotografia 4). E, nas condições utilizadas neste trabalho, o emprego do produto comercial Pardella® no tratamento de sementes não favoreceu nenhuma variável de desempenho em relação à testemunha (Tabela 9).

No Gráfico 8, ao observar os box-plots das variáveis respostas observadas — (A) comprimento da parte aérea (cm), (B) comprimento da raiz (cm), (C) massa fresca da parte aérea (cm), (D) massa fresca da raiz (g), (E) volume da raiz (mL), (F) massa seca da parte aérea (g), e (G) massa seca da raiz (g) — em relação aos tratamentos (1) testemunha/controle e (2) agente de controle biológico, podemos notar que as caixas interquartis que representam a distribuição dos dados são muito semelhantes em tamanho e forma. Essa semelhança sugere que a variabilidade nos dados não é significativamente diferente entre os dois tratamentos, o que se confirma com o teste de Kruskal-Wallis apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultado do Teste de Kruskal-Wallis para comprimento da parte aérea (CPA, m), comprimento da raiz (CR, m), massa fresca da parte aérea (MFPA, g), massa fresca da raiz (MFR, g), volume da raiz (VR, mL), massa seca da parte aérea (MSPA, g), e massa seca da raiz (MSR, g) de plantas de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico

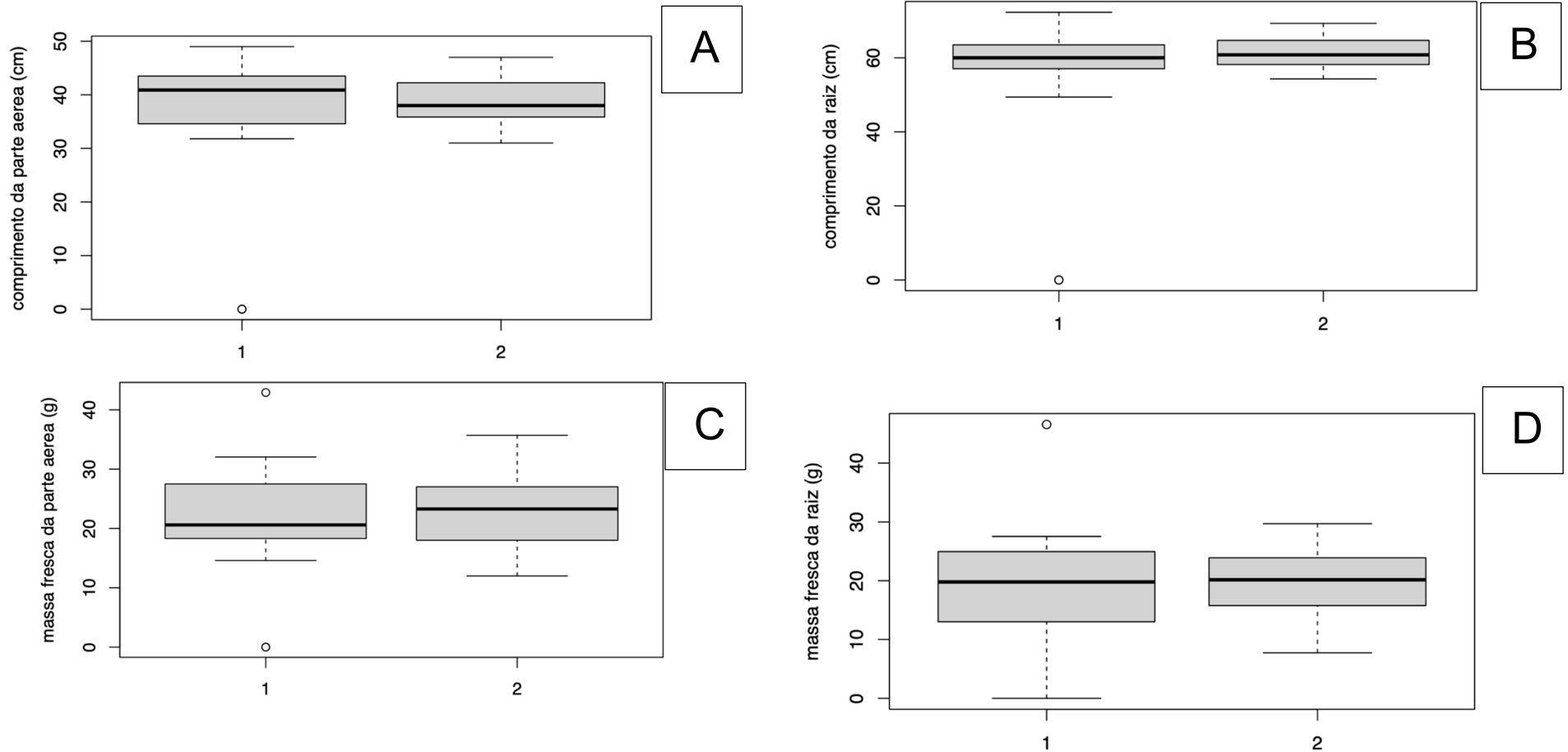
Informações do teste	Variáveis						
	CPA	CR	MFPA	MFR	VR	MSPA	MSR
Qui-quadrado	0,37064	0,26444	0,18735	0,026344	1,3463	0,63689	0,14348
p-valor	0,5427	0,6071	0,6651	0,8711	0,2459	0,4248	0,7048

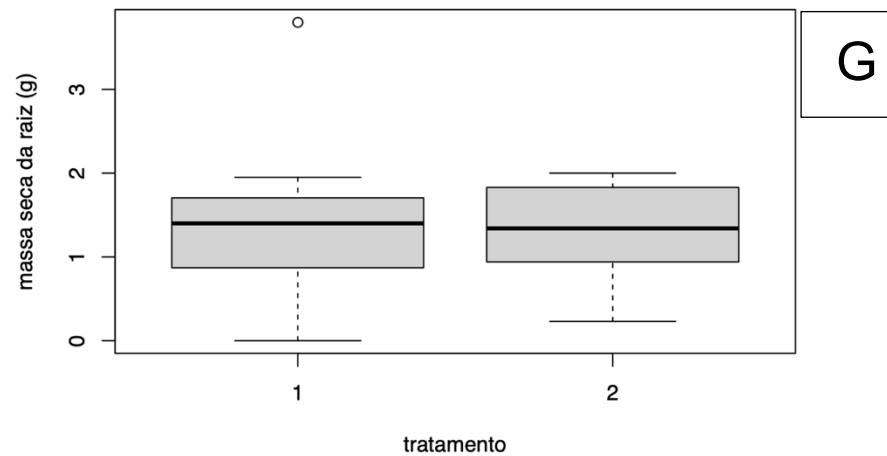
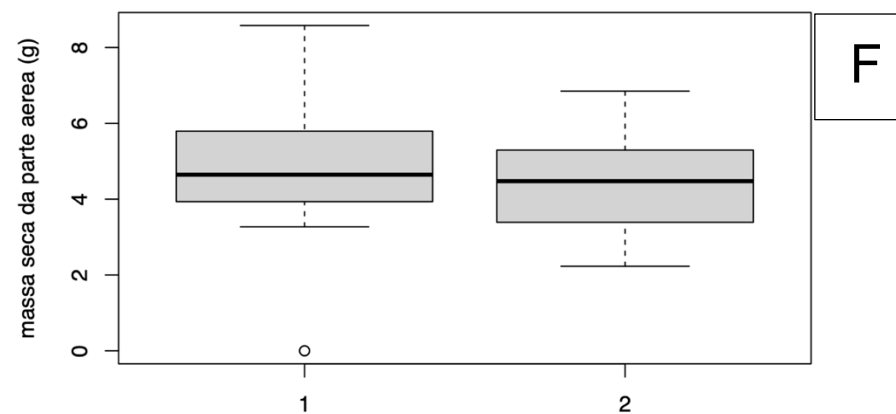
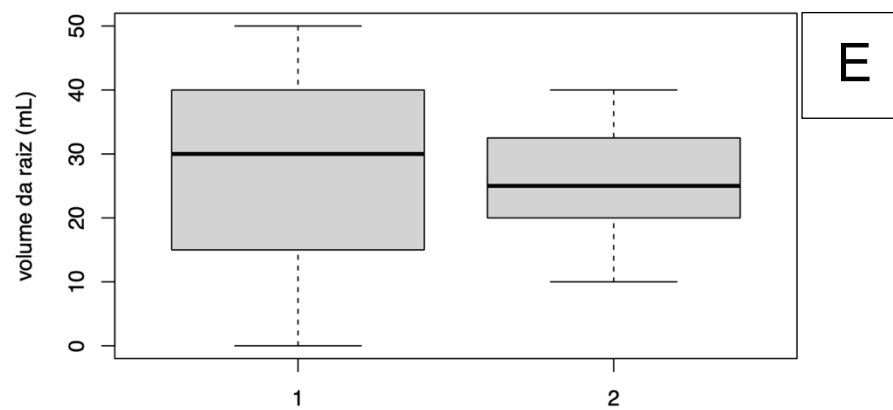
Fonte: Autoria própria, 2023

A hipótese para explicar esse resultado (Tabela 9) é que os agentes biológicos, promovem ganhos no decorrer da cultura, sendo expressados na fase final, com ganhos em produtividade, conforme relatado por Choi *et al.*, (2022), no entanto, esse trabalho limitou-se ao estágio fenológico V6.

Como limitação do experimento cita-se a ausência de avaliações de produtividade e seus componentes, a fim de verificar se a aplicação dos agentes de controle biológico promove incrementos de produtividade na cultura da soja.

Gráfico 8 - Box-plot das variáveis respostas: (A) comprimento da parte aérea (cm); (B) comprimento da raiz (cm); (C) massa fresca da parte aérea (cm); (D) massa fresca da raiz (g); (E) volume da raiz (mL); (F) massa seca da parte aérea (g); e (G) massa seca da raiz (g) para os tratamentos: (1) testemunha/controle e (2) agente de controle biológico





Fonte: Autoria própria, 2023

4.5 Estudo do potencial de uso de agente de controle biológico sobre o oídio na soja

A aplicação dos agentes de biocontrole não resultou em supressão dos sintomas foliares do oídio na soja, mas houve efeito significativo dos tempos de avaliações na severidade da doença (Tabela 10 e Tabela 11). Também não foi observada interação significativa entre os tratamentos (testemunha e agente de controle biológico) os tempos ou datas de avaliação (Tabela 10).

Tabela 10 - Graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM) e coeficiente de variação (CV%) da análise da variância do experimento em parcelas subdivididas no tempo em blocos casualizados, para o número total de folhas por planta (NTFP), número total de folhas com oídio (NTFO), percentual de folhas com oídio (NTFO%), e número total de manchas de oídio (NTMO) em plantas de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico

Causa de variação	GL	QM			
		NTFP	NTFO	NTFO%	NTMO
Tratamento	1	170,41 ^{ns}	83,33 ^{ns}	0,010 ^{ns}	6,229 ^{ns}
Bloco	9	157,58*	52,61 ^{ns}	0,041 ^{ns}	24,524 ^{ns}
Tempo de avaliação	2	684,78*	1749,36*	1,097*	296,40*
Tratamento x Tempo	2	18,96 ^{ns}	27,36 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,529 ^{ns}
CV1(%)		21,15	62,14	63,51	115,53
CV2(%)		15,78	26,21	20,70	73,40%

^{ns}Não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F; *Significativo em nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F; CV1: coeficiente de variação entre tratamentos; CV2: coeficiente de variação entre datas de avaliação. Fonte: Autoria própria, 2023

A ausência de efeito do agente de controle biológico sobre o oídio na soja em experimento em vasos sob condição de casa de vegetação, pode estar relacionada ao fato de que foi realizada apenas uma pulverização foliar do produto. Rossi e Pattori (2009) apresentam resultados em que a eficácia de *Trichoderma* aumentou quando o número de aplicações aumentou de duas para três. Em tomateiro, pulverização semanal, durante 10 semanas, com *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium spp.* diminui a incidência de mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* (STUMPF; PRATES, 2005). Portanto, um maior número de aplicações poderia ter influenciado na eficiência do controle de *Erysiphe difusa* pelo agente de biocontrole.

Outra questão que pode ter influenciado o resultado é sobrevivência dos agentes de controle biológico após a aplicação, devido a umidade do ambiente. No presente experimento, a aplicação do produto Pardella® ocorreu no estágio V5 da soja, sendo que ainda não havia sintomas da doença, atuando como uma aplicação preventiva. Contudo a temperatura da casa de vegetação se encontrava acima de

30°C e a umidade baixa, condições favoráveis para o oídio, no entanto, desfavoráveis para os agentes biológicos, o que pode ter impossibilitado a sobrevivência e multiplicação dos agentes biológicos até o surgimento do *Erysiphe difusa*, o qual ocorreu em V8, visto que para *Trichoderma* spp., a temperatura ideal varia de 27 a 30°C (CHOI et al., 2003).

Portanto, estudos futuros devem testar mais de uma aplicação, com controle de temperatura e umidade, e também em condições de campo, uma vez que em casa de vegetação as condições são diferentes, pois a campo há amplas variações ambientais de temperatura, umidade e radiação que afetam os agentes de controle biológico.

Para as variáveis número total de folhas por planta (NTFP) número total de folhas com oídio (NTFO); percentual de folhas com oídio (NTFO%); e número total de manchas de oídio (NTMO) houve uma tendência de aumento ao longo do período avaliado, sugerindo evolução dos sintomas foliares da doença com o decorrer das avaliações (Tabela 11). Uma hipótese para esse resultado pode estar relacionada a cultivar de soja utilizada, P96Y90RR. De acordo com a empresa obtentora não há informações sobre o comportamento dessa cultivar em resposta ao oídio, recomendando, inclusive, o monitoramento para a doença.

Tabela 11 - Médias do número total de folhas por planta (NTFP); número total de folhas com oídio (NTFO); percentual de folhas com oídio (NTFO%); e número total de manchas de oídio (NTMO) em função do tempo (da avaliação) em plantas de soja tratadas com tratadas com agente de controle biológico em comparação com a testemunha

Tempo	NTFP	NTFO	NTFO%	NTMO
1ª Avaliação	26,5b	5,85c	22,59c	1,01c
2ª Avaliação	32,55a	12,62b	38,69b	3,21b
3ª Avaliação	34,45a	19,07a	55,68a	6,42a
CV (%)	13,23	30,42	27,69	76,86

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria, 2023.

4.6 Estudo do potencial de indução de resistência na soja por agente de controle biológico

Os tratamentos (testemunha, agente de controle biológico, indutor de resistência) influenciaram de forma significativa para enzima quitinase (QUI) (Tabelas 12 e 13). Já o efeito dos tempos de coletas do material vegetal foi significativo para as variáveis fenóis (FEN, $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), proteínas (PTNA, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), Fenilalanina amônia-liase (FAL, $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}$), e quitinase (QUI $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Tabelas 12 e 14). Destaque-se o efeito da interação entre os tratamentos e os diferentes tempos de coletas do material vegetal, que mostrou efeitos significativos para FAL e β -1,3-glucanase (GLU, $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) (Tabelas 12 e 15).

Tabela 12 - Graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM) e coeficiente de variação (CV%) da análise de variância do experimento em parcelas subdivididas no tempo em DIC, de plantas de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico e indutor de resistência, para compostos fenólicos (FEN, $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), proteínas totais (PTNA, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), fenilalanina amônia-liase (FAL, $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}$), β -1,3-glucanase (GLU, $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}$) e quitinase (QUI, $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}$)

Causa de variação	GL	QM				
		FEN	PTNA	FAL	GLU	QUI
Tratamento	2	12,56 ^{ns}	4,08 ^{ns}	0,00096 ^{ns}	0e+00 ^{ns}	0,009*
Tempo	2	21,88**	70,33**	0,00129**	0e+00 ^{ns}	0,102**
Tratamento x Tempo	4	0,67 ^{ns}	3,931 ^{ns}	0,00080*	4e-06**	0,051 ^{ns}
CV1 (%)		33,05	12,89	35,26	53,26	20,04
CV2 (%)		27,63	15,05	32,56	0%	28,02

^{ns}Não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F, **significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq 0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). DIC: delineamento inteiramente casualizado. Fonte: Autoria própria, 2023

O tratamento com utilização do indutor de resistência apresentou atividades aumentadas de quitinase, quando comparado a testemunha, porém não diferindo-se estatisticamente do tratamento com agente de controle biológico. Todavia o uso do agente de controle biológico também não diferiu da testemunha (Tabela 13).

Os resultados demonstram que o indutor de resistência, Acibenzolar-S-Metilico e o agente de controle biológico, com o produto comercial Pardella®, apresentaram potencial para induzir resistência pela ativação da enzima quitinase.

Resultados de experimento observando mudanças bioquímicas em plantas de soja inoculadas com ferrugem asiática, mostrou que a aplicação de Acibenzolar-S-Metilico ativou a enzima hidrolítica quitinase, indicando estimulação de respostas de defesa (BRUZAMARELLO *et al.* 2018), corroborando com os resultados obtidos no

presente trabalho. No caso a aplicação do produto comercial Pardella®, a ativação da enzima quitinase pode estar relacionada com o fato de a quitina ser um componente da parede celular das hifas dos fungos da ordem Hypocreales (MASSOLA JUNIOR, 2018), a qual pertencem os fungos *Trichoderma*, componentes do referido produto comercial, ou até mesmo pela presença de metabólitos presentes no produto comercial, o qual contém três microorganismos.

Levando em consideração que as quitinases desempenham papéis importantes no ataque aos patógenos fúngicos, catalisando a degradação da parede celular (XU *et al.*, 2021), os resultados sugerem que os produtos Acibenzolar-S-Metilico e Pardella® foram capazes de induzir respostas de defesa vegetal em plantas de soja, por meio do aumento da enzima quitinase nos tecidos vegetais.

Tabela 13 - Atividade enzimática média da quitinase (QUI, UA·mg⁻¹) em plantas de soja testemunha e tratadas com agente de controle biológico e indutor de resistência

Tratamento	Quitinase (QUI, UA·mg ⁻¹)
Testemunha	0,16b
Agente de controle biológico	0,19ab
Acibenzolar-S-Metilico	0,21a

***Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria, 2023**

Com relação ao fator tempo de coleta do material vegetal, observou-se comportamentos semelhantes para os fenóis e proteínas, onde houve maior atividade desses compostos com tempo de coleta zero, uma tendência de queda com coleta as 48h, e aumento as 96h, contudo para os fenóis esse aumento as 96h não foi suficiente para ser significativamente maior que a coleta do material após 48h. As atividades da FAL e quitinase apresentaram tendência de maior atividade com coleta do material vegetal após 48h (Tabela 14).

Portanto, não se pode generalizar o efeito do tempo de coleta do material após a aplicação na atividade dos fenóis, proteínas, enzimas FAL e quitinase. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo avaliando o potencial de fosfitos a base de potássio, cobre, manganês e Acibenzolar-S-Metil, na ativação da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) em plantas de soja, onde os resultados mostraram que as enzimas possuem tempos distintos de ativação (BRUZAMARELLO *et al.* 2018).

Tabela 14 - Atividade média dos compostos fenólicos (FEN, mg·100g⁻¹), proteínas totais (PTNA, mg·g⁻¹), fenilalanina amônia-liase (FAL, UA·mg⁻¹) e quitinase (QUI, UA·mg⁻¹) em função do tempo de coleta (0 h, 48 h e 96 h) do material vegetal de soja testemunha e tratados com agente de controle biológico e indutor de resistência

Tempo	FEN	PTNA	FAL	QUI
0 h	6,94a	11,95a	0,042b	0,10c
48 h	4,55b	7,78b	0,055a	0,26a
96 h	5,45b	10,85a	0,037b	0,21b
CV (%)	25,51	13,79	39,43	26,38

*Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria, 2023

As variáveis FAL e β -1,3-glucanase apresentaram interação significativa entre os tratamentos e os tempos de coleta do material vegetal após a aplicação. A ativação da FAL ocorreu após 48h no tratamento testemunha. O indutor de resistência e o agente de controle biológico mostraram tendência semelhante de respostas, sem apresentar ativação pronunciada da enzima FAL (Tabela 15).

A FAL é considerada um importante marcador de indução de resistência no metabolismo secundário de plantas (ALMEIDA *et al.*, 2012). Portanto, nas condições do presente experimento a aplicação do indutor de resistência e do agente de controle biológico não foram eficientes na indução de resistência por meio da ativação da enzima FAL.

Uma hipótese para justificar esse resultado (Tabela 15) é que a indução da resistência não é imediata e a expressão da resposta da planta pode demorar vários dias. Em experimento com inoculação do fungo *P. pachyrhizi*, em soja verificou-se maior ativação da FAL após 168 horas (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A maior atividade da FAL no tratamento controle após 48h após contato com o 'mix' de patógenos, pode ser decorrente da ativação por compostos voláteis originados inicialmente das reações de defesa iniciais ou da ativação pelos próprios metabólitos da fenilalanina amônia-liase (PREGELJ *et al.*, 2011).

A aplicação do agente de controle biológico promoveu a ativação da enzima β -1,3 glucanase, com ativação mais acentuada com coleta do material vegetal 96h após a aplicação. O tratamento controle não promoveu ativação da enzima, sendo que esta apresentou comportamento decrescente no decorrer das avaliações (Tabela 15).

Tabela 15 - Atividade enzimática média da fenilalanina amônia-liase (FAL, UA·mg⁻¹) e da β -1,3-glucanase (GLU, UA·mg⁻¹) em função do tratamento (agente de controle biológico, indutor de resistência e testemunha) e tempo de coleta (0 h, 48 h e 96 h) do material vegetal

Tratamento	FAL			GLU		
	0h	48h	96h	0h	48h	96h
Controle	0,050Ab	0,080Aa	0,033Ab	0,0023Aa	0,0021Aa	0,0006Bb
Agente de controle biológico	0,039Aa	0,040Ba	0,036Aa	0,0015Ab	0,0015Ab	0,0029Aa
Acibenzolar-S-Metilico	0,039Aa	0,046Ba	0,043Aa	0,0013Aa	0,0021Aa	0,0022Aa
CV (%)	32,61			36,69		

***Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria, 2023**

Esse resultado demonstra que houve ativação dos mecanismos de defesa pela aplicação do agente de controle biológico, pois houve aumento nos níveis da enzima β -1,3 glucanase. Acredita-se que as β -1,3 glucanases contribuam para a defesa da planta de duas maneiras, respondendo diretamente pela degradação das paredes das hifas do patógeno, tornando-as suscetíveis à lise; ou indiretamente, pela liberação de oligossacarídeos das paredes celulares dos fungos, que por sua vez, atuam como sinais na indução de respostas de defesa do hospedeiro (WRÓBEL-KWIATKOWSKA *et al.*, 2004).

4.7 Potencial uso de agentes de controle biológico sobre doenças de final de ciclo (DFCs)

O fator tempo (anos) de avaliação foi significativo ao nível de 5% de probabilidade do erro para as variáveis 3ª avaliação de severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Tabelas 16 e 17). O fator tratamento (testemunha e agente de controle biológico) foi significativo para as variáveis 2ª e 3ª avaliação de severidade e AACPD (Tabelas 16 e 18). Destaca-se, a interação entre os fatores, que foi significativa para as variáveis 1ª e 2ª avaliação de severidade (Tabelas 16 e 19).

Tabela 16 - Graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM) e coeficiente de variação (CV%) da análise de variância para o experimento bifatorial em DIC, com os fatores tempo (do ano de avaliação) e tratamento (testemunha e agente de controle biológico), para a 1ª, 2ª e 3ª avaliação da severidade e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) na avaliação de severidade de DFCs (%)

Fonte de Variação	GL	1ª avaliação	2ª avaliação	3ª avaliação	AACPD
Fator A (Tempo)	1	6,2017 ^{ns}	644,81 ^{ns}	301,04*	1340766*
Fator B (Tratamento)	2	0,5004 ^{ns}	8,00*	355,88*	151234*
A x B	2	0,5004*	19,90*	47,79 ^{ns}	4258 ^{ns}
Resíduo	18	0,1417	2,12	17,74	2935
CV (%)		29,71	16,21	19,47	8,16

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F ($p \leq 0,05$). ^{ns}Não significativo. DIC: delineamento inteiramente casualizado. Fonte: Autoria própria, 2023.

A severidade na 3ª avaliação e a AACPD em função do ano, teve um grande aumento no terceiro ano em relação aos demais (Tabela 17). Este comportamento pode ser justificado devido às diferentes condições meteorológicas, variáveis a cada ano. No segundo ano de experimento (2020) ocorreram temperaturas variando entre 20 e 30 °C e precipitações com alto volume, ambiente favorável para o surgimento e severidade das DFCs (KUDO; BLUM; LIMA, 2011), o que justifica a maior severidade. Isso sugere que é necessário atenção especial as estratégias de controle das DFCs quando em condições favoráveis ao surgimento dessas doenças.

Tabela 17 - Médias da 3ª avaliação de severidade (%) e AACPD em função do tempo (ano) na avaliação de severidade de DFCs (%)

Tempo	3ª avaliação	AACPD
Ano 1	20,25 b	612,56 b
Ano 2	15,75 b	559,61 b
Ano 3	28,87 a	819,77 a
CV (%)	20,11	8,11

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si ($p \leq 0,05$). Fonte: Autoria própria, 2023.

Para a severidade na 1° e 3° avaliação, bem como para AACPD, a aplicação do agente de controle biológico foi eficiente e promoveu menores danos à cultura. Inclusive para AACPD a aplicação do agente de controle biológico provocou redução de aproximadamente 48% quando comparado com a testemunha (Tabela 18).

Este aumento na eficiência de controle, provavelmente, deve-se a ativação dos mecanismos de defesa da planta pelos agentes de controle biológico, reduzindo a progressão das DFCs. Espécies de *Trichoderma* atuam como agentes de biocontrole através do antagonismo direto via lise enzimática através da excreção de quitinases, β -1,3-glucanases, proteases e pelos metabólitos secundários produzidos (GERALDINE *et al.*, 2013). Uma evidência que justifica essa hipótese foi a ativação da quitinase com a utilização do agente de controle biológico no experimento que avaliou o potencial de indução de resistência na soja por agente de controle biológico.

Resultados semelhantes foram obtidos por Dalagnol *et al.* (2006), onde houve diferença significativa na redução da severidade de doenças de final de ciclo em soja utilizando o ativador de resistência de plantas Acibenzolar-S-Methyl (ASM).

Tabela 18 - Médias da 2ª e 3ª avaliação de severidade (%) e AACPD em função dos tratamentos (testemunha e agente de controle biológico) na avaliação de severidade de DFCs (%)

Tratamento	2ª avaliação	3ª avaliação	AACPD
Testemunha	1,80 a	25,16 a	900,34 a
Agente de controle biológico	0,76 b	18,08 b	427,65 b

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si ($p \leq 0,05$). Fonte: Autoria própria, 2023.

A análise de variância revelou interação significativa ($p \leq 0,05$) entre o ano e o tratamento (testemunha e agente de controle biológico) para a primeira e segunda avaliações de severidade (Tabela 19). As menores médias de severidade foram observadas para o tratamento com aplicação do agente de controle biológico, mostrando a eficácia do produto aplicado.

Tabela 19 - Teste de médias para a 1ª e 2ª avaliação de severidade em função do tempo (ano) e do tratamento (testemunha e agente de controle biológico) na avaliação de severidade de DFCs (%)

Tratamento	1ª Avaliação			2ª Avaliação		
	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 1	Ano 2	Ano 3
Testemunha	1,77Aa	1,77Aa	1,77Aa	11,5Ab	14,5Aa	16,6Aa
Agente de controle biológico	0,77Bab	0,25Bb	1,25Ba	4,67Ba	3,10Ba	3,62Ba
CV (%)	22,58			17,29		

*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria, 2023

A eficiência do agente de controle biológico na severidade de DFCs na cultura da soja possivelmente ocorreu a partir de mecanismos diretos incluindo antibiose, micoparasitismo, produção de compostos antifúngicos e enzimas líticas, e competição por espaço e nutrientes como observado no teste de pareamento direto *in vitro*, e de forma indireta pela resistência induzida, por meio da ativação da enzima quitinase nos tecidos vegetais verificado no estudo de indução de resistência. Essa hipótese é suportada por estudo que avaliou o potencial de biocontrole de *Trichoderma harzianum* contra *Sclerotinia sclerotiorum* em soja, e verificou aumento da resistência contra *S. sclerotiorum* em mudas de soja, por meio de mecanismos diretos incluindo parasitismo de hifas e inibição do crescimento de patógenos pela secreção de componentes antifúngicos, bem como mecanismos indiretos de promoção do crescimento de plantas e indução de resistência sistêmica (ZHANG *et al.*, 2016).

5 CONCLUSÃO

Os agentes de controle biológico testados neste estudo apresentaram potencial *in vitro* de biocontrole para *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis longicolla*, *Fusarium tucumaniae*. Dentre os mecanismos envolvidos no controle estão a competição e micoparasitismo, por meio da inibição mecânica por estrangulamento, enovelamento e afinamento de hifas, e ruptura de septos.

Os agentes de controle biológico testados apresentaram potencial antagônico e inibitório dos contra *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Phomopsis*, *Fusarium*. O *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* foram eficientes no controle dos fitopatogenos *Rhizoctonia solani* e *Phomopsis longicolla*. O *Trichoderma asperellum* também demonstrou eficiência no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. O *Bacillus amyloliquefaciens* foi eficaz contra *Macrophomina phaseolina*. O produto comercial Pardella® e o *Bacillus amyloliquefaciens* foram eficientes no controle micelial de *Fusarium tucumaniae*.

A aplicação do produto comercial à base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*, não interferiu nos parâmetros de qualidade fisiológica relacionadas a germinação das sementes e na performance fisiológica da fase inicial da cultura da soja.

Não verificou efeito do agente de controle biológico sobre o oídio na soja em experimento em vasos sob condição de casa de vegetação.

O indutor de resistência, comercializado Acibenzolar-S-Metilico e o agente de controle biológico (Pardella), apresentaram potencial para induzir resistência de plantas de soja, com expressão da enzima quitinase nos tecidos vegetais.

O agente de controle biológico Pardella® apresentou efeito positivo na redução da severidade de doenças de final de ciclo (DFCs) em condições de campo.

No geral, o controle biológico com espécies de *Trichodermas* e *Bacillus amyloliquefaciens* se mostrou adequado para aplicação visando o controle de patógenos, com consequente contribuição para diminuir a dependência de fungicidas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. *et al.* *Trichoderma* spp. genes involved in the biocontrol activity against *Rhizoctonia solani*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 884469, 2022.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Phytopathological Society. 4. ed. p. 922, 2004.
- AHMED, A. S.; SÁNCHEZ, C. P.; CANDELA, M. E. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 817-824, 2000.
- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* *Macrophomina phaseolina* em soja. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55 p. (**Embrapa Soja, Documentos, 346**).
- ALMEIDA A. M. R *et al.* **Doenças da soja**. 2005. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.). Manual de Fitopatologia - Vol. 2. Doenças de Plantas Cultivadas. 4. ed. São Paulo SP. Editora Agronômica Ceres. pp. 570-588
- ALMEIDA, A. M. R. Observação de resistência parcial a *Septoria glycines* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, n. 26, p. 214-216, 2001.
- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* Doença da soja (*Glycine max* L.). IN: KIMATI, H. *et al.* **Manual de fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 642-648, 1997.
- ALMEIDA, H. O. *et al.* Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 163-172, 2012.
- ALVARES, C. A. *et al.* Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n.6, p.711–728, 2013. doi: 10.1127 / 0941-2948 / 2013/0507.
- AMORIM, L. Sobrevivência do inóculo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. v.1, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. p.246-267.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in South america is caused by four species of *fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *f. cuneirostrum* sp. nov., *f. tucumaniae*, and *f. virguliforme*. **Mycoscience**, Elsevier, v. 46, n. 3, p. 162–183, 2005. doi: 10.1007 / s10267-005-0235-y.
- ARAUJO, F. F. D.; GUERREIRO, R. T. Bioprospection of *Bacillus* isolates promoters of corn growth in natural and sterile soil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010. doi: 10.1590/S1413-70542010000400007.
- ÁVILA, Z. R. *et al.* Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brasília, DF: Embrapa Recursos**

Genéticos e Biotecnologia, p. 30, 2005. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 117).

BALDUCCHI, A. J.; MCGEE D. C.; Environmental factors influencing infection of soybean seeds by *Phomopsis* and *Diaporthe* species during seed maturation. **Plant Disease**, v. 71, n. 3, p. 209-212, 1987. doi: 10.1094/PD-71-0209.

BARBOSA, K.; RODRIGUES, K.; CABRAL, C. Performance de biofungicidas em doenças foliares de final de ciclo da soja. **Repositório Institucional**, v. 2, n. 1, 2023.

BAR-NESS, Eli *et al.* Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. **Plant Physiology**, Israel, v. 100, n. 1, p. 451-456, 1992.

BARROS, M.I F. **Atividade Antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro**. 2014. 52f Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande-MS, 2014.

BEDENDO, I. P. Damping off. IN: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 435-441, 2011.

BEDENDO, I. P.; MASSOLA, N. S. J.; AMORIM, L. Controle cultural, físico e biológico de doenças de plantas. **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**, 2011.

BEDENDO, I. P. Damping off. IN: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 822-828, 1995.

BENITEZ, L. B. **Caracterização de peptídios antimicrobianos de *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade antibacteriana, antifúngica e amebicida**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.

BOHNER, T.O.L.; ARAÚJO, L.E.B.; NISHIJIMA, T.O. Impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos Trabalhadores rurais. **Revista Eletrônica do Curso de Direito**, v. 8, p. 329-341, 2013. doi: 10.5902/198136948280.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p.1-16, 2006.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009.

BRUZAMARELLO, J. *et al.* Potencial de fosfitos na indução da resistência em plantas de soja. **Revista Cultura Agronômica**, v. 27, n. 3, p. 263-273, 2018.

CALVO, H. *et al.* Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, Cambridge, v. 63, p. 101-110, 2017. doi: 10.1016 / j.fm.2016.11.004.

CAMPBELL, R. E. **Biological control of microbial plant pathogens**. Cambridge university press, 1989.

CASTRO, V. L. S. S.; MELO, I. S. Avaliação toxicopatológica em ratos expostos à *Pseudomonas putida*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, São Paulo, v. 2, p. 1-5, 2007.

CHAGAS JÚNIOR, A. F. *et al.* Promoção de crescimento em feijão-caupi inoculado com Rizóbio e trichoderma spp. no Cerrado. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 190-199, 2014.

CHAGAS, L. F. B. *et al.* *Trichoderma* na promoção de crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neo tropical**, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017. doi: 10.32404/rean.v4i3.1529.

CHAGAS, L. F. B. *et al.* Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 4, p. 1-11, 2016. Doi: 10.1007/s40415-015-0247-6.

CHEN, X. H. *et al.* Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of biotechnology**, v. 140, n. 1, p. 27–37, 2009. doi: 10.1016/ j.jbiotec.2008.10.011.

CHOI, Byungwook *et al.* Effects of Seed Endophytic Bacteria on Life History and Reproductive Traits in a Cosmopolitan Weed, *Capsella bursa-pastoris*. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2642, 2022.

CHOI, I. *et al.* Physiological characteristics of green mold (*Trichoderma* spp.) isolated from oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). **Mycobiology**, v. 31, n. 3, p. 139-144, 2003.

CHUTRAKUL, C. *et al.* The production and characterisation of trichotoxin peptaibols, by *Trichoderma asperellum*. **Chemistry & biodiversity**, v. 5, n. 9, p. 1694-1706, 2008.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Tabela de dados - Produção e balanço de oferta e demanda de grãos**. 2023. Disponível em: https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/47828_247c2bc68c8991a882f8c8b2b6974503. Acesso em: 26 jun. 2023.

CORDEIRO, A. C. C. *et al.* Herança de resistência da soja à *Cercospora sojina* Hara, isolado de São Gotardo, Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 1035-1042, 1992.

CONOVER, W. J.; CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics**. Wiley

New York, 1980.

DALLAGNOL, L. J. *et al.* Utilização de Acibenzolar-S-Methyl para controle de doenças foliares da soja. **Summa phytopathologica**, v. 32, p. 255-259, 2006.

DEBIASI, H. *et al.* Diversificação de espécies vegetais como fundamento para a sustentabilidade da cultura da soja. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2015. 60 p. (**Embrapa Soja. Documentos Online, 366**).

DING, G. *et al.* Sesquiterpenes and cyclopeptides from the endophytic fungus *Trichoderma asperellum* SAMUELS, LIECKF. & NIRENBERG. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 6, p. 1205-1212, 2012.

DORIGHELLO, D. V. **Versatilidade de *bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja**. 2017. 136 f. Tese doutorado, UNESP-Botucatu.

DORRANCE, A. E., LIPPS, P. E. Sudden death syndrome of soybean. **Columbus: Ohio State University**, 1998. 2 p.

D'AGOSTINO, F.; MORANDI, M. A. B. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2009.

ELIAS, L. M. *et al.* Selection of *Trichoderma* isolates for biological control of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* in lettuce. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 216-221, 2016.

EL_KOMY, M. H. *et al.* Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato *Fusarium* Wilt. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 1, p. 50-60, 2015. doi:10.5423/PPJ.OA.09.2014.0087.

ESPOSITO, E.; SILVA M. Systematics and enviromentai application of the genus *Trichoderma*. **Critical review in microbiology**. v. 24, p. 89-98, 1998. doi: 10.1080 / 10408419891294190.

ES-SOUFI, R. *et al.* In Vitro Antagonistic Activity of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens* against *Colletotrichum acutatum*. **Advances in Microbiology**, v. 10, n. 03, p. 82-94, 2020. doi: 10.4236/aim.2020.103008

EZIASHI, E. I.; OMAMOR, I. B.; ODIGIE, E. E. Antagonism of *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, 2007.

FERREIRA E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs** (Portugues). R package version 1.2.2., 2021. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>. Acesso em: 10 jun. 2022.

FORMIGHIERI, A. P. *et al.* Avaliação do potencial da planta *Adiantum capillu-veneris* (L.) no controle de fitopatógenos. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 487-496, 2010. doi: 10.1590/1808-1657v77p4872010.

- FREITAS, J. R.; GERMIDA, J. J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1137- 1146, 1992.
- GABARDO, G. *et al.* *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p.55870-55885, 2020. doi: 10.34117/bjdv6n8-123.
- GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Endophytic bacteria as biological control agents in rice fields. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**. v.82, n.00, 2015.
- GERALDINE, Alaerson Maia *et al.* Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 308-316, 2013.
- GIORGIO, A. *et al.* Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1056, 2015.
- GODOY, C. V. *et al.* Doenças da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Embrapa Soja-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2014.
- GODOY, C. V. *et al.* Doenças da soja. IN: AMORIM, L. *et al.* (Org.). **Manual de Fitopatologia**. v. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2016. p. 657-675.
- GODOY, CV. Target spot. In: HARTMAN, G. L. *et al* **Compêndio de doenças e pragas da soja**. 5ª ed. Saint Paul: APS Press, 2015.
- GOLDSTEIN, H. **Multilevel statistical models**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2011.
- GOLL, M. B. *et al.* Survey on the prevalence of *Rhizoctonia* spp. in European soils and determination of the baseline sensitivity towards sedaxane. **Plant Pathology**, v. 63, n. 1, p. 148-154, 2013. doi: 10.1111/ppa.12063.
- GÓMES, D. É. ***Cercospora sojina*: produção de esporos, densidade de inóculos de reação de cultivares de soja**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 94 f, 2011.
- GOMES, E. V. **Estudo de genes de *Trichoderma harzianum* associados ao micoparasitismo e seu papel no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2015. p.117. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015.
- GORGEN, C. A. *et al.* Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1583–1590, 2010. doi: 10.1590/S0100-204X2009001200004.
- GU, Q. *et al.* Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 83, p. 1-17, 2017. doi: 10.1128/AEM.01075-17.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**. v. 160, n. 4, p. 167-180, 2012. doi: 10.1111/j.1439-0434.2012.01884.x.

GUTIÉRREZ-LUNA, F. M. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. **Simbiose**, v. 51, p. 75-83, 2010.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. Tese (Doutorado em de Energia Nuclear na Agricultura)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 236 pp 2004.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, n.9/10, p.449-454, 1996.

HADDAD, P. E. *et al.* Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, p. 1140-1148, 2017.

HAHAROONA, B. *et al.* Fertilizerdependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 147- 155, 2008.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Saint Paul. v. 84, n. 4, 2000. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.4.377.

HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HARTMAN, G.; CHANG, H. X.; LEANDRO, L. F. Research advances and management of soybean sudden death syndrome. **Crop Protection**. v. 73, p. 60-66, 2015. doi: 10.1016/j.cropro.2015.01.01.

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. Compendium of Soybean Diseases. **American Phytopathological Society**, St Paul, MN, ed. 4, 1999.

HENNING, A.A. *et al.* Manual de Identificação de Doenças de soja. 5 ed. Londrina, PR: Embrapa Soja, (**Embrapa Soja. Documentos Online, 256**), 2014, 76 p.

HILLOCKS, R.J. Seedling diseases. In: HILLOCKS, R. J. (Ed.). **Cotton diseases**. Wallington: CBA International. Cap. 1, p. 1-38, 1992.

HOTHORN, T; BRETZ, F; WESTFALL, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Biometrical Journal**, n. 50, v. 3, p. 346-363, 2008.

HOYOS-CARVAJAL, Liliana; ORDUZ, Sergio; BISSETT, John. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological control**, v. 51, n. 3, p. 409-416, 2009.

HOWELL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**. v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.1.4.

JENNINGS, A. C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analytical biochemistry**, v. 118, n. 2, p. 396-398, 1981.

JULIATTI, F. C. *et al.* *Trichoderma* as a biocontrol agent against *Sclerotinia* stem rot or white mold on soybeans in Brazil: usage and technology. **Trichoderma-The Most Widely Used Fungicide**, p. 39, 2019.

KAUR, S. *et al.* Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 6, n. 2, p. 136-151, 2012. doi: 10.3109/1040841X.2011.640977.

KOWATA, L. S. Escala Diagramática para avaliar severidade de míldio na soja. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p.105-110, 2008.

KUDO, Â. S.; BLUM, L. E. B.; LIMA, M. A. Aerobiologia de *Cercospora kikuchii*. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1682-1688, 2011.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

KUZMANOVSKA, B. *et al.* Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates. **Chilean Journal of Agricultural Research**. n. 3 v. 78, p. 391-399, 2018. doi:10.4067/S0718-58392018000300391.

LEÓN, M. *et al.* Antifungal activity of selected indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the soybean rhizosphere. **International Journal of Microbiology**, v. 20, n.1, p. 1-10, Nov. 2009. doi: 10.1155 / 2009/572049.

LI, S. *et al* Analysis of the genome sequence of *Phomopsis longicolla*: a fungal pathogen causing *Phomopsis* seed decay in soybean. **BMC Genomic**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2017. doi: 10.1186 / s12864-017-4075-x.

LI, S.; HARTMAN, G. L.; BOYKING, D. L. Aggressiveness of *Phomopsis longicolla* and other *Phomopsis* spp. on soybean. **Plant Disease**, v. 94, n. 8, p. 1035-1040, 2010. doi: 10.1094/PDIS-94-8-1035.

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

LUCON, C. M. M. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. **São Paulo: Instituto Biológico/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal**, 2009.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A. Controle biológico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e Maneja de Patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife, UFRPE, p. 303-322, 2005.

MARTINELLI, J. A. *et al.* Soybean oid blight and root rot caused by lineages of the *Fusarium graminearum* and the production of mycotoxins. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 492-498, 2004.

MARTINS, M. C. *et al.* Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 179-184, 2004.

MARTINS, M. C. **Produtividade da soja sob influência de ocorrência natural de *Septoria glycines* Hemmi e *Cercospora kikuchii* (Matsu. & Tomoyasu) Gardner com e sem controle químico**. Tese (Doutorado)– Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003, 104 f.

MARTINS, S. J. *et al.* Biological control of bacterial wilt of common bean by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 66, n. 1, p. 65–71, 2013.

MASSAWE, V. C. *et al.* Volatile compounds of endophytic *Bacillus spp.* have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1373-1385, 2018.

MASSOLA JÚNIOR, N.S. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia Volume I**. 5ª Ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p.107-141.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.

MATTEI, D. *et al.* Produtos fitossanitários biológicos disponíveis para agricultura e perspectivas de novos produtos. In: ZAMBOM, M. A. *et al.* **Ética do cuidado, legislação e tecnologia na agropecuária**. UNIOESTE, M. C. Rondon-PR, ed.1, p.124-154, 2017.

MATTIAZZI, P. **Efeito do oídio (*Microsphaera diffusa* Cooke & Peck) na produção e duração da área foliar sadia da soja. 2003**. Dissertação (Mestrado)– Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

MAYO, S. *et al.* Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma spp.* in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 685, 2015.

MEDEIROS, F. H. V. de *et al.* **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Ceres, São Paulo, p. 261-274, 2018.

MICHEL, A. M. CAVALCANTI, F. R. Controle biológico do míldio da videira por *Bacillus spp.* IN: Encontro de iniciação científica, 17., Encontro de pós-graduandos da Embrapa uva e vinho, 13., 2019, Bento Gonçalves. Anais... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Resumo 10. **(Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 115)**.

MIGNUCCI, Julia, CHAMBERLAIN, D. W. Interactions of *Microsphaera diffusa* with soybeans and other legumes. **Phytopathology**, v. 68, n. 2, p. 169-173, 1978.

MOLINA, J. P. E. **Yield losses of soybean due to target spot (*Corinespora cassiicola*), its genetic and chemical management**. 2018. 117 f. Tese – Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura uiz de Queiroz – USP, Piracicaba-SP.

MONTE, H.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. IN: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2019, 538p.

MOTOYAMA, M.M. *et al.* Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.25, n.2, p.509-512, 2003. doi: 10.4025/actasiagron. V25i2.2333.

MYCOBANK. Search on: Mycobank names. 2018. Disponível em: <http://www/mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=39566&Fields=All>. Acesso em: 15 jul. 2021.

NGHIA, H. H.; NHUT, N. N. **Investigating the applicability of *Bacillus*, *Streptomyces*, and *Trichoderma* to control *Phomopsis longicola* causing diseases in soybean**. 2020. Disponível em: http://dspace.hcmus.edu.vn/bitstream/handle/123456789/2403/VNUHCM-US_CONF-2020_Paper389.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 20 jul. 2023.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Chlamydospore formation by *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 415–418, 2012.

PACHECO, K. R. **Avaliação de *Trichoderma* e de fosfito no controle de *Sclerotium rolfsii* agente da murcha-de-esclerócio em feijoeiro**. Brasília, 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012.

PAMPHILE J. A. *et al.* Plant-microbe interactions between host and endophytes observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). In: SORVARI S, PIRTTILÄ AM, editors. **Prospects and applications for plant-associated microbes**. A Laboratory Manual, Part A: Bacteria. Finland: BioBien Innovations; 2008. p. 184-9

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v.1, cap.22, 1995, p.417-454.

PELTIER, A. J. *et al.* Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. B1-B7, 2012.

PELZER, G. Q. *et al.* Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 95-103, 2011.

PEREIRA, C. S *et al.* Aplicação de extrato etanólico de própolis em doenças da cultura da soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n.4, p.854-862, 2017. doi: 10.19084/RCA17029.

PESQUEIRA, A. S.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Associação de fungicidas no controle da Antracnose no Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Agronômica**. v. 47, n. 1, p. 20-2012, 2016. doi: 10.5935/1806-6690.20160024.

PINHEIRO, J; BATES, D; R Core Team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-162, 2023. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>. Acesso em: 02 nov. 2023.

PRASETYO, J. *et al.* The Effectiveness of *Trichoderma spp.* against Downy Mildew Disease of Corn. **Annual Research & Review in Biology**, p. 1-10, 2019.

PREGELJ, L. *et al.* Transcription profiling of the isoflavone phenylpropanoid pathway in soybean in response to *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. **Functional Plant Biology**, v. 38, n. 1, p. 13-24, 2010.

RANGEL-MONTOYA, E. A. *et al.* Biocontrol of *Macrophomina phaseolina* using *Bacillus amyloliquefaciens* strains in cowpea (*Vigna unguiculata* L.). **Agronomy**, v. 12, n. 3, p. 676, 2022.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

REGGINATO, P. **Impacto do míldio na produtividade da soja no Mato Grosso do Sul, SAFRA 2006/2007**. 2008. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Agronomia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

REIS, E.R. *et al.* Efeitos da rotação de culturas na incidência de podridões radicais e no rendimento de grãos da soja. **Summa Phytopathologica**, v.40, p. 9-15, 2014. doi: 10.1590/S0100-54052014000100001.

RESENDE, M.L. *et al.* Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004 doi: 10.1590/S1413-70542004000400010.

RIBAS, P. P. **Promoção de crescimento, indução de resistência e controle biológico de fitopatógenos em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) mediados por *Trichoderma spp.*** 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

RIBEIRO, M. S. **Estudo funcional do gene gluc31 que codifica uma β -1, 3-glucanase da família GH16 de *Trichoderma harzianum***. 2017. p.90. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goiás. 2017.

RODRIGUES, F. Á.; SILVEIRA, P. R.; CACIQUE, I. S. Indução de Resistência no Manejo de Nematoides. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Nematologia, 2019. ISBN: 978-85-66836-25-7. Anais... Caldas Novas, GO.

ROSSI, R. M.; SANTOS, L. A. dos. Modelagem bayesiana para curvas de crescimentos de codornas assumindo assimetria nos erros. **Semina: Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina**, v. 35, n. 3, p. 1637–1647, 2014.

- ROSSI, V.; PATTORI, E. Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of Trichoderma-based products. **Biological control**, v. 49, n. 1, p. 52-57, 2009.
- RUFINO, C.; ARAÚJO, C. S. D.; NOGUEIRA, S. R. Desafios na utilização do controle biológico de doenças de plantas na Amazônia. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v.5, n.1, p.248-262, 2018.
- RYU, C. M. *et al.* Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 4927-4932, 2003. doi: 10.1073/pnas.0730845100.
- SANTOS-VILLALOBOS, S. D. L. *et al.* Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). **Biological control**, v. 64, n. 1, p. 37-44, 2013.
- SANTOYO, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. del C.; GOVINDAPPA, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 855-872, 2012.
- SARROCCO, S. *et al.* Competition for cellulose exploitation between *Rhizoctonia solani* and two *Trichoderma* isolates in the decomposition of wheat straw. **Journal of Plant Pathology**, p. 331-338, 2009.
- SBALCHEIRO, C. C.; DENARDIN, N. D.; BRAMMER, S. P. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do cretamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 29-37, 2009. doi: 10.1590/S1982-56762009000100005.
- SCANDIANI, M. M. *et al.* Perfis metabólicos de raízes de soja durante os estágios iniciais da infecção por *Fusarium tucumaniae*. **Journal of Experimental Botany**. v. 66, p. 391-401, 2015. doi: 10.1093/jxb/eru432.
- SEIXAS, C. D. S. *et al.* Bioinsumos para o manejo de doenças foliares na cultura da soja. In: MEYER, M.C.*et al.* **Bioinsumos na cultura da soja**. Embrapa Soja. p. 331-343. 2022.
- SHANER, G.; FINNEY, R. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.
- SHARMA, P.; SAIN, S. K. Induction of systemic resistance in tomato and cauliflower by *Trichoderma spp.* against stalk rot pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. **Journal of Biological Control**, p. 21-28, 2004.
- SHARON, E. *et al.* Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **European journal of plant pathology**, v. 118, p. 247-258, 2007.

SILVA, A. *et al.* Characterization of weed in rotated area of maize and cowpea in direct planting. **Scientia Agropecuaria**, v.9, n.1, p. 7-15, 2018. doi: 10.17268/sci.agropecu.2018.01.01

SILVA, L. G. *et al.* Dual functionality of *Trichoderma*: Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and biostimulant of cotton plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 983127, 2022.

SILVA, L. R. *et al.* Efeitos de compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento de *Sclerotinia sclerotium* (lib.) de Bary. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 17, 2019. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 346. 2019.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Soybean diseases. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed.). **Compendium of Soybean Diseases**. 4 ed., Minnesota: APS, p. 3-4, 2008.

SLUSARSKI, C.; PIETR, S. J. Combined application of dazomet and *Trichoderma asperellum* as an efficient alternative to methyl bromide in controlling the soil-borne disease complex of bell pepper. **Crop protection**, v. 28, n. 8, p. 668-674, 2009.

SONKAR, P. Determination of interaction between *Trichoderma asperellum* and *Fusarium oxysporum* sp. by digital light microscopy and confocal microscopy. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 11, n. 1, p. 1-4, 2019.

SOUTO, G. I. *et al.* Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1247-1256, 2004.

STEFFLER, A. D. *et al.* Efeito do uso de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre a produtividade de duas cultivares de soja. In: **IX SIEPEX-IX Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão**. 2019.

STUMPF, R.; PRATES, F. Redução na incidência do mofo cinzento causado por botrytis cinerea em tomateiro cultivado sob ambiente protegido com aplicação de isolados de *trichoderma harzianum* e *gliocladium* sp. **Salão de iniciação Científica (17.: 2005: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2005.**, 2005.

SUMIDA, C. H. *et al.* *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. **Biocontrol science and technology**, v. 28, n. 2, p. 142-156, 2018.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TIAN, Y. *et al.* Confrontation assays and mycotoxin treatment reveal antagonistic activities of *Trichoderma* and the fate of *Fusarium* mycotoxins in microbial interaction. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115559, 2020.

TONDJE, P. R. *et al.* Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. **Biological control**, v. 43, n. 2, p. 202-212, 2007.

- TORRES, M. J. *et al.* Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological research**, v. 182, p. 31-39, 2016.
- TORRES, M. J. *et al.* Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. **Biological Control**. v. 105, p. 93-99, 2017. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.12.001.
- TUCCI, M. *et al.* The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 341-354, 2012.
- TYŚKIEWICZ, R. *et al.* Trichoderma: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2329, 2022.
- VAN LOON, L. C.; BAKKER, P.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.
- VILLAMIZAR-GALLARDO, R. A.; ORTÍZ-RODRIGUEZ, O. O.; ESCOBAR, J. W. Symbiotic and endophytic fungi as biocontrols against cocoa (*Theobroma cacao* L.) phytopathogens. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 87-93, 2017.
- VISMARA, E. S.; MEHTÄTALO, L.; BATISTA, J. L. F. Linear mixed-effects models and calibration applied to volume models in two rotations of Eucalyptus grandis plantations. **Canadian Journal of Forest Research**, NRC Research Press, v. 46, n. 1, p. 132–141, 2015.
- VISMARA, L. S. **Óleos essenciais na indução de resistência em morangos ao mofo cinzento, à *Botrytis cinerea* in vitro e ação toxicológica**. 2019. 213 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.
- WICKHAM, H *et al.* Welcome to the tidyverse. **Journal of Open Source Software**, n. 4, v. 43, p. 1686, 2019. doi:10.21105/joss.01686.
- WIDMER, T. L. Screening *Trichoderma* species for biological control activity against *Phytophthora ramorum* in soil. **Biological Control**. v. 79, p. 43-48, 2014. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.08.003.
- WIRTH, S.; WOLF, G. Micro-plate colourimetric assay for endo-acting cellulose, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 511-519, 1992.
- WRATHER, A.; KOENNING, S. Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007. **Plant Health Progress**, v. 10, n. 1, p. 24, 2009.
- WRÓBEL-KWIATKOWSKA, M. *et al.* Expression of β -1, 3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, n. 5, p. 245-256, 2004.
- XIMENES, L. F.; COELHO, J. D. **Agropecuária: Soja**. Caderno Setorial Etene. Fortaleza: BNB, ano 8, n. 287, maio 2023.

XU, J. *et al.* Chitinase chi 2 positively regulates cucumber resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum. **Genes**, v. 13, n. 1, p. 62, 2021.

YEDIDIA, I. *et al.* Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T203. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p. 863–873, 2000. doi: 10.1016 / S0981-9428 (00) 01198-0.

YEDIDIA, I. *et al.* Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentration and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v.235, p.235-242, 2001. doi: 10.1023/A:1011990013955

YORINORI, J. T. *et al.* Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.

YORINORI, J. T.; YUYAMA, M. M.; SIQUERI, F. V. Doenças da soja. **Boletim de Pesquisa de Soja**. Rondonópolis, n.13, p.180-222, 2009.

ZAMBRANO, E. C.; PARRA, A. S.; ORTIZ, Á. M. M. Biocontrol of rice sheath blight with microorganisms obtained in rice cultivated soils. **Bragantia**, v. 80, p. e0921, 2021.

ZEUN, R.; SCALIET, G.; OOSTENDORP, M. Biological activity of sedaxane – a novel broad spectrum fungicide for seed treatment. **Pest Management Science**, v. 69, n.4, p. 527-534, 2013. doi: 10.1002/ps.3405.

ZHANG, F. *et al.* Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64-74, 2016.