

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

Pauline Flores da Silva

**POTENCIAL FUNGICIDA E INSETICIDA DE CO-CULTIVOS DE *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Metarhizium anisopliae* PARA O MANEJO FITOSSANITÁRIO DA CULTURA DA SOJA**

Santa Maria, RS

2023

Pauline Flores da Silva

**POTENCIAL FUNGICIDA E INSETICIDA DE CO-CULTIVOS DE *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Metarhizium anisopliae* PARA O MANEJO FITOSSANITÁRIO DA CULTURA DA SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Leone Zobot

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres

Santa Maria, RS

2023

Flores da Silva, Pauline  
POTENCIAL FUNGICIDA E INSETICIDA DE CO-CULTIVOS DE  
Beauveria bassiana, Trichoderma harzianum e Metarhizium  
anisopliae PARA O MANEJO FITOSSANITÁRIO DA CULTURA DA  
SOJA / Pauline Flores da Silva.- 2023.  
83 p.; 30 cm

Orientador: Giovani Leone Zobot  
Coorientadores: Marcus Vinícius Tres, Marcio Antônio  
Mazutti  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2023

1. Fungos entomopatogênicos 2. Cultura da Soja 3. Co  
cultivo de Fungos entomopatogênicos 4. Controle  
biológico de Doenças Fúngicas 5. Controle biológico de  
Pragas I. Leone Zobot, Giovani II. Vinícius Tres, Marcus  
III. Antônio Mazutti, Marcio IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, PAULINE FLORES DA SILVA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Pauline Flores da Silva

**POTENCIAL FUNGICIDA E INSETICIDA DE CO-CULTIVOS DE *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Metarhizium anisopliae* PARA O MANEJO FITOSSANITÁRIO DA CULTURA DA SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

Aprovada em 20 de abril de 2023.

---

Giovani Leone Zobot, Dr (UFSM) - videoconferência  
(Presidente/Orientador)

---

Marcus Vinícius Tres, Dr (UFSM) - videoconferência  
(Co-orientador)

---

Marcio Antônio Mazutti, Dr (UFSM) - videoconferência

---

Thiarles Brun, Dr (URI) - videoconferência

Santa Maria, RS

2023

Ao mestre do mundo, nosso Deus;  
Ao meu mestre, amigo, confidente, orientador;  
Aos meus pais, alicerce da minha vida;  
Ao meu irmão, meu guerreiro trabalhador;  
Ao meu sobrinho, minha força;  
Ao meu amado, grande amor de minha vida;  
A minha sogra e seu esposo, e meu sogro, grandes incentivadores;  
A cunhada, pelo abrigo, conselhos e amparo;  
A avó, pela força e orgulho de sua neta;  
As madrinhas, por todo incentivo, amor e orgulho de sua afilhada;  
A Maya, Madara, Romeu, Negah, Zeus, Pispirica, Dudo e Mariana, pets com alma de anjo;  
Aos meus amados alunos, luz da minha vida;  
Aos motoristas amigos, que com carinho me cederam as caronas;  
Aos anjos pets e humanos, que da glória me amparam;  
A Aline, Tatiane, Denise, Fabiane, Anna Paula, Viviane, Simone Cristina, Franciele, Andriélly, Zuleica, Allana, Vanderson, amigos que de perto e longe apoiam todos os meus objetivos;  
A Érika, conterrânea, amiga e colega, por cada aflição e conhecimentos que juntas partilhamos;  
A Jocenir, Zelina e Marciane, meus “pais” de São Vicente do Sul;  
A Maicon, Olimpio, Beatriz e Bruno, grandes apoiadores desse projeto;  
A Matheus, Enzo e Nicollas, meus afilhados que tanto amo e admiro;  
A todos que duvidaram e duvidam de minha capacidade;  
A mim, pois dediquei-me e esforcei-me para que este sonho se realizasse.

## AGRADECIMENTOS

Ao criador do mundo, nosso Deus, pela vida e provas de fé. Em todas as minhas orações sinto sua presença. Obrigada por tantas bênçãos!

Aos meus pais, Paulo Sergio e Simone, os melhores mecânico agrícola e empregada doméstica do universo, pelo amparo, incentivo, amor e orgulho. Obrigada por todo sacrifício que sempre fizeram para que meu irmão e eu lutássemos por nossos sonhos, mesmo quando dificuldades apareceram, nunca deixaram que o amor e o orgulho de nós, nos faltasse. Amo vocês mais que tudo no mundo!

Ao meu amado marido Antônio Luiz, pelo amor, apoio, incentivo, paciência e alegria em me ver alcançando meus objetivos. Não é nada fácil dividir a vida comigo, mas tu tens um jeito apaixonável de me mostrar que em tudo à jeito. E obrigada por todas as caronas, presentes, por todas as vezes que precisei do teu ombro para chorar e que me cedeu, e por todos os “termina logo isso guria”, para me incentivar, do teu modo, a ir mais longe. E também, agradeço por me ceder teu notebook quando o meu estragou. Te amo infinitamente, meu grande homem!

A minha cunhada Samanta, por ter cedido seu apartamento todos os dias em que precisei, e pela paciência nos momentos em que eu fui alguém difícil. Obrigada por sempre acreditar em mim! Te adoro chata!

Aos meus pets Maya, Madara e Romeu, por me fortalecerem através de seu amor único. “Mamãe” ama demais vocês!

Aos demais familiares e familiares de meu amado, que de algum modo emanaram energias positivas para a conclusão deste trabalho, em especial minhas tias Nilza e Carla, que nunca esconderam seu orgulho de mim, e que muitas vezes, foram mães, na ausência da minha mãe. E a minha sogra, “sogra mãe”, Lenilda, pelo especial incentivo e orgulho de ver seu filho ao lado de “uma mulher linda e estudiosa”. Obrigada por tudo!

A minha comadre Simone Cristina, minha amiga a 13 anos, por todos os puxões de orelha e incentivo, e por ser a pessoa que mais me incentivou a buscar meu próprio caminho, me mostrando do que uma mãe é capaz! Obrigada minha grande amiga!

Aos meus afilhados Matheus, Enzo e Nicollas, por me mostrarem que, se posso ser uma boa madrinha, posso ser uma ótima mestre. “Dinda” ama vocês!

Aos meus colegas de trabalho, por todas as vezes em que me cobriram em minhas funções e horários, para que eu pudesse viajar e executar meu experimento. Não teria conseguido sem esse apoio. Marisolete, Vera, Ondina e Elisângela, obrigada por todas as delícias que preparam com amor para “ me fortalecer para toda jornada” e a Marciane, minha antiga coordenadora, grande líder, uma magnífica mulher que sempre exaltou e elogiou minha capacidade, me ajudando como coordenadora e amiga... Teu filho foi morar no céu, mas de onde ele está, ele está orgulhoso do que a mãe se tornou e de da força que tem! Um especial agradecimento a minha diretora Fabiane Coradini, e as minhas colegas da EMEF Eduardo Lutz, pela linda surpresa que prepararam para minha defesa, e por todos os distintos incentivos que me deram durante a minha jornada! Vocês são tudo para mim!

Ao meu orientador, professor Giovani, pela paciência, disponibilidade, atenção e conhecimentos partilhados. Sei que fui uma orientanda complicada, mas com certeza nosso objetivo foi alcançado. Nunca é fácil morar longe e ter ideias inviabilizadas, mas sempre encontramos maneiras de melhorar o experimento para que eu me tornasse mestre. Se um dia for professora, sendo metade do que o senhor foi para mim como profissional, eu terei tido sucesso. Em especial agradeço por sempre ter enaltecido minha capacidade de estudar e trabalhar! Meu eterno obrigado grande amigo e professor!

Ao professor Marcio Mazutti, por todo apoio durante o desenvolvimento do experimento, e por ceder com carinho os microrganismos do laboratório, essenciais a conclusão deste trabalho. Também registro minha gratidão ao compreender as minhas particularidades e impaciências... A “moça de Uruguaiana” se tornou um mestre exemplar! Obrigada!

Ao co-orientador Marcus Tres e ao professor Thiarles Brun, pelas excelentes contribuições com meu trabalho na fase final de escrita, contribuições estas que tornaram esta dissertação ainda mais rica de detalhes e contributiva para a ciência do mundo. Obrigada !

Aos amigos e colegas, Érika Muller, Maicon Sergio, Heloisa, Olimpio, Beatriz e Bruno, por cada auxílio prestado, desde cuidados com meu experimento, caronas, lanches e partilhas de conhecimentos. Serão essenciais na minha vida sempre. Obrigada galera linda!

Ao meu guerreiro notebook Positivo, que mesmo estragando, precisando ser formatado duas vezes.... foi essencial para conclusão deste sonho. Desculpe-me pelas vezes que ameacei quebrá-lo ou colocá-lo fora!

A Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, pela oportunidade de realizar a etapa do mestrado em uma instituição e programa de pós-graduação de renome! Tenho orgulho de dizer que sou aluna desta instituição!

A Prefeitura Municipal de São Vicente do Sul, onde sou servidora pública, em principal a Secretaria Municipal de Saúde do município, agradeço a todo amparo do transporte e companhia dos colegas motoristas, que foram essenciais para a viabilização deste mestrado. Obrigada!!

Aos “magakás” Masashi Kishimoto e Eiichiro Oda, criadores dos animes Naruto, Boruto e One Piece, pela criação destas obras lendárias e que possuem tantos fãs, sendo um deles, eu mesma. Até hoje tenho admiração por estas obras, que enaltecem: a importância de lutar pelo que se quer sem olhar para trás, a mostrar que somos capazes mesmo quando duvidam de nós, e acreditar na força da amizade e do amor! Com certeza eu seria uma ótima Hokage ou Mugiwara!

A cada desafio, a cada descoberta, a cada choro, sorriso e experiência, agradeço, pois me tornaram um melhor ser humano e uma exímia mestre!

A mim, Pauline, pela excelente persistência, coragem e determinação. Fui eu mesma quem determinou que eu estaria onde estou hoje. Eu sou uma grande mulher! Eu me amo e sou grata por mim!



## RESUMO

### **POTENCIAL FUNGICIDA E INSETICIDA DE CO-CULTIVOS DE *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Metarhizium anisopliae* PARA O MANEJO FITOSSANITÁRIO DA CULTURA DA SOJA**

AUTOR: Pauline Flores da Silva

ORIENTADOR: Giovani Leone Zabot

CO-ORIENTADOR: Marcus Vinícius Tres

O potencial de cultivo da cultura da soja sofre constantemente com a interferência de doenças e insetos-praga, principalmente doenças fúngicas e percevejos. O percevejo-marrom (*Euschistus heros*) é o mais abundante na cultura, o qual causa danos diretamente aos grãos, tornando-os chochos, e ao embrião contido na semente. Doenças fúngicas, como mofo-branco, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, podridão negra da raiz causada por *Macrophomina phaseolina* e antracnose causada por *Colletotrichum* spp. são de difícil erradicação. O controle químico de pragas e doenças vem gerando resíduos e resistência dos insetos e fungos alvos. Em contrapartida, o controle biológico tem se mostrado eficiente e de menor impacto ambiental. Neste estudo, co-cultivos e cultivos pareados de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Metarhizium anisopliae* foram realizados visando o possível desenvolvimento de um produto com efeito bioinseticida e biofungicida como incremento ao manejo sanitário da cultura da soja. Esta pesquisa proveu-se de avaliações de bioensaios de laboratório, compreendendo experimentos estatísticos. Foram realizados cultivos em meio submerso com os fungos utilizando glicose, sacarose, hidrolisado de proteína animal, hidrolisado de farelo de soja mais fósforo orgânico e hidrolisado de penas utilizando planejamento do tipo Plackett-Burman. Os caldos fermentados foram aplicados diretamente no dorso dos percevejos-marrom na fase adulta para avaliação da sua mortalidade, a qual foi comparada com a testemunha positiva. Os dados obtidos e compilados foram submetidos à análise de normalidade e homogeneidade, e por se apresentarem significativos, foram submetidos ao teste de comparação de médias pelo teste de Tukey a 95% de confiança. Constatou-se que as variáveis independentes não surtiram efeitos representativos na biomassa dos co-cultivos. Porém, elas foram significativas para o número de conídios. Os co-cultivos foram promissores em relação ao potencial inseticida para o controle biológico de *Euschistus heros*, com destaque para o cultivo de *Trichoderma harzianum*, o qual proporcionou o maior percentual de mortalidade do inseto, entre 70 e 100%. O cultivo pareado apontou controle total de *Macrophomina phaseolina* pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. A dupla

de fungos de *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae* apresentou-se efetiva contra os fitopatógenos de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum gloesporioides*, apresentando 70% de inibição. *Trichoderma harzianum* e *Metharizium anisopliae* mostraram controle de *Colletotrichum truncatum*, entre 50 e 60% de inibição. Os resultados se mostram promissores, apontando efetivas alternativas para complemento do controle biológico da cultura da soja.

**Palavras-chave:** Bioinseticida; Controle biológico; Co-cultivo; *Euschistus heros*; Fungos entomopatogênicos; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Colletotrichum gloesporioides*.

**ABSTRACT****FUNGICIDAL AND INSECTICIDAL POTENTIAL OF CO-CULTIVATION OF  
*Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* and *Metharizium anisopliae*:  
ALTERNATIVES FOR THE PHYTOSANITARY MANAGEMENT OF SOYBEAN**

AUTHOR: Pauline Flores da Silva

ADVISOR: Giovani Leone Zabot

CO-ADVISOR: Marcus Vinícius Tres

The cultivation potential of soybean crop is constantly interfered by diseases and insect pests, mainly fungal diseases and stink bugs. The brown stink bug (*Euschistus heros*) is the most abundant in the crop, which causes damage directly to the grains, making them hollow, and to the embryo contained in the seed. Fungal diseases such as white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, black root rot caused by *Macrophomina phaseolina* and anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. are difficult to eradicate. The chemical control of pests and diseases has generated residues and resistance of target insects and fungi. Otherwise, biological control has demonstrated to be efficient and has less environmental impact. In this study, co-cultures and paired cultures of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, and *Metharizium anisopliae* were carried out aiming at the development of a product with bioinsecticide and biofungicide effect as an increment to the sanitary management of the soybean crop. This research was based on evaluations of laboratory bioassays, including statistical experiments. Cultivations were carried out in submerged medium with the fungi using glucose, sucrose, hydrolyzed animal protein, hydrolyzed soybean meal plus organic phosphorus, and hydrolyzed feathers using Plackett-Burrman planning. The fermented broths were applied directly to the back of adult brown stink bugs to assess their mortality, which was compared with the positive control. The data obtained and compiled were submitted to analysis of normality and homogeneity, which they were significant. Thereafter, they were submitted to the comparison test of means by Tukey's test at 95% confidence. The independent variables did not have significant effects on the biomass of the co-cultures. However, they were significant for the number of conidia. The co-cultures were promising in terms of insecticidal potential for the biological control of *Euschistus heros*, with emphasis on the cultivation of *Trichoderma harzianum*, which provided the highest percentage of insect mortality, between 70 and 100%. The paired cultivation indicated total control of *Macrophomina phaseolina* by the entomopathogenic fungus *Metharizium anisopliae*. The fungi *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae* were effective against the pathogens of *Sclerotinia sclerotiorum* and

*Colletotrichum gloesporioides*, showing 70% inhibition. *Trichoderma harzianum* and *Metharizium anisopliae* showed control of *Colletotrichum truncatum*, between 50 and 60% inhibition. The results are promising, showing effective alternatives to complement the biological control of soybean.

**Keywords:** Bioinsecticide; Biological control; Co-culture; *Euschistus heros*, Entomopathogenic fungi; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Colletotrichum gloesporioides*.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.2. OBJETIVOS .....	17
1.2.1. Objetivo geral .....	17
1.2.3. Objetivos específicos .....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1. Cultura da soja .....	19
2.2. Controle biológico de <i>Euschistus heros</i> .....	20
2.3. Doenças fúngicas na cultura da soja: características e controle biológico .....	22
2.4. Utilização de fungos entomopatogênicos no controle biológico .....	26
2.5. Co-cultivo submerso utilizando fungos entomopatogênicos .....	27
2.6. Tendências do controle biológico .....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
3.1. Obtenção, organização, preparação e manutenção dos materiais .....	32
3.2. Co-cultivos.....	35
3.2.1. Cultivo submerso (CSu).....	36
3.3. Alvo <i>Euschistus heros</i> : investigação do potencial inseticida dos co-cultivos .....	37
3.4. Potencial fungicida contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Colletotrichum truncatum</i> e <i>Colletotrichum gloesporioides</i> .....	40
3.5. Esquema estatístico e tratamentos .....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
4.1. Conídios e biomassa dos caldos fermentados.....	43
4.2. Ação inseticida dos co-cultivos .....	48
4.3. Ação fungicida dos cultivos pareados .....	53
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	58
6. RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	59
7. REFERÊNCIAS .....	60
8. APÊNCICES .....	72
8.1 APÊNDICE A - EXEMPLO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA - SOFTWARE SISVAR ....	72
8.2. APÊNCICE C - TABELAS EXCEL® COM RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS- Mortalidades de <i>Euschistus heros</i> .....	74
8.3.1 APÊNCICE C - TABELAS EXCEL® COM RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS- Exemplo de tabela de conídios – Parte 1 .....	81
8.3.2. APÊNCICE C - TABELAS EXCEL® COM RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS- Exemplo de tabela de conídios – Parte 2.....	82

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar das adversidades climáticas que se está presenciando, a cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill), quando adequadamente manejada, vem demonstrando sucesso em seu cultivo. Podemos atribuir o sucesso ao alto valor proteico e energético do grão, o qual garante qualidade nutricional, possibilitando a industrialização do óleo comestível que é muito utilizado na alimentação humana (FREITAS, 2011).

Conforme estimado pela Companhia Nacional de Abastecimento (2023), entre o mês de março e meados do mês de abril de 2023, a colheita da soja já alcançava 74,5% da área semeada, aproximando-se dos índices registrados na safra passada. A colheita avança em todo o país, mostrando condições favoráveis ocorridas nas principais regiões produtoras. Entretanto, o Rio Grande do Sul segue com o destaque negativo nesta safra devido aos efeitos do La Niña que ocasionou quebra na produtividade de grande parte das áreas do estado (CONAB, 2023). As produtividades recordes foram registradas em vários estados, com destaque para o conjunto Matopiba e Mato Grosso, cujo as sobras compensaram as perdas registradas no Sul. Nesta safra 2022/2023, o Brasil deverá colher 153.633 mil toneladas, sendo 22,4% superior ao da safra passada. A produtividade média é de 3.527 kg/ha, registrando recordes históricos de área de plantio, produtividade e produção (CONAB, 2023).

Enfatizando-se os fatores prejudiciais à expressão do potencial produtivo da cultura da soja, destacam-se os insetos-praga por conta de sua presença durante todo o ciclo cultural, comprometendo o crescimento e desenvolvimento desejado da cultura. Em relação aos insetos-praga, os percevejos filófagos são considerados as principais pragas da cultura da soja (GODOY; ÁVILA; ARCE, 2007). Os danos causados por estes insetos geralmente são irreversíveis devido ao seu modo de ataque, diretamente nos grãos, conferindo redução severa de qualidade e produtividade. O ataque dos percevejos se dá desde a formação da vagem, fazendo com que os grãos fiquem menores que o esperado, chochos e enrugados, causando injúrias (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000) e inviabilizando a formação e desenvolvimento do embrião contido na semente.

A espécie de percevejo filófago mais abundante na cultura soja é o *Euschistus heros* (F). (Hemiptera: Pentatomidae), conhecido como percevejo marrom, com ocorrência em toda América do Sul, com maior incidência nas regiões que possuem temperaturas mais elevadas, a exemplo do norte do Paraná e o Brasil central (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999). O percevejo-marrom (hemimetabolo) desenvolve-se desde o ovo à fase adulta em 25 dias, podendo alcançar cerca de 116 dias de longevidade (PANIZZI *et al.*, 2012). Somente após o

terceiro ínstar de desenvolvimento é que o *Euschistus heros* começa a causar danos na cultura da soja.

Sobre fatores bióticos, pode-se também enfatizar a importância de distintas doenças que acometem a cultura da soja. Conforme mencionado em relação aos insetos-praga, as doenças também ocasionam prejuízos durante todo o ciclo da cultura da soja, provocando comprometimento à produtividade. Distintas doenças afetam a cultura da soja, grande parte destas causadas por distintos microrganismos, com destaque para os fungos. Dentro deste grupo, podemos destacar distintas doenças, a exemplo do mofo-branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (divisão Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae). O mofo-branco é uma das mais importantes doenças nesta cultura de grãos, tendo a possibilidade de 70% de perda de produtividade, bem como a presença em cerca de 28% da área de produção de soja no Brasil (MEYER *et al.*, 2019).

A doença do mofo-branco é severamente limitante quando as condições climáticas favorecem seu estabelecimento, pois ocorre redução severa no rendimento da cultura, devido à redução do número e peso dos grãos (HOFFMAN *et al.*, 1998; DANIELSON, NELSON, e HELMS, 2004) resultante do anelamento das hastes e ruptura do xilema e floema. Além disso, a presença de escleródios misturados nos grãos pode resultar em menores preços e a infecção por este patógeno dentro de vagens de sementes pode reduzir a quantidade de óleo e o potencial de germinação das sementes (HOFFMAN *et al.*, 1998; MUELLER, HARTMAN E PEDERSEN, 1999).

A permanência do patógeno na área de cultivo se torna um grande impasse para o controle de distintas doenças fúngicas que acometem a cultura da soja. A podridão negra da raiz, causada pelo fungo fitopatogênico *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (divisão Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaeriales, família Botryosphaeriaceae) apresenta este impasse para controle, tendo em vista a infecção das raízes da cultura da soja. O primeiro relato deste patógeno no Brasil ocorreu na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* (L).), infectando suas raízes, conforme apresentado em Bitancourt (1935).

Almeida *et al.* (2014) reportaram que os danos desse fitopatógeno para a cultura da soja foram negligenciados por vários anos por conta do aparecimento ocorrer nos estádios finais de desenvolvimento da cultura. Esta doença é considerada de difícil manejo, por conta da inexistência de controle químico e cultivares resistentes, e por conta da polifagia do fungo, que torna ineficiente o manejo através da rotação de culturas (MENGITSU *et al.*, 2014).

Marquez *et al.* (2021) apontam que agentes de controle biológico têm recebido atenção crescente nas últimas décadas. Alguns impactam os patógenos diretamente, inibindo seu

crescimento, enquanto outros afetam o patógeno indiretamente, desencadeando vias de defesa na planta hospedeira. Para os autores, os fungos *Trichoderma* spp. são eficazes para vários fungos patogênicos de solo, incluindo a *Macrophomina phaseolina*. Estes fungos desenvolvem múltiplos mecanismos antagônicos, como competição de nutrientes, produção de antibióticos e microparasitismo. Além disso, algumas espécies são conhecidas por seus efeitos na saúde das plantas, como os efeitos de promoção do crescimento das plantas ou a capacidade de aumentar a resistência sistêmica (MARTINEZ e MEDINA *et al.*, 2016).

Fungos patogênicos de solo são difíceis de serem erradicados. Porém, como já mencionado, a utilização de plantio direto e outras práticas de manejo da área de cultivo, principalmente no que se refere a restos culturais, contribuem significativamente como estratégia de controle de fungos patogênicos. Os fungos do gênero *Colletotrichum* sp. (Divisão: Ascomycota, Classe: Sordariomycetes, Ordem: Glomerellales, Família: Glomerellaceae) são causadores da antracnose, uma conhecida doença de final de ciclo da soja.

A antracnose é uma doença fúngica causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum*, podendo afetar a fase inicial da formação de vagens, favorecida por condições de elevadas precipitações e altas temperaturas (GRIGOLLI, 2015). Os sintomas da antracnose, destacados por Henning *et al.* (2014), além do tombamento de plântulas, incluem manchas negras nas nervuras das folhas, hastes e legumes, podendo haver queda total de legumes e/ou deterioração de sementes em casos em que há condições favoráveis ao desenvolvimento da doença e atraso na colheita da soja. Essa doença pode induzir o apodrecimento e queda de vagens, abertura de vagens imaturas e germinação prematura de grãos, resultando em um número reduzido de vagens, retenção foliar e esverdeamento do caule (HARTMAN *et al.*, 2015).

Conforme Meyer e Klepker (2007), o controle da antracnose possui mais eficiência quando adotadas as seguintes medidas: rotação de culturas, utilização de sementes saudáveis, tratamento de sementes com fungicidas adequados, manejo adequado da fertilidade e física do solo, para proporcionar o melhor desenvolvimento radicular possível para as plantas. Os autores também apontam que as observações a campo mostram que a incidência de antracnose é menos severa nos sistemas de semeadura direta e em áreas com cobertura morta originária de plantas não hospedeiras do patógeno, reforçando a importância do manejo da área de cultivo.

Embora o método mais adotado para o controle de pragas e doenças ainda seja o controle químico, quando utilizados de maneira massiva e incorreta ocasiona distintos problemas, como resíduos e resistência dos insetos alvo ao inseticida aplicado. Um método de controle que vem se mostrando bastante eficiente e menos prejudicial ao ambiente é o controle biológico (ZAMBIAZZI *et al.*, 2011). Os fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle



devido ao amplo espectro de ação sobre o inseto alvo, podendo infectar as diferentes fases de desenvolvimento, como ovos, ninfas, larvas, pupas e adultos (ALVES, 1998). O fato de não necessitar a ingestão direta dos patógenos torna possível a infecção do inseto através do contato físico (ERTHAL JUNIOR, 2011), configurando outra vantagem da utilização desse microrganismo.

Sabendo-se da importância destes fungos, bem como de outros microrganismos entomopatogênicos no controle de insetos-praga e doenças, e conhecendo a representatividade de dano do percevejo-marrom e das doenças fúngicas como mofo-branco na cultura da soja, novos estudos relacionados a essas patogenicidades podem contribuir como instrumento adicional ao seu controle, promovendo informações científicas para técnicos, pesquisadores e agricultores. Impulsionada pela criação de um instrumento de controle adicional para as fitopatogênias mencionadas, esta Dissertação de Mestrado experimentou a realização de co-cultivo e cultivo pareado dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuill., *Trichoderma harzianum* Rifai e *Metarhizium anisopliae* para produção de metabólitos com efeitos inseticida e fungicida para o controle biológico do inseto praga *Euschistus heros* e dos fungos *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *C. truncatum* e *C. gloesporioides* na cultura da soja. A execução desta Dissertação de Mestrado buscou uma contribuição efetiva ao manejo integrado de pragas, proporcionando alternativas para um manejo fitossanitário mais efetivo da cultura da soja, cuja necessidade de aprimoramento é constante.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo geral

Realizar o co-cultivo dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Metarhizium anisopliae* para investigar seu potencial de controle do inseto-praga *Euschistus heros*, bem como o potencial destes fungos no controle de doenças fúngicas causadas por *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Colletotrichum truncatum* na cultura da soja.

### 1.2.3. Objetivos específicos

Para atender ao objetivo geral, fez-se necessário o cumprimento dos seguintes objetivos específicos:

1. Experimentar o co-cultivo submerso usando os três fungos (*Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Metarhizium anisopliae*) em estudo;

2. Identificar as variáveis e níveis no co-cultivo que conferem maior biomassa seca de caldo fermentado e números de conídios;
3. Avaliar os agentes fúngicos obtidos a partir dos caldos fermentados como agente inseticida;
4. Avaliar o potencial fungicida através dos fungos patogênicos isolados e cultivados em dupla e trio.

### **1.3. JUSTIFICATIVA**

As justificativas para a realização deste estudo são:

- Utilização diferenciada de cepas microbianas com efeito inseticida e fungicida já conhecidos sobre boa parte das pragas que afetam a cultura da soja;
- Escassez de informações sobre o tipo de cultivo em estudo, podendo gerar publicações científicas, além de incentivar novas pesquisas nesta mesma área de investigação;
- Escassez de estudos sobre o controle biológico das doenças e inseto-praga em destaque neste estudo;
- Necessidade de redução de custos de produção agrícola, permitindo um controle de pragas eficaz com menor custo e com apelo ambiental.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Cultura da soja

Pertencente à família Fabaceae, a cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill) possui importância significativa para a economia regional, nacional e mundial em função de seu potencial como *commoditie* agrícola. O mencionado potencial é atribuído aos valores proteico e energético do grão que possibilitam a industrialização de óleo comestível, muito utilizado na alimentação humana (FREITAS, 2011), assim como outros produtos e subprodutos, utilizados amplamente na alimentação animal.

Apesar do alto potencial econômico e energético, a soja tende a sofrer variações na produtividade devido a adversidades climáticas e sanitárias, dentre outras, como toda e qualquer cultura. Não é apenas a questão climática adversa que atingiu grandes regiões produtoras do Brasil que determina o potencial de cultivo da cultura da soja. Como anteriormente mencionado, assim como de outras culturas de grãos, a soja sofre interferência de distintos fatores, sejam bióticos e/ou abióticos, que também podem desencadear quebras de produção irreversíveis e, conseqüentemente, prejuízos financeiros aos produtores. Na safra 2021/2022 atípica para a produção de soja e outras culturas ditas “de verão”, além do essencial manejo fitossanitário, a chave para manter o alto potencial produtivo foi a escolha adequada de cultivares, atentando a época de plantio, ciclo, grupo de maturidade relativa e manejo da irrigação.

Apesar das adversidades encontradas para a produção de soja na safra 2021/2022, os altos preços médios de importação desta *commoditie* agrícola subiram 41,4% em relação ao ano de 2021 (MAPA, 2022). Vale ressaltar que o complexo soja (grãos, farelo e óleo) é o principal setor exportador do agronegócio brasileiro, com vendas de US\$ 8,09 bilhões em abril de 2022 (MAPA, 2022).

A soja é um alimento básico do setor e da pauta exportadora do agronegócio brasileiro. As exportações de soja em grãos do Brasil atingiram US\$ 6,73 bilhões (+1%) em abril de 2022, com as exportações caindo de 16,1 milhões de toneladas em abril de 2021 para 11,5 milhões de toneladas em 2022 (-28,8%). A China foi o maior comprador de soja (grão) do Brasil em 2022 com 7,5 milhões de toneladas (-35,2% em relação a 2021) e 65,6% do total exportado. A associação Europeia foi o principal destino do farelo de soja no Brasil, com US\$ 434,60 milhões (+43,3% em relação a 2021). Outros importadores importantes foram Vietnã (US\$ 133,74 milhões; + 335,3% em relação a 2021); Indonésia (\$ 121,87 milhões; + 154,8% em relação a

2021); e Tailândia (US\$ 112,28 milhões; + 15,5% em relação a 2021). No setor, as exportações de óleo de soja subiram para US\$ 415,71 milhões (+81,3% em relação a 2021) no mês em análise (abril/2022). O volume de vendas no exterior aumentou 24,6% para 260,2 mil toneladas (MAPA, 2022).

Destacando-se o Produto Interno Bruto do Brasil (PIB), a cultura da soja é considerada a cultura de maior “peso” no PIB, conforme apontam o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), a Escola Superior Agrária Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) (2022). Conforme estas entidades, o PIB apresentou recuo de 0,8% no primeiro trimestre de 2022, sendo esse resultado decorrente em grande medida da forte alta dos custos com insumos, tanto na agropecuária quanto nas agroindústrias, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de custos de produção versus preço recebido - agricultura e pecuária em geral

	<b>Insumos</b>	<b>Primário</b>	<b>Agroindústria</b>	<b>Agrosserviços</b>	<b>Total</b>
<b>Agronegócio</b>	9,61	-2,48	-0,43	-1,51	-0,80
<b>Ramo agrícola</b>	13,77	-4,22	-0,10	-1,29	-0,75
<b>Ramo pecuário</b>	-2,53	1,18	-1,89	-2,18	-0,96

Fonte: Cepea, Esalq/USP e CNA, 2022

## 2.2. Controle biológico de *Euschistus heros*

O potencial de cultivo da soja sofre interferência de distintos fatores, bióticos e/ou abióticos, os quais desencadeiam distintos prejuízos aos produtores. Enfatizando fatores bióticos, destacam-se os insetos-praga, cuja presença compromete o sucesso do seu crescimento e desenvolvimento. Considera-se os percevejos filófagos como as principais pragas da soja (GODOY; ÁVILA; ARCE, 2007), devido aos danos causados geralmente serem irreversíveis, tendo em vista o ataque direto aos grãos, reduzindo qualidade e produtividade. O ataque de percevejos se dá desde a formação da vagem, fazendo com que os grãos fiquem pequenos, chochos e enrugados, causando injúrias (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000).

O percevejo filófago mais abundante na cultura soja é o *Euschistus heros* (F). (Hemiptera: Pentatomidae), conhecido como percevejo marrom, com ocorrência registrada em toda América do Sul, apresentando maior incidência em regiões com temperaturas elevadas, como o norte do Paraná e o Brasil central (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999). O desenvolvimento deste percevejo (do ovo à fase adulta), ocorre em média em 25 dias, podendo

alcançar cerca de 116 dias de longevidade (PANIZZI *et al.*, 2012). Somente após o terceiro ínstar de desenvolvimento é que o *Euschistus heros* começa a causar danos na cultura da soja. Este inseto pode completar três gerações na mesma área, dependendo das condições ambientais e da disponibilidade de alimento, tendo em vista sua capacidade de permanecer em estado de hibernação parcial, desde a colheita da soja até a nova semeadura.

O maior aumento populacional deste inseto na cultura da soja ocorre entre os estádios de desenvolvimento V4 e V5 (quatro e cinco nós) das plantas. Os maiores danos são causados a partir do estágio R4 (completo desenvolvimento da vagem/legume), com tendência de aumento populacional nos estádios R5 (enchimento de grão) e R7 (início da maturação fisiológica), quando pode atingir seu pico (NORA, 2020). Enfatiza-se os estágios em que este inseto praga ataca a cultura da soja, pois apresentam-se como estágios de definição do sucesso da produtividade da cultura, severamente comprometidos caso sofram danos bióticos e abióticos.

As frequentes aplicações de produtos químicos sintéticos na cultura da soja, desde os estádios de desenvolvimento vegetativo da cultura até estádios finais de maturação fisiológica, são ressaltadas por Daniel (2019). Conte *et al.* (2018) verificaram que a média de pulverizações com uso de inseticidas químicos sintéticos, para o complexo de percevejos na safra 2017/2018, foi de 1,51 vezes, sendo 1,06 vezes somente para a espécie *E. heros*. Nos agroecossistemas de soja, o controle de pragas geralmente é realizado por meio de manejo integrado de pragas, sendo um conjunto de métodos e ferramentas variadas utilizado para manter a população das pragas abaixo do nível econômico de danos que elas podem gerar para a cultura (BON, 2021).

O controle biológico está entre os pilares do manejo integrado de pragas, através do uso de inimigos naturais, importante para a redução dessas pragas. Esse modelo de controle é realizado por meio da ação de predadores, parasitoides ou entomopatógenos que já estavam ou que foram alocados no agroecossistema com o propósito de reduzir de forma natural a população de pragas do ambiente (BUENO *et al.*, 2012; EMBRAPA, 2020).

Ao encontro das ressalvas de Daniel (2019), o estudo conduzido por Silva-Santa *et al.* (2021) buscou selecionar isolados de *Beauveria bassiana* com alta virulência contra o percevejo-marrom, motivados pelo conhecimento da baixa suscetibilidade natural do percevejo-marrom aos isolados químicos conhecidos. No estudo conduzido por Silva-Santana *et al.* (2021), o isolado Unioeste 76 (*B. bassiana* lato sensu) foi selecionado devido a sua maior atividade inseticida (96% de mortalidade do inseto;  $1 \times 10^8$  conídios/mL), comprovando o potencial do fungo. As abordagens de Daniel (2019) e Silva-Santana *et al.* (2021) corroboram o estudo de Sujji *et al.* (2022), e reforçam sobre o uso do controle biológico de pragas,

enfatizando que esta prática melhora a qualidade do produto agrícola, reduz a poluição ambiental e contribui para a preservação dos recursos naturais, sendo uma ferramenta importante para a sustentabilidade da agricultura.

Até o presente momento, encontramos apenas um registro de bioinseticida para controle do percevejo marrom no Brasil (MAPA, 2019), sendo este uma combinação de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. O respaldo trazido pela literatura evidencia a necessidade de alternativas menos agressivas para o controle de insetos-praga para a cultura da soja, a fim de minimizar os danos ambientais sem prejudicar a alta produtividade da cultura.

### **2.3. Doenças fúngicas na cultura da soja: características e controle biológico**

Os fungos constituem o maior grupo de patógenos radiculares e foliares, podendo ocorrer em todos os tipos de sistemas agrícolas, causando doenças nas principais espécies cultivadas, com variada gama de sintomas (BELLÉ e FONTANA, 2018). Grande parte dos fungos habitantes do solo possui alta capacidade de competição saprofítica e pode sobreviver nos resíduos de plantas introduzidos no solo, mantendo-se em elevadas densidades populacionais mesmo durante longos períodos de rotação de culturas (BELLÉ e FONTANA, 2018). Outros fungos que vivem nesse ambiente produzem estruturas como agregados miceliais, esclerócios, oósporos, clamidósporos ou outros tipos de esporos, que resistem às condições ambientais adversas e permanecem viáveis quando as plantas hospedeiras não estão presentes (BELLÉ e FONTANA, 2018).

Por conta deste conjunto de características, conseguimos compreender o que se observa no dia-a-dia das lavouras comerciais: uma vez que são introduzidos na área de plantio, é praticamente impossível a eliminação dos fungos fitopatogênicos desta área. O fitopatógeno fúngico necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* é um patógeno de importância mundial. Ele se apresenta de modo endêmico para a maioria regiões temperadas, subtropicais e tropicais, causando doença do molde em uma ampla gama de hospedeiros (COLEY-SMITH e COOKE, 1971; BOLAND e HALL, 1994; BOLTON *et al.*, 2006).

A importância deste patógeno é justificada pela agressividade do mofo-branco e ampla gama de hospedeiros. Isto restringe muito as opções para rotação de culturas nas áreas infestadas. Praticamente só as gramíneas não são hospedeiras de *S. sclerotiorum*. O patógeno também se destaca pela sua proliferação relativamente rápida dentro da lavoura, pois cada planta afetada pode produzir dezenas de escleródios, facilmente disseminados com o trânsito

de implementos agrícolas e colhedoras (LOBO JUNIOR, 2011). Na cultura da soja, essa doença é severamente limitante, conferindo prejuízo ao rendimento da cultura devido à redução do número e peso dos grãos por conta do anelamento das hastes e ruptura do xilema e floema (HOFFMAN *et al.* 1998; DANIELSON, NELSON e HELMS 2004).

Sabe-se que a estratégia de controle mais utilizada para o controle fitossanitário na cultura da soja, assim como nas demais culturas de grãos, ainda é o controle químico. A maioria dos fungicidas usados no controle de *S. sclerotiorum* são classificados como carbamatos de metil benzimidazol (por exemplo, tiofanato-metil), inibidores de succinato desidrogenase (por exemplo, boscalid), inibidores de desmetilação (por exemplo, flutriafol, prothioconazol e tetraconazol) e inibidores de quinona (por exemplo, fluoxastrobina, picoxistrobina e trifloxistrobina) (ARMANDO *et al.*, 2015; Di *et al.*, 2016; HUZAR- NOVAKOWISKI *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2015; PELTIER *et al.*, 2012).

Conforme Willbur *et al.* (2018), as linhas de pesquisas buscam o aprimoramento do controle biológico de *S. sclerotiorum*, incentivando a inclusão deste como parte do manejo fitossanitário da cultura da soja, a fim de reduzir as massivas aplicações de fungicidas químicos. Zeng *et al.* (2012) observaram reduções da incidência de mofo-branco em soja utilizando o fungo entomopatogênico *Coniothyrium minitans*, a bactéria *Streptomyces lydicus* e o fungo *Trichoderma harzianum*. Embora os microrganismos estudados por Zeng *et al.* (2012) tenham demonstrado redução efetiva da severidade do mofo-branco e proporcionado aumento no rendimento de sementes, ensaios de campo usando agentes de controle biológico ainda são limitados. Várias cepas de *Trichoderma* spp. apresentaram habilidades diferenciais para parasitar *S. sclerotiorum* (HADDAD *et al.*, 2017). Porém, verifica-se a necessidade de mais estudos para medir a eficácia e consistência do controle biológico utilizando fungos e potencialmente outros microrganismos para controlar *S. sclerotiorum* (WILLBUR *et al.*, 2018).

Causada pelo fungo fitopatogênico *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, a podridão negra da raiz afeta distintas espécies vegetais. O primeiro relato deste patógeno no Brasil ocorreu na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* (L).), infectando suas raízes, conforme reportado por Bitancourt (1935). Almeida *et al.* (2014) apontaram os anos de negligência dos danos desse fitopatógeno na cultura da soja devido ao aparecimento dos sintomas da doença ocorrerem nos estádios finais de desenvolvimento da cultura.

Conforme Boaretto e Daneli (2012), o fungo *M. phaseolina* se caracteriza por produzir microescleródios, que são estruturas de resistência formadas pela compactação de hifas, de coloração escura devido à presença de melanina. Eles se formam em grande abundância nos tecidos radiculares infectados, conferindo aspecto encarvoado ou cinzento às raízes infectadas.

Estes microescleródios permitem ao fungo sobreviver no solo e constituem a principal fonte de inóculo primário da doença (BOARETTO e DANIELI, 2012). Esta doença resulta em maturação precoce e desuniforme, além do incompleto enchimento de grãos, levando a perdas de rendimento da cultura. Após a morte da planta, a colonização por micélio e a formação de microescleródios em tecido hospedeiro continuam até que os tecidos ficam secos, momento em que os microescleródios são liberados no solo e o ciclo da doença continua (VINHOLES, 2014).

Os danos são maiores quando as plantas próximas à maturação sofrem estresse hídrico e estão sob alta temperatura (28 a 35°C) (BOARETTO e DANIELI, 2012). Não há fungicidas registrados para esta doença no Brasil (MAPA, 2022). Por conta da ampla gama de hospedeiros deste patógeno, a rotação de culturas é difícil de implementar. Almeida *et al.* (2001) observaram redução desta doença em campos com sistema de plantio direto, onde a palhada da cultura de inverno deixada na superfície do solo contribuiu para a diminuição da temperatura e aumento da umidade. Para Gupta *et al.* (2012), o método de controle ideal para esta doença seria o uso de cultivares resistentes. No entanto, nenhuma fonte de resistência genética foi encontrada. Essa questão levantada pelos autores reforça a importância da atuação do controle biológico para doenças em soja, ressaltando a pouca eficiência dos métodos de controle mais utilizados, e a necessidade de alternativas para doenças como essa, que basicamente não possuem controle comprovado.

Encontram-se poucos estudos relacionados ao controle biológico de *M. phaseolina*, e quando encontrados, estes foram realizados utilizando-se bactérias entomopatogênicas. Um exemplo a ser citado é o estudo realizado por Dey, Dutta e Majumdar (2019), onde foram fornecidas fortes evidências de que a bactéria endofítica *Klebsiella pneumoniae* HR1 possui grande potencial como candidata para o biocontrole de *M. phaseolina*, bem como promotor de crescimento de plantas. Este estudo aponta um caminho positivo para a investigação do potencial de outros microrganismos para o controle biológico desta doença na cultura da soja.

Distintas doenças afetam a cultura da soja, e grande parte delas possui controles alternativos ao controle químico, principalmente no que se refere ao manejo da área de cultivo, de restos culturais e utilização de semente certificada para o plantio. Uma destas importantes doenças é a antracnose, que pode causar danos graves à cultura da soja, principalmente sob condições de alta temperatura e umidade (MORAES, BONALDO e GASPARETTO, 2020). Os sintomas são lesões escuras, deprimidas e irregulares nas vagens, folhas, caules e pecíolos. A antracnose pode induzir o apodrecimento e queda de vagens, abertura de vagens imaturas e germinação prematura de grãos, resultando em número reduzido de vagens, retenção de folhas e caule verde (HARTMAN *et al.*, 2015).



A associação patógeno-semente é a causa mais eficaz de uma epidemia. *Colletotrichum* sp. é capaz de estabelecer infecção latente sem qualquer sintoma visível ou causar lesões nos cotilédones, e tombamento pré- e pós-emergência nas fases de desenvolvimento V1 e V2. Essa infecção resulta em perdas na qualidade fisiológica das sementes, como germinação, viabilidade e vigor (BEGUM *et al.*, 2008).

Quanto maior for o índice de chuvas na colheita, maior aumento o de sementes infectadas, que irão gerar plântulas necrosadas nos cotilédones, podendo se estender para o hipocótilo, causando tombamento (MEYER e KLEPKER, 2007). Esta situação é mais intensa quando o período de emergência é sucedido de chuvas abundantes e houver elevada fonte de inóculo em restos de cultura. O fungo também pode causar o apodrecimento da semente no solo antes da emergência (HENNING *et al.*, 2005). O patógeno mais comum associado à antracnose da soja é *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore, mas outras espécies menos comuns também já foram identificadas nas lavouras do Brasil, a exemplo de *C. cliviae* e *C. gloesporioides*.

Os resultados obtidos por Moraes, Bonaldo e Gasparetto (2020) indicam uma ampla variação morfológica nos isolados de *Colletotrichum* na área de cultivo de soja no Estado de Mato Grosso, Brasil. O grande potencial de impacto na taxa de germinação de sementes indica que há mais de uma espécie de *Colletotrichum* sp. capaz de causar antracnose na cultura da soja devido à diversidade populacional identificada, o que demonstra a necessidade de expansão de estudos nesta linha de pesquisa. Comparando-se as espécies de *C. truncatum* e *C. gloesporioides* na soja em Taiwan (Ásia), Chen *et al.* (2006) concluíram que *C. truncatum* é significativamente mais virulento, enquanto *C. gloesporioides* produz lesões mais graves nas folhas e vagens da planta.

O controle biológico tem crescido nos últimos anos e o uso de fungos e bactérias pode ser uma alternativa para o controle de pragas e doenças em diversas culturas. Dentre os microrganismos de maior destaque no controle biológico está o gênero *Trichoderma* (OLIVEIRA, 2020). O controle biológico surgiu como abordagem ecologicamente correta para superar os problemas causados pelos métodos químicos convencionais, pois além de apresentar especificidade ao alvo, utiliza diversos modos de ação para atingi-lo. Ademais, por meio do controle biológico é possível interferir no ciclo de doenças contribuindo para a redução de sintomas e aumento de produtividade (OLIVEIRA, 2020).

Através do que foi abordado, fica evidente a necessidade da realização de estudos relacionados ao controle biológico de doenças fúngicas da cultura da soja. Isto, possivelmente,

pode gerar uma contribuição significativa para o manejo fitossanitário desta importante cultura para o agronegócio brasileiro.

#### **2.4. Utilização de fungos entomopatogênicos no controle biológico**

A busca por maior sustentabilidade nos sistemas de produção, visando a redução do uso de agrotóxicos e melhores condições ambientais e de qualidade de vida, vêm fazendo com que os agricultores adotem técnicas de manejo sustentáveis para o controle de pragas, a exemplo do controle biológico (PARRA *et al.*, 2002; NAVA, 2007). Em vista disso, o controle biológico constitui uma tática muito importante e fundamental para os programas de manejo integrado de pragas a fim de ser uma alternativa viável ao uso unilateral de produtos químicos de amplo espectro de ação (CRUZ, 1994).

Entre os agentes de controle biológico mais utilizados, estão os fungos entomopatogênicos, os quais compõem grande parte dos inseticidas microbianos comercializados no mundo e no Brasil, sendo o princípio ativo de cerca de 60% dos bioinseticidas (LACEY *et al.*, 2015; MASCARIN *et al.*, 2018). Estes fungos possuem a capacidade de regulação de diversas espécies de artrópodes-praga, por conta da habilidade de infectar os hospedeiros através da cutícula e causar sua morte (VEGA *et al.*, 2012; LACEY *et al.*, 2015). Na agricultura, sua utilização é feita pela liberação de um grande número de propágulos, a fim de potencializar o equilíbrio ecológico entre o agente de controle e a praga alvo.

*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912 é o fungo entomopatogênico mais utilizado no mundo no controle de diversos artrópodes (ARTHURS e DARA, 2018). Além da *B. bassiana*, várias cepas de *Trichoderma* spp. apontam habilidades diferenciais para parasitar *S. sclerotiorum* (HADDAD *et al.*, 2017). Distintas linhas de pesquisa buscam pelo aprimoramento do controle biológico, incentivando a adoção deste como parte do manejo fitossanitário. Como exemplo, no controle do mofo-branco, um conhecido fungo entomopatogênico é o *Coniothyrium minitans* (HUANG e HOES, 1976) que parasita hifas e escleródios, sendo um microorganismo de controle biológico amplamente utilizado para o controle dessa doença. *Coniothyrium minitans* pode diminuir os escleródios em até 95%, sendo que Zeng *et al.* (2012) observaram maiores reduções de *S. sclerotiorum* em soja usando *C. minitans* (68%) em comparação com a bactéria *Streptomyces lydicus* (43,1%) e o fungo *Trichoderma harzianum* (35%). Mesmo assim, todos demonstraram reduzir efetivamente a

severidade da doença, proporcionando aumento do rendimento de grãos (SESAN e CSEP, 1995).

Apesar do aprimoramento e incentivo à adoção do controle biológico no manejo fitossanitário na cultura da soja e demais culturas de grãos, é evidente a necessidade do desenvolvimento de mais estudos nesta linha de pesquisa. Isto é importante a fim de conferir a eficácia de distintos microrganismos e contar com mais produtos registrados e acessíveis ao mercado.

## **2.5. Co-cultivo submerso utilizando fungos entomopatogênicos**

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. Com observações ao longo dos tempos, ficou comprovado que esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrário do que acontecia antigamente, quando resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou destinados sem o devido tratamento para ração animal ou adubo, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (ROCHA, 2010).

Percebendo a necessidade de bioconversão de resíduos, a indústria vem buscando metodologias que otimizem estes processos, fazendo com que se tornem mais eficientes em termos de qualidade, energia, tempo e economia (GOGATE; KABADI, 2009). Dentre estas metodologias, podemos destacar as distintas fermentações utilizadas, como a fermentação submersa e a fermentação sólida. Destacando a fermentação submersa, pode-se afirmar que esta é mais comumente empregada industrialmente para a produção de uma grande gama de produtos microbianos, e frequentemente utilizada na produção de produtos voltados à agricultura, a exemplo dos bioherbicidas (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; KLAIC *et al.*, 2015).

Define-se fermentação submersa como a fermentação na presença de excesso de água, sob agitação, onde ocorre a produção de biomassa e metabólitos secundários (SINGHANIA *et al.*, 2010). Dentre as distintas vantagens da fermentação submersa, podemos destacar a redução das possibilidades de contaminações, e maior facilidade de recuperação do produto desejado. As condições do processo fermentativo, como meio utilizado, tempo de fermentação, agitação, aeração, temperatura, pH, tempo de incubação, entre outros, influenciam diretamente na produção de biomassa e metabólitos secundários (ASH, 2010; SAEED *et al.*, 2022). Por outro

lado, a produção a partir da fermentação sólida, cuja base é o uso de cereais ou grãos pré-cozidos como substrato, consiste em uma técnica simples, pouco automatizada, mas de boa eficiência (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Segundo Bettiol e Morandi (2009), para a multiplicação *in vitro* de fungos são adotadas as técnicas de fermentação sólida ou semissólida e o processo bifásico, que envolve tanto a fermentação líquida como a sólida. Nesse contexto, as atividades de fermentação desempenham um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos e líquidos em virtude do crescimento microbiano, pois ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, como para a indústria de produtos de controle biológico.

Na literatura científica podem ser encontrados relatos descrevendo o processo de multiplicação desses fungos. O uso de espécies de fungos responsáveis por controlar biologicamente inúmeras pragas e doenças tem possibilitado grandes ganhos à agricultura, sendo vários os casos de sucesso citados na literatura, como o caso relatado para *Beauveria bassiana* (NEVES *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2018), *Metarhizium anisopliae* (GARCIA *et al.*, 2006; GROTH *et al.*, 2017) e *Isaria* sp. (LORENCETTI *et al.*, 2018), dentre outros. Dentre estes, os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*, com 254 espécies descritas (BISSETT *et al.*, 2015), compreendem um grupo de microrganismos de grande importância no que se refere aos micopesticidas.

Embora sejam conhecidos casos de sucesso na utilização de *Trichoderma* sp. como agente de biocontrole na agricultura, bem como as técnicas de multiplicação deste e de outros microrganismos (CARVALHO *et al.*, 2015; AL-HAZMI & TARIQJAVEED, 2016; MESQUITA *et al.*, 2017; HANADA & COSTA, 2018), relatos desses procedimentos na literatura, sob condições “*on farm*”, permanecem escassos (BERNARDO *et al.*, 2019), o que gera uma interessante lacuna para quem deseja utilizar desta linha de pesquisa. Com visão distinta, Lana *et al.* (2019) relataram que nos últimos anos, no estado de Goiás, diversos produtores rurais têm adotado o sistema “*on farm*” em suas fazendas, buscando produzir biopesticidas em geral, com foco nos que possuem como base a bactéria de *Bacillus thuringiensis*, conhecido como “BT caseiro”. Porém, ao avaliarem as amostras de BT produzidas em sistema “*on farm*” nas propriedades rurais de Goiás, Lana *et al.* (2019) observaram um elevado índice de contaminação por diferentes espécies de bactérias patogênicas, apontando o produto como inadequado para uso como biopesticida, devido ao potencial risco para humanos e animais.

Bernardo *et al.* (2019), apesar de considerar escassos os estudos na linha de pesquisa “*on farm*”, realizaram uma análise da coleta e uso de isolados em lavouras comerciais, apontando esta como uma eficiente estratégia de controle. Os autores demonstraram uma técnica simples de isolamento de *Trichoderma* sp. no campo, passível de ser reproduzida por agricultores, utilizando iscas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Após coletarem as iscas e colocá-las em câmara, após sete dias, os autores observaram o crescimento aparente de colônias de *Trichoderma* sp. e outros fungos entomopatogênicos. Portanto, os resultados obtidos por Bernardo *et al.* (2019) ressaltam o forte potencial dessa ferramenta de controle biológico, considerada fácil de ser praticada pelos agricultores, além da possibilidade real de isolar fungos do gênero *Trichoderma* de forma simples a partir do solo da própria fazenda.

Percebe-se uma gama de possibilidades do cultivo de fungos entomopatogênicos, seja “*on farm*” ou em larga escala, que conduzidos com as técnicas adequadas, principalmente no que tange o controle da contaminação e preservação de células, produz resultados eficientes e promissores. Dentro destas possibilidades, há a alternativa de co-cultivo, o qual envolve dois microrganismos ou mais através das interações entre espécies em um mesmo ambiente confinado, que pode ser conseguida por meio sólido ou líquido (BERTRAND *et al.*, 2014; BORUTA; MILCZAREK; BIZUKOJC, 2019; HARWANI; BEGANI; LAKHANI, 2018). As culturas confinadas interagem entre si por meio do contato célula a célula, ou molécula sinalizadora, que podem levar a descoberta de novas substâncias químicas (HARWANI; BEGANI; LAKHANI, 2018).

Zhu *et al.* (2011) ressaltam a atenção que o co-cultivo vem recebendo ao longo dos anos, exemplificando a interação em co-cultivo de duas ou mais cepas fúngicas. Geralmente derivadas do mar, podem imitar seu ambiente natural e/ou induzir outras interações biossintéticas. Esses co-cultivos objetivam identificar novas células produzidas por diferentes vias biossintéticas (ZHU *et al.*, 2011).

Ao encontro do objetivo de Zhu *et al.* (2011), Qi *et al.* (2022) observaram que o rendimento de uma espécie de gíngenosídeo, componente da planta medicinal *Panax ginseng* L., foi aumentado pela co-cultivo com o fungo *Aspergillus niger*. Esses estudos mostraram as diferentes possibilidades que o co-cultivo pode trazer. Todavia, a existência de distintos microrganismos no mesmo meio de cultivo pode afetar a morfologia do microrganismo, seu desenvolvimento e síntese de metabólitos secundários (SANDLAND; RODGERS; MINCHELLA, 2007).

O co-cultivo fúngico, em especial por via submersa que visa a produção de metabólitos secundários, ainda é pouco explorado e requer maiores investigações (BORUTA;

MILCZAREK; BIZUKOJC, 2019). Partindo das limitações de tempo e trabalho operacional encontradas nos métodos de multiplicação de fungos descritos em grande parte das literaturas relacionadas, fica evidente a necessidade da publicação de dados referentes a estes processos, bem como a oportunidade de unir um ou mais processos destes, com o intuito de ampliar o poder de controle dos microrganismos entomopatogênicos.

## **2.6. Tendências no manejo integrado de pragas**

O uso de compostos químicos sintéticos tem sido o principal meio de controle de pragas há muitos anos. Embora a contribuição destes compostos seja significativa para a produção agrícola, seu uso intensivo e indiscriminado favorece o surgimento de pragas secundárias, bem como a seleção de populações resistentes a esses produtos. Além disso, estes compostos são altamente tóxicos, extremamente prejudiciais ao ambiente e à saúde humana (MARQUES *et al.*, 2004). Um método de controle que vem se mostrando bastante eficiente e menos prejudicial ao ambiente é o controle biológico (ZAMBIAZZI *et al.*, 2011).

Mishra, Kumar e Malik (2016) ressaltam a prática comum do uso de inseticidas e outros pesticidas químicos em todo o mundo, apontando que esse uso constante afetou o meio ambiente, contaminando o solo, o ar e água, além de impactar negativamente a saúde pública, as plantas e os animais, sendo também apontado por Sharma *et al.* (2014) *apud* Mishra, Kumar e Malik (2016). A volatilidade potencial e a deriva de pesticidas químicos podem levar a contaminação ambiental generalizada por quilômetros de distância (MISHRA, KUMAR e MALIK, 2016). Além de matar insetos e ervas daninhas, os pesticidas podem se tornar tóxicos para uma série de outros organismos, como pássaros, peixes, insetos benéficos e plantas não-alvo.

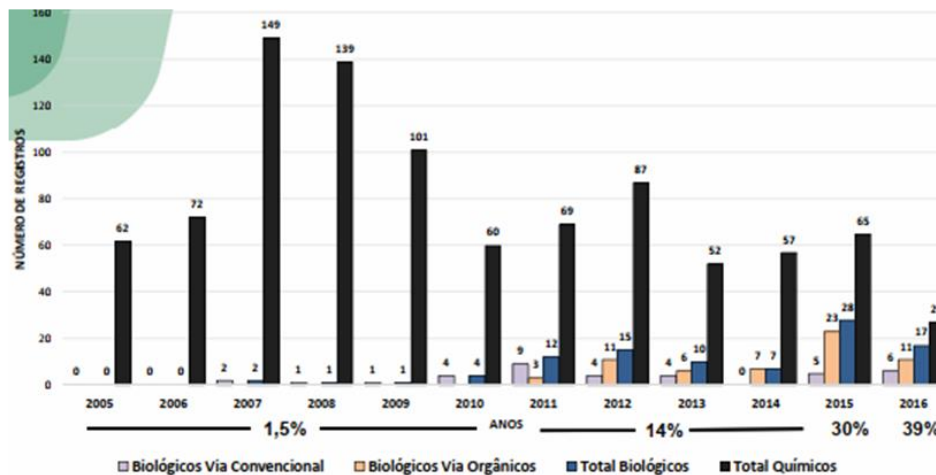
Aktar *et al.* (2009) *apud* Mishra, Kumar e Malik (2016) apontam que, em humanos, a exposição a baixas doses de pesticidas associa-se a supressão imunológica, interrupção hormonal, anormalidades reprodutivas e neurais. A este respeito, inseticidas biológicos com base em fungos entomopatogênicos estão alcançando destaque no manejo de pragas (MISHRA, KUMAR E MALIK, 2016). A nível de Brasil, o futuro para o controle biológico está nas mãos da legislação específica, do registro de novos produtos e do incentivo para novas pesquisas destinadas a essa temática, conforme resume Dias (2016).

Conforme pode-se observar na Figura 2 abaixo, os produtos biológicos, sejam eles registrados para utilização na agricultura orgânica ou agricultura convencional, apesar de apresentarem crescimento no número de registros no Ministério da Agricultura, ainda possuem

menos produtos registrados quando comparados aos produtos químicos (DIAS, 2016). Porém, é possível observar uma queda no registro dos produtos químicos, fato que se deve às proibições de determinados princípios ativos no país (DIAS, 2016).

Apesar do avanço nas pesquisas relacionadas a produtos biológicos, é evidente a quantidade limitada de produtos disponíveis no Brasil. Os principais organismos de controle biológico disponíveis no mercado brasileiro são: *Bacillus thuringiensis*, *Cotesia flavipes*, *Metharizium anisopliae*, VPN-HzSNPV (Baculovirus), e *Beauveria bassiana*. Importantes iniciativas são recomendadas para alavancar a produção e uso de produtos para controle biológico de pragas, podendo-se destacar o registro de uma maior gama de produtos já testados, linhas de crédito diferenciadas para indústrias voltadas a esse tipo de produção, investimento em capacitação técnica por parte dos órgãos públicos de pesquisa, e investimentos em redes incubadoras de empresas voltadas ao desenvolvimento e aprimoramento de produtos biológicos (DIAS, 2016).

Figura 2: Gráfico comparativo de registros: produtos biológicos × produtos químicos no Brasil



Adaptado de: Dias, 2016.

Apesar da evidência de desafios a serem superados, percebe-se, a partir do abordado na literatura, que a utilização de fungos entomopatogênicos apresenta-se como uma das mais importantes ferramentas utilizadas no controle biológico. A preocupação com o massivo uso do controle químico não se baseia apenas na perda das tecnologias agrícolas, mas também no bem-estar da população para quem o profissional da área agrícola trabalha, tendo em vista os prejuízos à saúde humana e animal que os produtos químicos vêm causando ao longo do tempo. Com o passar do tempo, o aprimoramento destas tecnologias será uma grande aliada a integrar o controle químico no manejo fitossanitário nas culturas de grãos, reforçando o manejo fitossanitário integrado como o futuro do controle de pragas e doenças.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção, organização, preparação e manutenção dos materiais

O material utilizado para conduzir os co-cultivos e aplicações dos tratamentos que compuseram a experimentação foram obtidos através de parcerias com outros projetos de pesquisa, além de distintos laboratórios da UFSM. Os ensaios experimentais foram executados no laboratório Biotec Factory da Universidade Federal de Santa Maria, Campus Santa Maria - RS. Todos os materiais e meios de cultivo utilizados na execução deste experimento foram previamente esterilizados utilizando autoclave a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 min, conforme Brun (2020).

Os isolados de *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Metarhizium anisopliae*, foram adquiridos junto ao Instituto Biológico de São Paulo, com registros no GenBank IBCB 66, MMBF 58/09 e IBCB 425, respectivamente. Após serem repicados e isolados, foram mantidos e multiplicados em meio de cultura basal padrão, adaptado do meio formulado por Schmaltz (2020). A composição apresentava, para cada litro de água destilada: fosfato de potássio -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g/L), sulfato de ferro heptahidratado -  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado -  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L), sulfato de manganês heptahidratado -  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L), sulfato de zinco heptahidratado -  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L), cloreto de cálcio -  $\text{CaCl}_2$  (0,5 g/L), cloreto de cobalto -  $\text{CoCl}_2$  (0,4 g/L), cloreto de sódio -  $\text{NaCl}$  (1,0 g/L) e BDA (batata, dextrose e ágar) esterilizado, vertido em seguida em placas de Petri, com preparo demonstrado na Figura 3.

Figura 3: Preparo do meio fermentativo



Fonte: Autora



A repicagem e manutenção das cepas dos fungos foi realizada conforme proposto por Aita (2020) e Brun (2020) utilizando placas Petri com meio BDA, transferindo-se um disco de aproximadamente 20 mm de meio contendo o fungo para novas placas de Petri, também com meio BDA. Posteriormente, foram transferidas para estufa microbiológica, mantidas a temperatura de 28°C por 7 dias até o momento em que se observou que o micélio preencheu a superfície do meio de cultivo da placa de petri e, em seguida, as placas foram armazenadas em refrigerador a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . Após ter sido observado o crescimento do micélio na placa de petri, foram preparados *slants*, transferindo o fungo das placas, com auxílio de uma alça de platina, para tubos Falcon de 10 mL contendo o meio de cultura BDA, mantendo-os por 96 horas de incubação em estufa a 28°C.

Estes *slants* foram mantidos refrigerados a 4°C por até 30 dias antes de serem utilizados nos co-cultivos em meio submerso (CocSu). O período de armazenamento dos *slants* respeitou o período estipulado por Aita (2020), ou seja, inferior a 30 dias. Após o período de refrigeração, conforme sugerido por Aita (2020), foram preparados os inóculos dos fungos, fazendo-se a raspagem dos micélios dos fungos dos *slants*, transferindo-os para tubos Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio BD (Batata Dextrose), armazenados em estufa a 28°C por 24 horas. As suspensões de esporos fúngicos resultantes deste processo foram utilizadas como inóculos para os processos de co-cultivo em meio submerso.

Para a realização do experimento relacionado ao potencial fungicida dos isolados, foram adquiridos outros fungos patogênicos, sendo um isolado de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, com registro no GenBank MK 450343, proveniente da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas. Este isolado foi repicado em Eppendorfs (Figura 4A) e em placas de Petri. Nos Eppendorfs preenchidos com água destilada, foram adicionados discos do isolado, e estes foram conservados em geladeira por 30 dias, momento em que foram utilizados. As placas de Petri foram acondicionadas em câmara B.O.D a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $\pm 70\%$  e fotoperíodo de 12:12 h durante 5 dias. Após, as placas foram transferidas para geladeira, permanecendo armazenadas por mais 30 dias até serem utilizadas.

*Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotricum truncatum* e *Colletotricum gloesporioides*, com os respectivos registros no GenBank MMBF 03/18, MMBF05/05 e MMBF 02/12, foram outros isolados fúngicos utilizados no experimento, adquiridos junto ao Instituto Biológico de São Paulo – SP (Figura 4 B). Estes isolados necessitaram apenas de conservação em geladeira, pois foram adquiridos com estruturas aptas à repicagem.

Figura 4: Eppendorfs e placas de Petri com isolados de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (A) e isolados fúngicos adquiridos do Instituto Biológico de São Paulo – SP (B)



Fonte: Autora

Todos os procedimentos relacionados com a inoculação de fungos foram realizados em uma câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, conforme indicado por Aita (2020). Os insetos utilizados no experimento relacionado ao potencial inseticida de caldos fermentados foram adquiridos com recurso próprio do projeto de pesquisa, sendo a empresa Promip® a fornecedora de 1200 ovos de *Euschistus heros* (Figura 5).

Figura 5: Ovos de *Euschistus heros* (A) adquiridos da empresa Promip® e (B) sob criação no LabMIP



Fonte: Autora

A criação e a manutenção dos ovos foram realizadas em parceria com o Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP) da UFSM, para o qual foi fornecido a caixa para que realizassem a criação, bem como vagens de feijão verde e amendoim para compor a dieta dos

insetos que era trocada a cada três dias. Os ovos chegaram ao LabMIP em Setembro de 2022 e foram criados em ambiente climatizado, com temperatura de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , UR em  $60 \pm 20\%$  e 14 horas de fotoperíodo, permanecendo lá até o momento em que foi identificada a mudança para a fase adulta, no mês de Novembro. A partir disso, os insetos foram encaminhados para o laboratório Biotec Factory, onde foi procedido o experimento de verificação do potencial inseticida dos caldos fermentados.

### 3.2. Co-cultivos

A fim de ampliar informações acerca da avaliação de co-cultivos para produção de escleródios e conídios, neste experimento os co-cultivos foram realizados em meio submerso. Foi definido um meio basal, descrito no item 3.3, através do planejamento experimental Plackett- Burmann, com 12 ensaios e 3 pontos centrais, a fim de avaliar os efeitos das variáveis descritas na Tabela 2. O intervalo de cada uma das variáveis foi definido com base em testes já realizados por Aita *et al* (2019) e o planejamento Plackett-Burman está descrito na Tabela 3.

Tabela 2: Codificação das variáveis do planejamento do tipo Plackett-Burman

	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Glicose (g/L)</b>	10	20	30
<b>Sacarose (g/L)</b>	5	10	15
<b>HPA<sup>1</sup> (g/L)</b>	5	7,5	10
<b>BDA<sup>2</sup> (g/L)</b>	0	2,5	5
<b>HP<sup>3</sup> (g/L)</b>	0	2,5	5

<sup>1</sup> **HPA** - Hidrolizado de proteína animal; <sup>2</sup> **BDA** - Hidrolizado de farelo de soja + fósforo orgânico; <sup>3</sup> **HP**- Hidrolizado de penas.

Fonte: Autora

Tabela 3: Matriz do planejamento do tipo Plackett-Burman com variáveis codificadas

<b>Ensaio</b>	<b>Glicose</b>	<b>Sacarose</b>	<b>HPA</b>	<b>BDA</b>	<b>HP</b>
<b>1</b>	1	-1	1	-1	-1
<b>2</b>	1	1	-1	1	-1
<b>3</b>	-1	1	1	-1	1
<b>4</b>	1	-1	1	1	-1
<b>5</b>	1	1	-1	1	1
<b>6</b>	1	1	1	-1	1
<b>7</b>	-1	1	1	1	-1
<b>8</b>	-1	-1	1	1	1
<b>9</b>	-1	-1	-1	1	1
<b>10</b>	1	-1	-1	-1	1
<b>11</b>	-1	1	-1	-1	-1
<b>12</b>	-1	-1	-1	-1	-1
<b>13</b>	0	0	0	0	0
<b>14</b>	0	0	0	0	0
<b>15</b>	0	0	0	0	0

Fonte: Autora

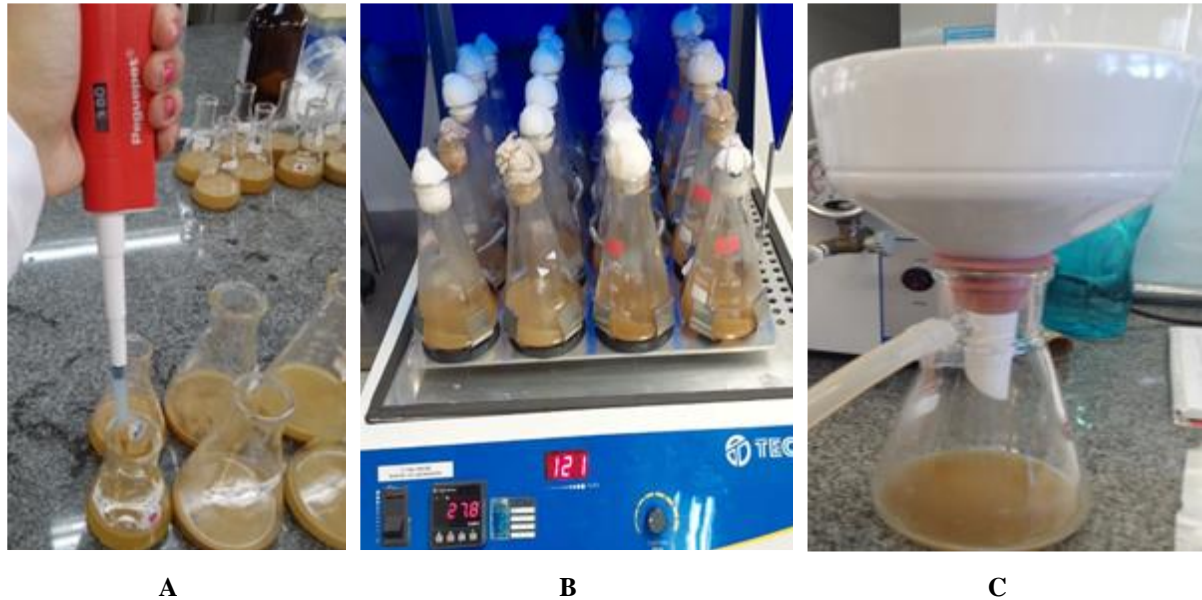
### 3.2.1. Cultivo submerso (CSu)

Os cultivos e co-cultivos que compuseram os 12 ensaios e os 3 pontos centrais investigados foram realizados acondicionando-se os distintos meios fermentativos (Tabela 2) em 105 Erlenmeyers, preenchendo-os com 60 mL de meio fermentativo (Figura 6A). Na câmara de fluxo laminar, utilizando-se alça platina, foram inoculadas suspensões de esporos dos fungos *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL., *Trichoderma harzianum* Rifai e *Metarhizium anisopliae*, e de seus combinados, conforme descrito na Tabela 3. A incubação dos fungos foi realizada em um período de 7 dias a 28°C, conforme adaptado de Todero (2017), em agitação orbital em Shakker a 120 rpm (Figura 6B).

Após o período de incubação, os caldos fermentados foram acondicionados em tubos Falcon de 50 e 10 mL e armazenados por 10 dias em geladeira para posterior filtragem. Este armazenamento foi necessário devido à alta demanda por equipamentos no laboratório Biotec Factory, tendo em vista a opção pela realização da filtragem em câmara de fluxo laminar, por conta do risco de contaminação. Posterior ao armazenamento, os caldos fermentados foram

filtrados utilizando papel de microfibras Whatman™ Glass, poro de 1 µm, conforme proposto por Aita (2020), com auxílio da bomba à vácuo (Figura 6C).

Figura 6: Preparo dos meios fermentativos de CSu e CoCSu (A), meios acondicionados em Shaker (B) e filtragem de caldo fermentado (C)



Fonte: Autora

A fração peneirada foi armazenada em tubos Falcon de 50 mL até o momento da aplicação nos alvos *Euschistus heros*, conforme metodologia descrita no item 3.3. Os papéis filtro utilizados na filtragem dos caldos foram previamente secos em estufa a 60°C por 36 horas, quando apresentaram massa constante. Após essa secagem, foram acondicionados em dessecador por 24 horas para posterior avaliação da massa. Após a filtragem, os papéis com a biomassa dos caldos foram novamente acondicionados em estufa a 60°C, por 7 dias, para novamente serem submetidos à avaliação da massa. Esta etapa foi realizada para obter-se dados de biomassa dos caldos fermentados, apresentados no item 4.1. Durante este processo, em todas as etapas, foram usadas luvas para não haver interferência da gordura das mãos na biomassa.

### 3.3. Alvo *Euschistus heros*: investigação do potencial inseticida dos co-cultivos

Para avaliar a patogenicidade dos fungos em estudo no inseto alvo investigado, adaptou-se a metodologia adotada por Nora (2019). Para proceder a aplicação no dorso dos insetos, estes foram acomodados em potes plásticos abastecidos com amendoim descascado, previamente autoclavados (Figura 7).

Figura 7: Potes com dieta e insetos acondicionados (A) e aplicação de caldo no dorso dos insetos (B)



Fonte: Autora

Foi realizada a inoculação de conídios no dorso dos percevejos adultos. O controle consistiu na aplicação de 5  $\mu\text{L}$  da suspensão no dorso de cada percevejo com uma micropipeta. Foram utilizados 9 percevejos por tratamento, 3 por repetição. No tratamento testemunha, foi inoculada apenas água destilada, os mesmos 5  $\mu\text{L}$ , conforme adaptado de Nora (2019). A mortalidade dos percevejos foi observada diariamente, durante 10 dias, atribuindo-se a mortalidade total dos alvos quando todos os insetos que compuseram a repetição do tratamento foram considerados mortos.

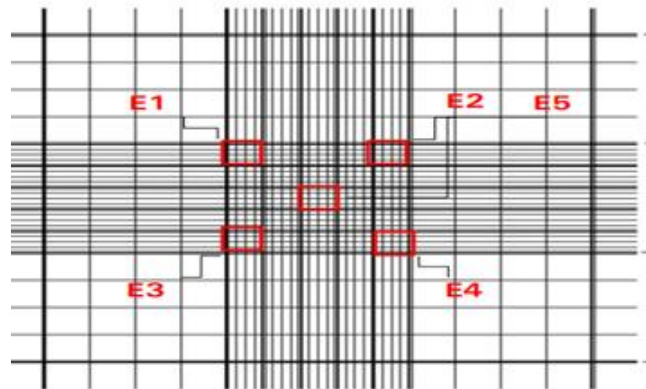
Após serem procedidas a aplicação e avaliação da mortalidade, realizou-se a avaliação do número de conídios por mililitro de caldo, utilizando-se da metodologia adaptada de Bettiol *et al.* (2012), que tem como base a preparação de suspensão de conídios de *Trichoderma* sp. e contagem do número de conídios com auxílio de uma Câmara de Neubauer (hemacitômetro) ao microscópio óptico. O preparo do diluente consistiu em suspender NaCl em 1 L de água destilada, e em seguida, ser adicionado 1 mL de Tween 80, misturando-se bem e, posteriormente, autoclavando-se. Os caldos foram deixados a temperatura ambiente por 40 minutos antes de serem submetidos ao processo de diluição. Foram adicionados 10 mL de cada caldo em um Erlenmeyer e completado com 90 mL da solução diluente, correspondente a diluição  $10^{-1}$  (Bettiol *et al.*, 2012).

O Erlenmeyer com a suspensão foi acondicionado em agitador orbital por 60 minutos a 90 rpm e em banho de ultrassom por 5 minutos. Após, o conteúdo do Erlenmeyer foi misturado e acondicionado em um tubo de ensaio e transferido para um Becker para ser posicionado no agitador magnético e ser agitado por 5 minutos. Após procedida a agitação, 1,0 mL da suspensão contida no Becker foi transferida com auxílio de micropipeta com ponteira esterilizada para um tubo de ensaio e acondicionada em agitador de tubo de ensaio, sendo

colocado e retirado três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento da suspensão (Bettioli *et al.*, 2012).

Como a concentração dos caldos era desconhecida, realizou-se a diluição 3 vezes, onde foi possível escolher a diluição  $10^{-3}$ , a qual apresentou mais do que 10 conídios por subcompartimento da lâmina dividida. Após ter sido procedida a adequada diluição, foi realizada a contagem total de conídios, retirando dos recipientes uma alíquota de  $0,5 \mu\text{L}$  com o auxílio de micropipeta. Este volume foi adicionado à lâmina e coberto pela lamínula, deixando em repouso por 5 minutos para precipitação dos conídios, facilitando a contagem e reduzindo erros. A contagem foi realizada em microscópio ótico, com aumento de 400x, nas divisões 1 e 2 da lâmina simulando a câmara de Neubauer. Este procedimento foi realizado nos cinco quadrados simulados, como demarcados na Figura 8, totalizando cinco contagens por campo dividido (E1, E2, E3, E4 e E5), conforme apresentado por Bettioli *et al.* (2012).

Figura 8: Exemplo de área dentro dos subcompartimentos para contagem de conídios de *Trichoderma* - E1, E2, E3, E4 e E5.



Fonte: Bettioli *et al.* (2012)

Após ter sido realizada a contagem, foram procedidos os cálculos de número conídios (1/mL) utilizando Equação 1, conforme demonstrado por Bettioli *et al.* (2012).

$$\text{Conídios} = \left( \frac{\text{Campo 1} + \text{Campo 2}}{2} \right) * 2,5 * 10^5 \quad (1)$$

Onde: campo 1 =  $(E1 + E2 + E3 + E4 + E5)/5$  e campo 2 =  $(E1 + E2 + E3 + E4 + E5)/5$ .

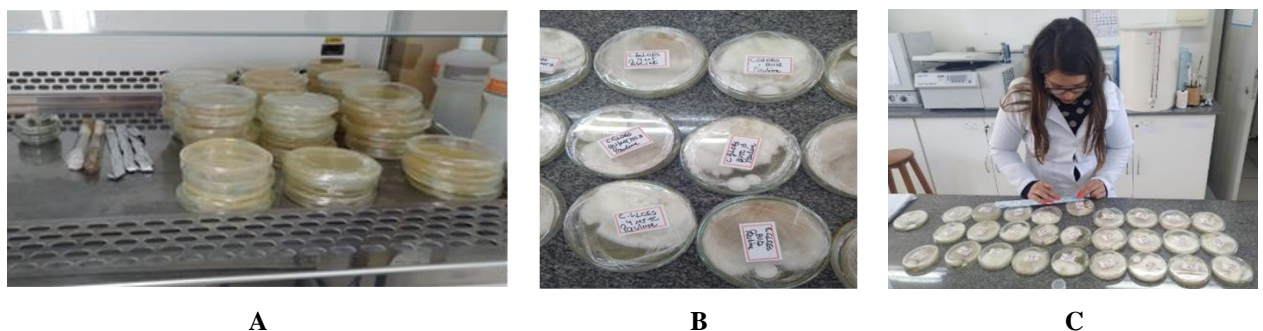
### 3.4. Potencial fungicida contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum* e *Colletotrichum gloesporioides*

Para estudar o efeito antagônico dos co-cultivos no crescimento micelial dos fungos patogênicos *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *C. truncatum* e *C. gloesporioides*, foi adotada a metodologia proposta por Souza (2018) utilizando a técnica de cultivo pareado em placa de Petri contendo meio de cultura BDA, previamente autoclavado, conforme descrito por Dennis e Webster (1971). Neste meio BDA, a fim de reduzir ao máximo a contaminação por bactérias e outros microorganismos, foi adicionada, após procedida a autoclavagem, estreptomicina® em concentração de 0,2 g/mL.

Nesta técnica, escleródios dos fungos patogênicos foram transferidos, com o auxílio de alça de platina, para placas de Petri com meio BDA vertido e posicionados na borda da placa. Posteriormente, os fungos em estudo foram repicados no lado oposto da placa e, em seguida, houve incubação em estufa a 28°C. Não foi possível realizar a incubação em BOD a 25°C, conforme padrão da metodologia proposta, devido a problemas com o equipamento no período em que foram realizadas as repicagens. Foi constituído um tratamento testemunha com placas contendo apenas o fitopatógeno, conforme propôs Souza (2018).

O potencial de inibição dos co-cultivos foi avaliado 15 dias após o semeio nas placas, com medições do crescimento micelial do fitopatógeno (SOUZA, 2018). A avaliação do crescimento foi feita através de uma medição simples. Utilizando-se uma régua graduada, realizava-se a medição de ambos os lados da placa para proceder o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (Figura 9).

Figura 9: Placas e demais equipamentos para cultivo pareado em câmara de fluxo laminar (A), cultivo pareado de *C. gloesporioides* (B) e determinação de diâmetro (C)



Fonte: Autora

Realizou-se a determinação do diâmetro do crescimento micelial adaptando-se a equação proposta por Menten *et al.* (1976). Em comparação com o diâmetro total das placas de



Petri utilizada, sendo este de 9 cm, foi determinada o percentual de inibição do crescimento do fungo. Para isso, determinou-se o  $F_{\text{combatido}}$ , o qual se refere ao fungo entomopatogênico, em comparação ao  $F_{\text{controle}}$ , o qual se refere ao fungo em estudo, aplicando as medidas obtidas na equação 2.

$$\text{Inibição} = (\text{Diâmetro placa} - \text{Diâmetro } F_{\text{combatido}}) * 100 \quad (2)$$

Onde: Diâmetro placa = diâmetro total da placa de Petri; Diâmetro  $F_{\text{combatido}}$  = crescimento do fungo de combate.

### 3.5. Esquema estatístico e tratamentos

Os bioensaios compreenderam distintos delineamentos experimentais devido às particularidades dos experimentos executados. Para o bioensaio referente aos fungos patogênicos *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *C. truncatum* e *C. gloesporioides*, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, compreendendo 7 tratamentos resultantes da combinação dos fungos entomopatogênicos disponibilizados para este estudo, com três repetições de cada um dos tratamentos propostos. Atribuiu-se uma placa de Petri para cada unidade experimental, para ambos os alvos investigados, totalizando 21 placas de petri para cada fungo patogênico utilizado.

Para a investigação do potencial de biocontrole dos caldos fermentados em relação ao inseto praga *Euschistus heros*, foi determinado o uso do delineamento estilo Plackett- Burmann, conforme variáveis descritas na Tabela 2. Foram acondicionados 3 percevejos em cada pote plástico, adaptando a metodologia proposta por Nora (2019). As aplicações de cada um dos co-cultivos foram repetidas 3 vezes, além do tratamento testemunha, onde foi realizada aplicação de água destilada no dorso dos insetos, totalizando o uso de 315 potes plásticos de 50 mL. Na metodologia padrão de Nora (2019) foram utilizados 45 percevejos por tratamento, sendo 15 por repetição. Não foi possível utilizarmos da mesma quantidade devido ao número reduzido de insetos disponível para estes ensaios.

Os dados obtidos nas investigações de fungos patogênicos em cultivo pareado foram submetidos à análise de normalidade e homogeneidade. Quando se apresentaram significativos, foram submetidos à análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade) comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o pacote estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2000).

Para os dados obtidos com o alvo *Euschistus heros*, utilizou-se do planejamento experimental Plackett-Burman, com variáveis codificadas, afim de verificar quais variáveis influenciaram no desenvolvimento e número de conídios, bem como na biomassa dos caldos fermentados. Estes dados foram submetidos à análise no software Statistica® por meio de análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade). Dados de biomassa, número de conídios/mL e o percentual de mortalidade dos insetos foram simplificados e foram submetidos à ANOVA no software SISVAR®. Quando identificou-se efeitos significativos, foram também submetidos à análise de comparação de médias.

Tabela 4: Resumo do esquema estatístico de tratamentos do experimento com fungos patogênicos utilizados para os quatro alvos estudados

<b>Tratamento*</b>	<b>Classificação</b>	<b>Repetição</b>
<b>BV</b>		1
<b>BV</b>		2
<b>BV</b>		3
<b>MT</b>		1
<b>MT</b>	CSu Individual	2
<b>MT</b>		3
<b>TC</b>		1
<b>TC</b>		2
<b>TC</b>		3
<b>BVMT</b>		1
<b>BVMT</b>		2
<b>BVMT</b>		3
<b>BVTC</b>		1
<b>BVTC</b>	CocSu Dupla	2
<b>BVTC</b>		3
<b>MTTC</b>		1
<b>MTTC</b>		2
<b>MTTC</b>		3
<b>BVMTTC</b>		1
<b>BVMTTC</b>	CocSu Trio	2
<b>BVMTTC</b>		3

\* *Beauveria bassiana* (BV); *Metarhizium anisopliae* (MT); *Trichoderma harzianum* (TC); *Beauveria bassiana* + *Metarhizium anisopliae* (BV + MT); *Beauveria bassiana* + *Trichoderma harzianum* (BV + TC); *Metarhizium anisopliae* + *Trichoderma harzianum* (MT + TC); *Beauveria bassiana* + *Metarhizium anisopliae* + *Trichoderma harzianum* (BV + MT + TC); CSu: cultivo submerso; CocSu: co-cultivo submerso.

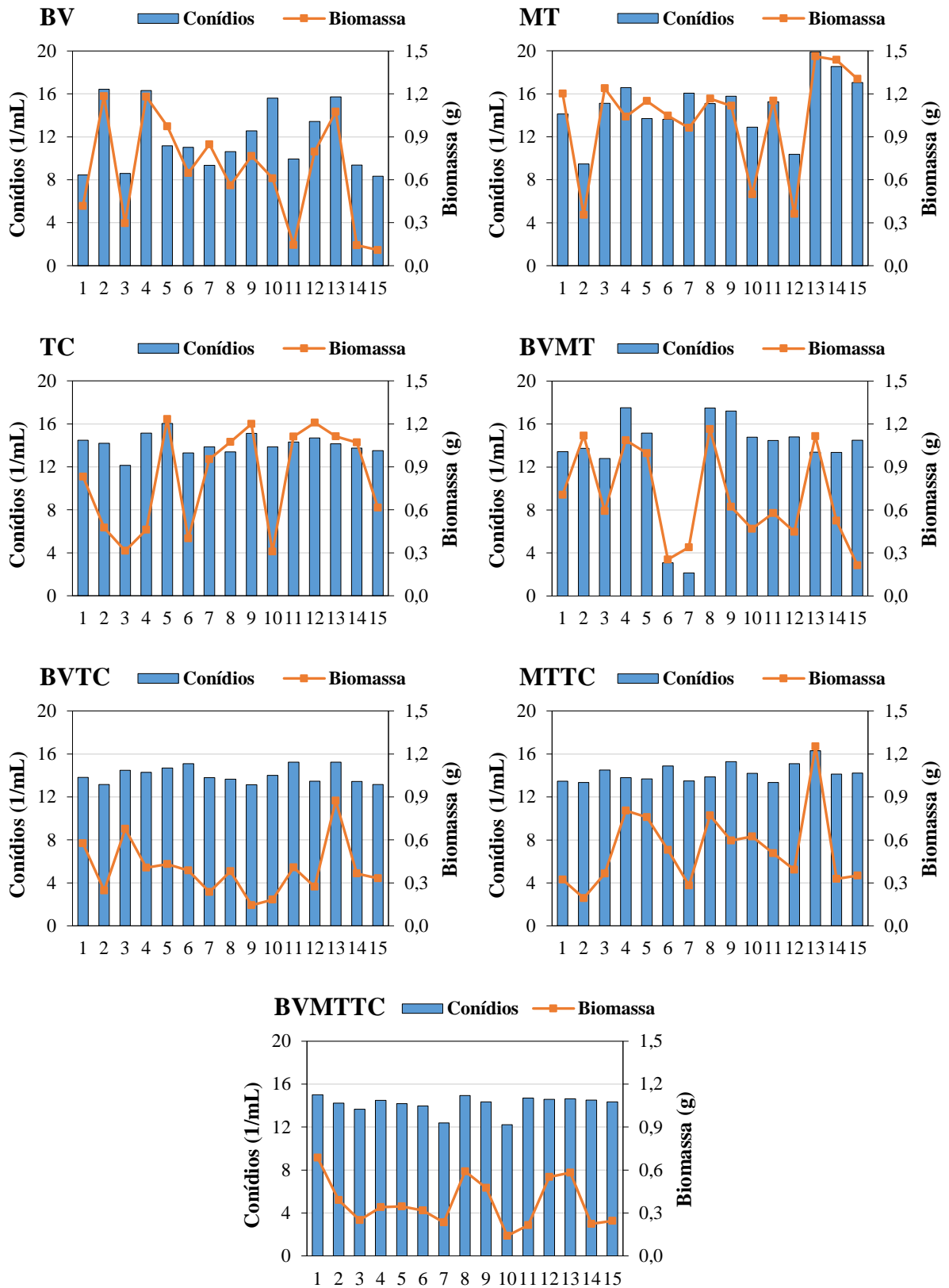
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Conídios e biomassa dos caldos fermentados

Os resultados de conídios e biomassa são apresentados na Figura 10. Há um indicativo de relação direta entre número de conídios e a biomassa, tanto nas fermentações individuais quanto nos co-cultivos em duplas ou trio. Os resultados mais expressivos absolutos desta análise, cujo as maiores concentrações de conídios e valores de biomassa foram obtidos para os cultivos de BV, MT e TC e os co-cultivos de BVMT, BVTC, TCMT e BVTCMT são, respectivamente, os caldos dos ensaios 2, 13, 5, 8, 13, 13 e 1. O ensaio 13 é o ponto central, onde foram utilizados, em g/L, 20 de glicose, 10 de sacarose, 7,5 de HPA, 2,5 de BDA e 2,5 de HP. Em relação aos conídios, foi possível atingir, em 1 mL de caldo,  $16,4 \times 10^6$  com BV,  $19,9 \times 10^6$  com MT,  $16,1 \times 10^6$  com TC,  $17,5 \times 10^6$  com BVMT,  $15,2 \times 10^6$  com BVTC,  $16,3 \times 10^6$  com MTTC e  $15,0 \times 10^6$  com BVMTTC. Em relação à biomassa, foi possível atingir 1,18 g com BV, 1,46 g com MT, 1,23 g com TC, 1,16 g com BVMT, 0,87 g com BVTC, 1,25 g com MTTC e 0,69 g com BVMTTC.

Os resultados de conídios e de biomassa foram submetidos à ANOVA no software Statistica com nível de confiança de 95. No cultivo usando MT, houve efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) para a concentração de conídios (Tabela 6). No co-cultivo usando BVMT, apenas o efeito principal de sacarose apresentou efeito significativo na concentração de conídios (Tabela 7), enquanto que na produção de biomassa não houve efeito significativo. No cultivo de TC apenas o efeito de HPA apresentou efeito significativo para a produção de conídios. Por exemplo, os ensaios 6, 8, 10 e 11 são os que representam esse efeito positivo. No ensaio 8, é possível usar os menores níveis de glicose e sacarose em combinação com os maiores níveis de HPA, BDA e HP para se obter aproximadamente  $14,9 \times 10^6$  conídios/mL. Em outra alternativa, é possível usar os menores níveis de glicose, HPA, BDA e HP em combinação com o maior nível de sacarose para se obter aproximadamente  $14,7 \times 10^6$  conídios/mL.

Figura 10: Conídios ( $\times 10^{-6}$ ) e biomassa dos caldos fermentados de BV, MT, TC, BVMT, BVTC, MTTC e BVMTTC de acordo com o planejamento Plackett-Burman.



Fonte: Autora

Tabela 5: ANOVA para a biomassa no cultivo submerso usando MT

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Glicose</b>	0,759	1	0,759	103,95	0,009
<b>Sacarose</b>	0,690	1	0,690	94,47	0,010
<b>HPA</b>	0,660	1	0,660	90,33	0,011
<b>BPA</b>	0,597	1	0,597	81,80	0,012
<b>HP</b>	0,881	1	0,881	120,63	0,008
<b>Glicose × Sacarose</b>	0,765	1	0,765	104,81	0,009
<b>Glicose × HPA</b>	0,736	1	0,736	100,80	0,010
<b>Glicose × BPA</b>	0,469	1	0,469	64,19	0,015
<b>Glicose × HP</b>	0,500	1	0,500	68,43	0,014
<b>Sacarose × HPA</b>	0,093	1	0,093	12,80	0,070
<b>Sacarose × BPA</b>	0,596	1	0,596	81,58	0,012
<b>Glicose × Sacarose × HPA</b>	0,508	1	0,508	69,55	0,014
<b>Erro</b>	0,015	2	0,007		
<b>Soma total dos quadrados</b>	1,744	14			

$R^2 = 0,992$

Fonte: Autora

Tabela 6: ANOVA para a concentração de conídios no cultivo submerso usando MT

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Glicose</b>	4,91E+13	1	4,91E+13	24,57	0,038
<b>Sacarose</b>	3,89E+13	1	3,89E+13	19,47	0,048
<b>HPA</b>	4,54E+13	1	4,54E+13	22,74	0,041
<b>BPA</b>	6,02E+13	1	6,02E+13	30,15	0,032
<b>HP</b>	5,51E+13	1	5,51E+13	27,57	0,034
<b>Glicose × Sacarose</b>	6,93E+13	1	6,93E+13	34,68	0,028
<b>Glicose × HPA</b>	5,46E+13	1	5,46E+13	27,34	0,035
<b>Glicose × BPA</b>	4,34E+13	1	4,34E+13	21,71	0,043
<b>Glicose × HP</b>	4,03E+13	1	4,03E+13	20,19	0,046
<b>Sacarose × HPA</b>	2,68E+13	1	2,68E+13	13,41	0,067
<b>Sacarose × BPA</b>	4,67E+13	1	4,67E+13	23,39	0,040
<b>Glicose × Sacarose × HPA</b>	4,84E+13	1	4,84E+13	24,25	0,039
<b>Erro</b>	3,99E+12	2	2,00E+12		
<b>Soma total dos quadrados</b>	1,06E+14	14			

$R^2 = 0,962$

Fonte: Autora

Tabela 7: ANOVA para a concentração de conídios no cultivo submerso usando BVMT

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Glicose</b>	3,67E+12	1	3,67E+12	8,69	0,098
<b>Sacarose</b>	9,98E+12	1	9,98E+12	23,64	0,040
<b>HPA</b>	2,91E+12	1	2,91E+12	6,90	0,120
<b>BPA</b>	9,71E+11	1	9,71E+11	2,30	0,269
<b>HP</b>	5,32E+12	1	5,32E+12	12,60	0,071
<b>Glicose × Sacarose</b>	3,67E+12	1	3,67E+12	8,69	0,098
<b>Glicose × HPA</b>	9,79E+11	1	9,79E+11	2,32	0,267
<b>Glicose × BPA</b>	6,29E+12	1	6,29E+12	14,91	0,061
<b>Glicose × HP</b>	3,73E+12	1	3,73E+12	8,84	0,097
<b>Sacarose × HPA</b>	3,35E+12	1	3,35E+12	7,93	0,106
<b>Sacarose × BPA</b>	1,01E+12	1	1,01E+12	2,40	0,261
<b>Glicose × Sacarose × HPA</b>	1,14E+12	1	1,14E+12	2,70	0,242
<b>Erro</b>	8,44E+11	2	4,22E+11		
<b>Soma total dos quadrados</b>	2,90E+14	14			

$R^2 = 0,997$

Fonte: Autora

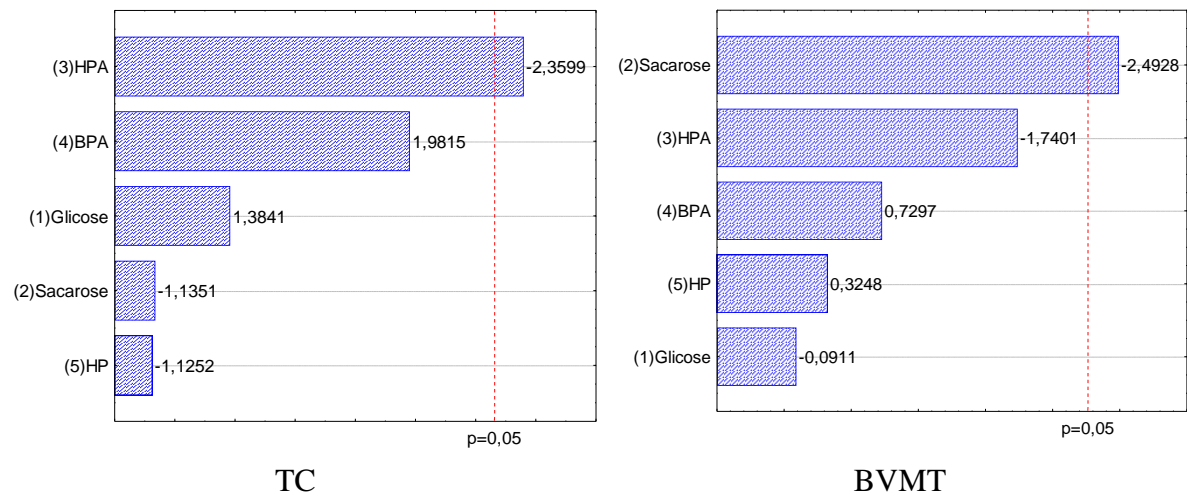
Tabela 8: ANOVA para a concentração de conídios no cultivo submerso usando BVMTTC

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Glicose</b>	1,01E+12	1	1,01E+12	53,15	0,018
<b>Sacarose</b>	3,34E+11	1	3,34E+11	17,64	0,052
<b>HPA</b>	6,52E+11	1	6,52E+11	34,39	0,028
<b>BPA</b>	2,41E+11	1	2,41E+11	12,71	0,070
<b>HP</b>	5,83E+11	1	5,83E+11	30,75	0,031
<b>Glicose × Sacarose</b>	7,62E+09	1	7,62E+09	0,40	0,591
<b>Glicose × HPA</b>	8,30E+11	1	8,30E+11	43,76	0,022
<b>Glicose × BPA</b>	5,89E+11	1	5,89E+11	31,09	0,031
<b>Glicose × HP</b>	6,93E+11	1	6,93E+11	36,55	0,026
<b>Sacarose × HPA</b>	7,44E+10	1	7,44E+10	3,92	0,186
<b>Sacarose × BPA</b>	5,46E+11	1	5,46E+11	28,80	0,033
<b>Glicose × Sacarose × HPA</b>	4,59E+11	1	4,59E+11	24,23	0,039
<b>Erro</b>	3,79E+10	2	1,90E+10		
<b>Soma total dos quadrados</b>	9,48E+12	14			

$R^2 = 0,996$

Fonte: Autora

Figura 11: Gráficos de Pareto com efeitos de variáveis independentes sobre as variável dependente conídios do caldo fermentado de *Trichoderma harzianum* (TC) e *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae* (BVMT)



Fonte: Autora

Foi possível perceber, anteriormente à análise estatística, uma indicação de semelhança de maiores concentrações de biomassa e conídios nos mesmos co-cultivos. Porém, ao executarmos a análise, não foi possível fazer essa relação direta apontada na verificação anterior para todos os cultivos e co-cultivos. Este comportamento apenas foi confirmado no cultivo de *M. anisopliae*. Isto confirma o que foi apresentado por Li, Peng e Chen (2013), que afirmam que não se pode necessariamente atribuir maior atividade biológica à maior produção de biomassa. Os efeitos das variáveis independentes glicose, sacarose, hidrolizado de proteína animal (HPA), hidrolizado de farelo de soja + fósforo orgânico (BDA) e hidrolizado de penas (HP) utilizadas dentro do planejamento experimental Plackett- Burmann sobre as variáveis dependentes número de conídios e biomassa foram avaliados quanto aos seus efeitos no software Statistica®, atribuindo 95% de nível de confiança.

No co-cultivo duplo de *B. bassiana* + *M. anisopliae*, é verificado efeito significativo para conídios na variável independente sacarose. Este comportamento indica que o menor nível de sacarose (5 g/L) é o mais indicado para se obter maior concentração de conídios no caldo fermentado de BVMT. Para isso, poderia ser aplicados ensaios tais como o 8 ou 9, onde também se tem o menor nível de glicose. Nesses ensaios, foram obtidos aproximadamente  $17,2\text{-}17,5 \times 10^6$  conídios/mL.

Quando foram avaliados os efeitos das variáveis independentes sobre a variável dependente biomassa, nenhuma variável apresentou-se significativa ( $p > 0,05$ ). Isto mostra que as variáveis independentes que compuseram esse planejamento Plackett-Burman não influenciaram significativamente na produção de biomassa de caldos fermentados. Embora

estatisticamente não se evidenciou nenhum efeito significativo em função de alta variabilidade, em termos absolutos foram evidenciadas biomassas em maior quantidade no ensaio 13, o que não ocorreu com os demais ensaios do ponto central (ensaios 14 e 15) em alguns cultivos e co-cultivos, especialmente de BV, BVMT, BVTC e MTTC (Figura 10).

Os resultados de conídios dos ensaios do ponto central apresentaram menor variação, com exceção do cultivo de BV. Nesse caso, dentre os 7 cultivos e co-cultivos, 3 se apresentaram significativos: MT, BVMT e BVMTTC (Figura 11). Na literatura científica, o trabalho de Mascarin *et al.* (2013), em que foi avaliado o efeito de caldos fermentados no controle da mosca-branca (*Bemisia tabaci* Genna dius), apresenta que a virulência dos fungos é diretamente afetada pela quantidade inicial de conídios que entram em contato com o inseto. Esta informação vem ao encontro da relação da quantidade de conídios com o percentual da mortalidade dos adultos de *Euschistus heros*, apresentada na seção 4.2.

#### **4.2. Ação inseticida dos co-cultivos**

A avaliação da mortalidade dos insetos foi observada diariamente, durante 10 dias (Dias Após Aplicação, DAS), considerando como mortalidade total dos alvos quando todos os insetos que compuseram a repetição morreram. O primeiro caldo a apresentar mortalidade em uma de suas repetições foi o de ensaio 11 com cultivo de *M. anisopliae*, apresentando mortalidade no primeiro dia de avaliação.

Foram realizados comparativos em relação ao tratamento testemunha, ou seja, descontou-se as mortalidades gerais em relação à mortalidade no tratamento testemunha, a qual foi observada no DAS 7. Este período relaciona-se com o período descrito por Qu e Wang (2018), onde os autores apontam que, ao contrário dos inseticidas químicos que podem ser letais em poucas horas, os fungos entomopatogênicos requerem de 24 a 48 horas para infectar o inseto, com a mortalidade ocorrendo entre o segundo e o terceiro DAS. Assim, classificou-se a mortalidade em percentual, sendo 0 para nenhum inseto morto, 33,3% para 1 inseto morto, 66,7% para 2 insetos mortos e 100% para 3 insetos mortos, sendo este a mortalidade total. Esses dados simplificados foram compilados em gráficos, os quais são apresentados na Figura 12.

Todos os co-cultivos apresentam bons índices de mortalidade dos insetos, sendo que poucos não atingiram a mortalidade total aos 10 DAS, sendo a maioria dos co-cultivos de BVMT e MTTC. As menores mortalidades, ou seja, de 0 ou apenas 33,3%, foram apresentadas nos ensaios 15 para BV, 6, 7 e 14 para BVMT e 1, 2, 7 e 8 para MTTC. De modo geral, os ensaios de BVMT apresentaram o menor índice de controle, sendo que 7 ensaios não atingiram

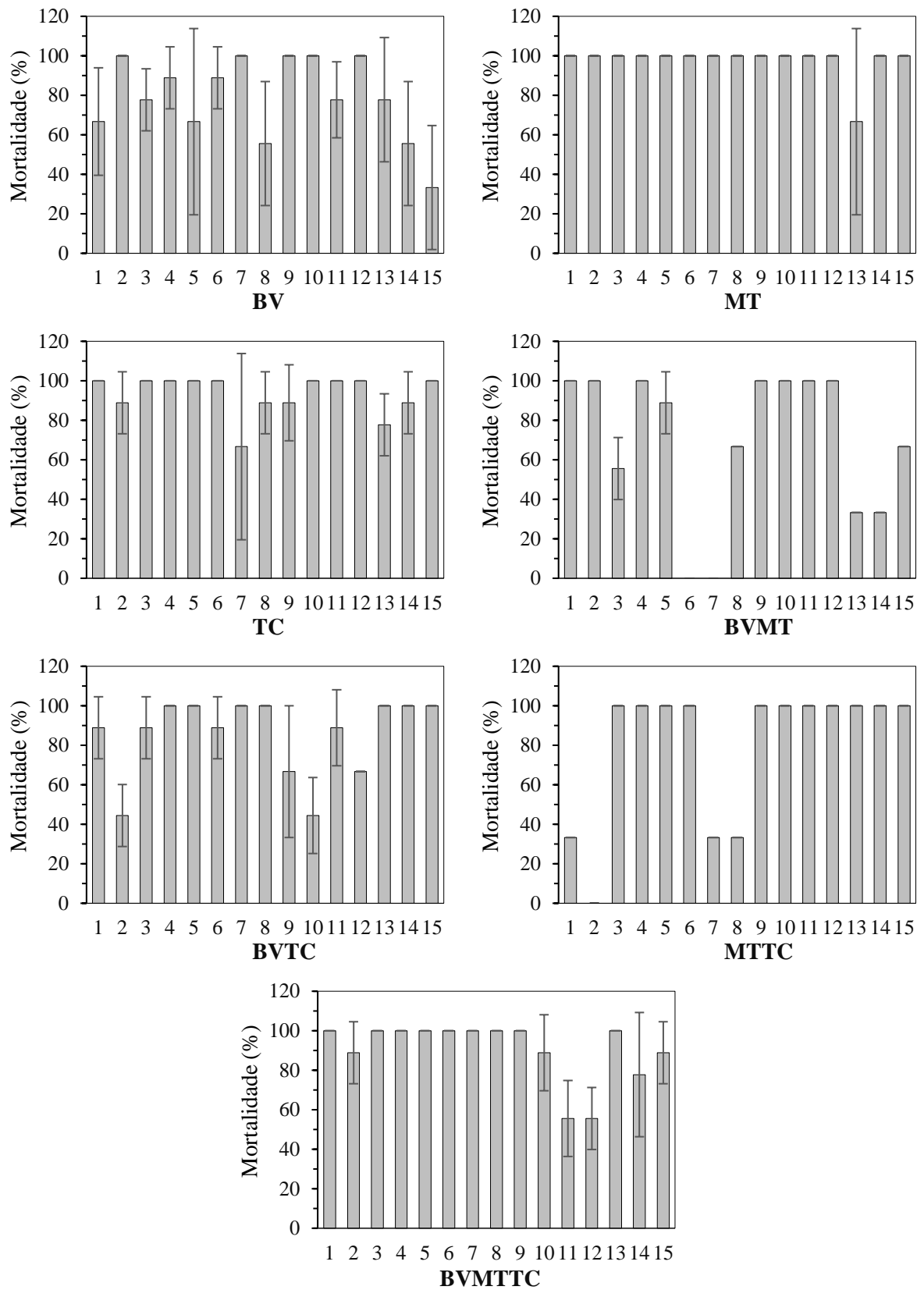


mortalidade total. Embora distintos fatores possam estar relacionados com a mortalidade dos insetos submetidos ao controle com fungos entomopatogênicos, vale ressaltar que o período latente entre o contato dos conídios e a morte do inseto irão variar de acordo com a força da resposta imune do inseto e à virulência do fungo (WANG e WANG, 2017).

Os dados de percentual de mortalidade foram submetidos à ANOVA no software estatístico SISVAR®. Todas as variáveis apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) e, então, foram submetidas ao teste de comparação de médias Tukey com 5% de probabilidade de erro. O resumo dos resultados apresentados na Tabela 9 apontam as maiores mortalidades para os caldos do cultivo individual de TC, a dupla co-cultivo MT+TC e os cultivos individuais de MT, seguido pelo de BV.

Esses resultados corroboram o apontado pelos testes realizados no software Statistica®, pois esses cultivos e co-cultivos responderam às variáveis independentes quando mensuradas sobre a variável dependente conídios. Isto demonstra que a utilização de nutrientes para o meio fermentativo traz um retorno positivo para a produção de conídios, auxiliando na efetivação do controle do inseto praga *Euschistus heros*. Esse confronto se relaciona diretamente com o reportado por Vega *et al.* (2000), onde os autores destacam que a eficácia fúngica está diretamente relacionada ao número de propágulos que entram em contato com a superfície do hospedeiro.

Figura 12: Dados de mortalidade (média  $\pm$  desvio padrão) de *Euschistus heros* em percentual pelos caldos de BV, MT, TC, BVMT, BVTC, MTC e BVMTTC após 10 dias de análise



Fonte: Autora

Tabela 9: Comparativo de médias (n = 3) de dados da mortalidade de *Euschistus heros*

<b>Caldo fermentado</b>	<b>Mortalidade (%)*</b>
MTTC 2	0,0 D
BVMT 7	0,0 D
BVMT 6	0,0 D
MTTC 7	33,3 CD
MTTC 8	33,3 CD
MTTC 1	33,3 CD
BVTC 10	44,4 CD
BVTC 2	44,4 CD
BV 8	55,5 CD
BVMTTC 12	55,5 CD
BVMTTC 11	55,5 CD
BVMT 3	55,5 CD
BV 1	66,7 BC
BVTC 9	66,7 BC
BV 5	66,7 BC
BV 13	77,8 BC
BVMTTC 14	77,8 BC
MT 13	77,8 BC
MT 12	88,9 BC
MT 9	88,9 BC
MT 8	88,9 BC
MTTC 11	100 A
MTTC 14	100 A
MTTC 13	100 A
TC 2	100 A
TC 5	100 A
TC 8	100 A
CV= 19,74%	

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; os números em cada tratamento significam o ensaio em que o caldo fermentado foi submetido na matriz do planejamento experimental Plackett-Burman . Fonte: Autora

Na literatura científica, algumas abordagens apontam que isolados da mesma espécie fúngica podem variar significativamente em sua capacidade de infectar e matar um determinado artrópode. As espécies de *B. bassiana*, em particular, exibem variação intraespecífica substancial a esse respeito (MASCARIN & JARONSKI, 2016). Os resultados obtidos corroboram os resultados de Nora *et al.* (2020), onde os autores afirmam que diferenças na virulência entre os isolados tornaram-se evidentes após seis dias na maior concentração de conídios e após nove dias na menor concentração, ocorrendo mortalidade mais rapidamente em concentrações mais altas. As decorrências encontradas com este estudo apontam bons caminhos para o uso dos co-cultivos no controle biológico do inseto praga estudado, demonstrando a possibilidade do surgimento de um novo produto a base destas co-fementações, algo que poderá ser conquistado com a realização de testes mais aprofundados, o que incentiva mais pesquisas promissoras nessa linha.

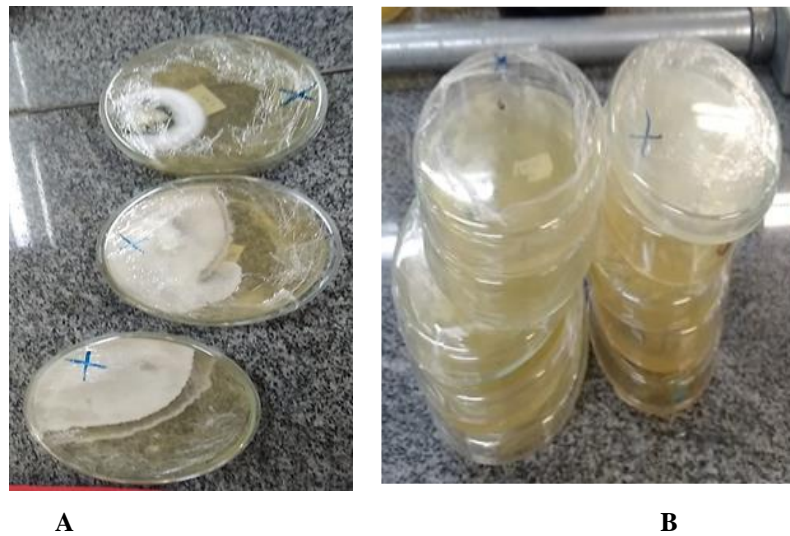
A eficiência do fungo *Trichoderma harzianum*, demonstrada neste estudo ao ocasionar a mortalidade total dos insetos, incrementa os benefícios da distinta utilização de isolados de *Trichoderma* spp. na cultura da soja, apontada por Barreto (2019). No estudo em questão, foi observado que a inoculação de *Trichoderma asperellum* UFT 201 em sementes da cultivar de soja 48B32 (BASF ®) promoveu incremento para as características de biomassa, eficiência na manutenção de estande e produtividade. Isto demonstrou a eficácia do fungo na promoção de crescimento vegetal e, conseqüentemente, na produtividade, contribuindo para menor custo de produção. Tendo em vista o potencial de controle de pragas e incremento de produtividade da cultura, os múltiplos benefícios da utilização de *Trichoderma* spp. observados através do desenvolvimento de estudos apresentam-se como um importante incentivo à utilização do uso de insumos biológicos na cultura da soja.

A alta mortalidade ocasionada pelos tratamentos com *Metharizium anisopliae* no presente estudo é também verificada em estudos realizados com pragas que atacam a cultura da beterraba açucareira (*Beta vulgaris* L.) (RAHEEM *et al.*, 2011; GROTH *et al.*, 2017). Os referidos autores verificaram alta mortalidade de *E. heros* adulto e juvenil, entre 83 e 100%, produzida por outra espécie de *Metharizium*, sendo esta a espécie *Metharizium brunneum* ARSEF 4556. Conforme os autores, esta taxa de mortalidade é semelhante ou superior às taxas de mortalidade relatadas de outras espécies patogênicas para outras espécies de percevejos, incluindo *Nezara viridula* e *Dichelops melacanthus*. Os resultados apontam o *Metharizium* spp. como um forte candidato para uma investigação mais aprofundada como um agente de controle de percevejos e outras pragas da soja.

### 4.3. Ação fungicida dos cultivos pareados

A avaliação dos cultivos pareados procedeu, em sua maioria, após 15 dias da realização da inoculação dos fungos nas placas de Petri. Atribui-se os fungos para controle de *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Metarhizium anisopliae* a denominação de  $F_{\text{controle}}$ , e para os fungos patogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, a denominação de  $F_{\text{combatido}}$ . Algumas placas com  $F_{\text{combatido}}$  de *Sclerotinia sclerotiorum* não haviam apresentado crescimento do  $F_{\text{controle}}$  após procedidos os 15 dias padrão de avaliação (Figura 13A), e algumas placas se apresentaram sem crescimento de  $F_{\text{controle}}$  e  $F_{\text{combatido}}$  (Figura 13B). Essas placas foram submetidas à nova inoculação e submetidas novamente ao crescimento. A avaliação procedeu 15 dias após essa nova inoculação, estando ambos os fungos em adequado crescimento.

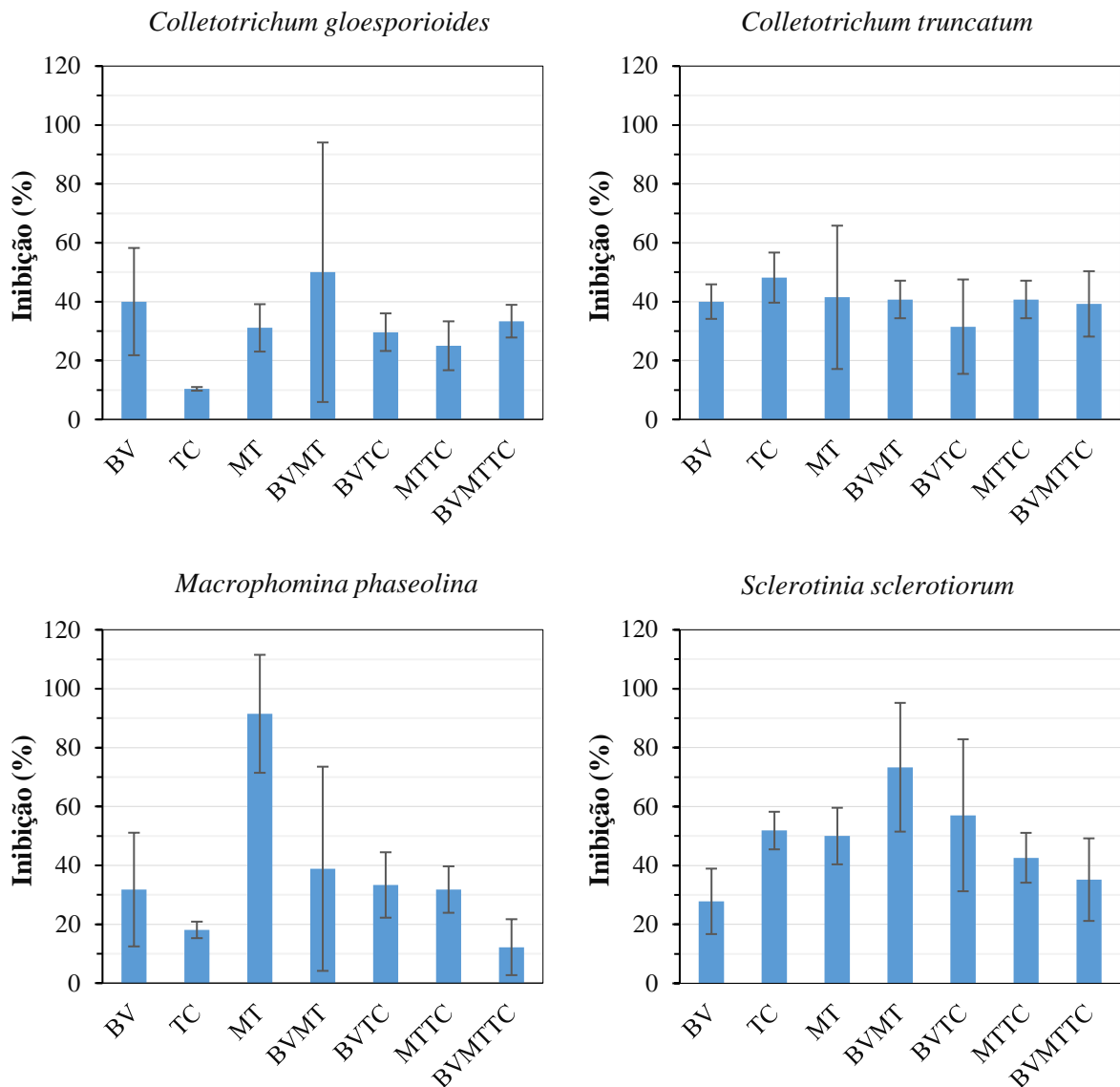
Figura 13: Placas de Petri apenas com crescimento do  $F_{\text{combatido}}$  *Sclerotinia sclerotiorum* (A) e placas de Petri sem crescimento de  $F_{\text{combatido}}$  e  $F_{\text{controle}}$  (B)



Fonte: Autora

Nessa avaliação, também foram inoculados tratamentos testemunha, onde foram inoculados nas placas de Petri apenas os  $F_{\text{combatidos}}$ . Porém, com a necessidade da adaptação da equação de cálculo de inibição, esses isolados não foram utilizados como parâmetro avaliativo, sendo cedidos para outras atividades desenvolvidas no laboratório Biotech Factory. Os dados obtidos foram submetidos à equação 2, adaptada de Menten *et al.* (1976). Após ter sido obtido o percentual de inibição, calculou-se a média aritmética simples e desvio padrão das 3 repetições de cada um dos cultivos pareados. Esses resultados foram compilados em gráficos (Figura 14).

Figura 14: Compilado de dados de percentual de inibição fungicida de *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum truncatum*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*



Fonte: Autora

Nos gráficos apresentados (Figura 14), podemos observar que a maior inibição de crescimento ocorreu pelo  $F_{\text{controle}}$  *Metharizium anisopliae* contra o  $F_{\text{combatido}}$  *Macrophomina phaseolina*, considerando 100% de inibição, seguidos por 70% de  $F_{\text{controle}}$  *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae* contra o  $F_{\text{combatido}}$  *Sclerotinia sclerotiorum*, com 70% de inibição. O  $F_{\text{controle}}$  *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae* também apresentou maior inibição do  $F_{\text{combatido}}$  *Colletotrichum gloesporioides*, enquanto o  $F_{\text{combatido}}$  *Colletotrichum Truncatum* teve o maior  $F_{\text{controle}}$  por *Trichoderma harzianum*, ambos com 50% de inibição. As menores inibições de crescimento ocorreram nos  $F_{\text{controle}}$  de *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana* +

*Metharizium anisopliae* + *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana* e *Beauveria bassiana* + *Trichoderma harzianum* sobre os respectivos  $F_{\text{combatidos}}$  *Colletotrichum gloesporioides*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum Truncatum*, com inibições respectivas de 10, 10, 20 e 30%.

As médias obtidas foram submetidas à ANOVA a 5% de probabilidade de erro, onde os resultados se apresentaram significativos ( $p < 0,05$ ). Logo, foram submetidos ao teste de comparação de médias Tukey, também a 5% de probabilidade de erro, no software estatístico SISVAR®. As análises estatísticas confirmaram as inferências geradas na análise dos gráficos com as médias aritméticas, conforme apresentado na Tabela 10. O controle do  $F_{\text{combatido}}$  *Macrophomina phaseolina* pelo  $F_{\text{controle}}$  *Metharizium anisopliae* possui poucos casos relatados na literatura científica, tornando promissora essa descoberta. Ao estudar *Fragaria ananassa*, Dara (2016) observou que as plantas tratadas com *M. anisopliae* uma semana antes da inoculação de *M. phaseolina* apresentaram maior resistência em comparação com as plantas inoculadas apenas com *M. phaseolina*. Este fato científico é um parâmetro confirmativo da ação fungicida do *M. anisopliae* sobre o fungo patogênico *M. phaseolina*.

Na análise estatística, o  $F_{\text{combatido}}$  *Sclerotinia sclerotiorum* apresentou as maiores inibições pelos  $F_{\text{controle}}$  duplos, triplo e individuais de *Trichoderma harzianum* e *Metharizium anisopliae*. Apenas o fungo individual de *Beauveria bassiana* não apresentou efeito significativo. Isto que se equipara a alguns resultados da literatura científica, visto que Souza (2018) concluiu que cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas em cultivo pareado mostraram potencial de inibição promissor, variando de 84,37 a 100% contra o patógeno, apontando os isolados de *Trichoderma* spp. como antagonistas promissores. Resultados similares também foram obtidos por Oliveira, Carvalho e Mello (2008), onde um isolado de *Trichoderma* spp. denominado CEN 316 ocupou, em média, 83% da superfície do meio, colonizando o patógeno. Assim, o isolado foi classificado como altamente antagônico a *S. sclerotiorum*. Mello *et al.* (2007) também encontraram efeitos similares, observando que vários isolados de *Trichoderma* spp., ao serem testados pelo método de cultivo pareado, inibiram o crescimento de *Sclerotium rolfsii*, colonizando totalmente o patógeno.

Para o  $F_{\text{combatido}}$  *Colletotrichum gloesporioides*, a análise estatística apresentou maior inibição pelo  $F_{\text{controle}}$  tanto pelo trio *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae* + *Trichoderma harzianum* quanto pelas duplas *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae*, *Metharizium anisopliae* + *Trichoderma harzianum* e *Beauveria bassiana* + *Trichoderma harzianum* (Tabela 11). Para os fungos individuais, apenas o *Trichoderma harzianum* apresentou inibição diferente dos demais e com um valor menor (aproximadamente 10%).

Contudo, Sharma *et al.* (2012) reportaram que as aplicações combinadas e individuais de agentes de biocontrole *T. harzianum*, *Bacillus subtilis* e *Pichia anomala*, por pulverização foliar ou por imersão dos frutos, apresentaram potencial para controlar a antracnose. Cruz-Quiroz *et al.* (2018), ao realizarem testes *in vitro* com cultura dupla, apontaram o uso de distintas cepas de *Trichoderma* sp. como um excelente agente biológico no controle de doenças fúngicas causadas por *C. gloeosporioides* e *Phytophthora capsici*. Assim, há a necessidade de estudos mais aprofundados para a avaliação do efeito fungicida de *Trichoderma harzianum*.

Tabela 10: Comparativo de médias de inibição (n = 3) de F<sub>controle</sub> sobre os F<sub>combatidos</sub> de *M. phaseolina* e *S. sclerotiorum*

F <sub>controle</sub>	Inibição de <i>M. phaseolina</i> (cm)*	Inibição de <i>M. phaseolina</i> (%)	F <sub>controle</sub>	Inibição de <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> (cm)*	Inibição de <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> (%)
MT	8,25 A	91,7	BVMT	6,60 A	73,3
BVMT	3,50 B	38,9	BVTC	5,13 AB	57,0
BVTC	3,00 B	33,3	TC	4,67 AB	51,9
MTTC	2,87 B	31,9	MT	4,50 AB	50,0
BV	2,87 BC	31,9	MTTC	3,83 AB	42,6
TC	1,37 BC	15,2	BVMTTC	3,17 AB	35,2
BVMTTC	1,07 C	11,9	BV	2,50 B	27,8
CV = 9,15%			CV = 18,15%		

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autora

Ghosh e Chakraborty (2012) também observaram atividades de biocontrole em ensaios *in vitro* envolvendo outra espécie de *Trichoderma* (*Trichoderma viridae*) e *Beauveria bassiana* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Não foram encontradas informações na literatura sobre o controle realizado com *Metharizium anisopliae*. Porém, como o efeito deste F<sub>controle</sub> isolado não foi representativo, não podemos afirmar que o mesmo seja promissor para o controle do F<sub>combatido</sub> em estudo, demonstrando a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre o mesmo. O respaldo da literatura científica comprova o controle efetivo de *C. gloeosporioides* utilizando combinações de fungos entomopatogênicos, efetivando a contribuição desta pesquisa para o controle biológico deste patógeno.

Como é possível observar na Tabela 11, os F<sub>controle</sub> não diferenciaram a inibição do crescimento do F<sub>combatido</sub> *C. truncatum*, ficando na faixa de 30 a 50%. Esses resultados



corroboram o poder de controle já demonstrado na literatura para outras espécies do gênero *Colletotrichum*, conforme mencionado para  $F_{\text{combatido}}$  *Colletotrichum gloesporioides*. Esta afirmação é reforçada por Chagas *et al.* (2016), os quais utilizaram pareamento de colônias e detectaram 46 estirpes de *Trichoderma* como eficientes antagonistas para os fitopatógenos *Colletotrichum cliviae* e *Colletotrichum truncatum*. Em relação à inibição do crescimento dos patógenos, Chagas *et al.* (2016) apontaram que 22 isolados de *Trichoderma* sp. foram eficientes antagonistas, com mais de 75% de inibição do *Colletotrichum cliviae* e três com mais de 90% do *Colletotrichum truncatum*.

Resultados semelhantes aos de Chagas (2016) foram obtidos por Farias, Cruz e Duarte (2020). Compreendendo a ameaça da antracnose causada por *C. truncatum* em feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.), os autores realizaram teste de confronto direto de patógenos *in vitro* com cepas de *Trichoderma* spp. que cresceu sobre a colônia do patógeno, ocupando toda placa a placa de Petri. Farias, Cruz e Duarte (2020) também observaram que os fungos antagonistas possuem potencial contra *C. truncatum* no teste de antibiose, com inibição do crescimento micelial e esporulação variando de 74,7 a 82,0% e 78,7 a 89,3%, respectivamente, mostrando o potencial antagonístico sobre *Colletotrichum truncatum*. Percebe-se promissores resultados na pesquisa do potencial fungicida dos fungos entomopatogênicos estudados, direcionando boas alternativas para o controle biológico das patogenias discutidas nesta pesquisa.

Tabela 11: Comparativo de médias de inibição de  $F_{\text{controle}}$  sobre os  $F_{\text{combatidos}}$  de *C. gloesporioides* e *C. truncatum*

$F_{\text{controle}}$	Inibição de <i>C. gloesporioides</i> (cm)*	Inibição de <i>C. gloesporioides</i> (%)	$F_{\text{controle}}$	Inibição de <i>C. truncatum</i> (cm)*	Inibição de <i>C. truncatum</i> (%)
BVMT	4,50 A	50,0	TC	4,33 A	48,1
BV	3,60 A	40,0	MT	3,73 A	41,5
BVMTTC	3,00 A	33,3	MTTC	3,67 A	40,7
MT	2,80 A	31,1	BVMT	3,67 A	40,7
BVTC	2,67 A	29,6	BV	3,60 A	40,0
MTTC	2,25 A	25,0	BVMTTC	3,53 A	39,3
TC	0,93 B	10,4	BVTC	2,83 A	31,5
CV = 15,60%			CV = 8,75%		

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autora

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As variáveis independentes glicose, sacarose, HPA, BDA e HP não apresentaram efeitos significativos na biomassa dos caldos fermentados. No co-cultivo de *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae*, a sacarose apresentou efeito significativo negativo na concentração de conídios, mesmo efeito observado com HPA no cultivo de *Trichoderma harzianum*.

A maioria dos cultivos e co-cultivos analisados se apresentou promissora em relação ao potencial inseticida para o controle biológico de *Euschistus heros*. São destacados os cultivos de *Metharizium anisopliae* e *Trichoderma harzianum*, os quais proporcionaram os maiores percentuais de mortalidade do inseto. Também são destacados os co-cultivos de *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae* + *Trichoderma harzianum* e *Beauveria bassiana* + *Trichoderma harzianum*. Embora com alguns valores menores, houve também mortalidades de *Euschistus heros* ocasionadas pelo cultivo individualizado de *Beauveria bassiana* e pelos co-cultivos *Metharizium anisopliae* + *Trichoderma harzianum* e *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae*.

O potencial fungicida dos fungos entomopatogênicos estudados também se apresenta promissor, visto que todos os fungos patogênicos estudados obtiveram algum nível de controle, com destaque para o controle total de *Macrophomina phaseolina* pelo fungo entomopatogênico de *Metharizium anisopliae*. Esta descoberta ainda apresenta poucos resultados na literatura científica, o que torna promissor o resultado encontrado nesta pesquisa. O controle do trio de fungos de *Beauveria bassiana* + *Metharizium anisopliae* + *Trichoderma harzianum*, apresentou-se efetivo contra os fitopatógenos de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotricum truncatum* e *Colletotrichum gloesporioides*. A utilização da fermentação submersa mostrou-se promissora para a produção dos caldos fermentados, apontando sua utilização como excelente alternativa para o aproveitamento de resíduos industriais.

Os resultados encontrados com esta pesquisa se mostram promissores, pois apontam efetivas alternativas para complemento do controle biológico da cultura da soja e demais culturas afetadas pelos patógenos estudados. Numa análise integrada, considerando-se os resultados nos âmbitos dos efeitos inseticida e fungicida avaliados nessa Dissertação de Mestrado, conclui-se que o fungo *Metharizium anisopliae* é o mais indicado para uso para se obter os maiores efeitos de controle.

## 6. RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para obtenção de resultados mais completos, e para novas oportunidades de pesquisa, sugere-se que os testes realizados em laboratório sejam adaptados para a realização destes a campo, a fim de se aproximar ainda mais da realidade do cultivo de soja. Importante também a recomendação da utilização de um maior número de insetos por tratamento para avaliação melhor da estimativa da mortalidade. E, junto disto, indica-se a utilização de outras diluições ou de outras metodologias para contagem do número de conídios, bem como a realização desta etapa experimental anterior à etapa de aplicação.

Indica-se a utilização do caldo fermentado no meio de cultura utilizado para avaliar o potencial fungicida dos microorganismos estudados, bem como o uso de outras metodologias. Um exemplo é o co-cultivo em estado sólido a fim de gerar melhores comparativos. Também sugere-se apresentar a proposta de pesquisa a empresas do ramo de controle biológico, a fim de conseguir o amparo financeiro necessário para o sucesso da pesquisa.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHEEM, M. A., Z. A. Effect of entomopathogenic fungi on the green stink bug, *Nezara viridula* L. sugar-beet in Egypt. Bull. NRC. 36: p 145–152. 2011. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/323150351\\_EFFECT\\_OF\\_ENTOMOPATHOGENIC\\_FUNGI\\_ON\\_THE\\_GREEN\\_STINK\\_BUG\\_NEZARA\\_VIRIDULA\\_L\\_IN\\_SUGAR-BEET\\_IN\\_EGYPT](https://www.researchgate.net/publication/323150351_EFFECT_OF_ENTOMOPATHOGENIC_FUNGI_ON_THE_GREEN_STINK_BUG_NEZARA_VIRIDULA_L_IN_SUGAR-BEET_IN_EGYPT)>. Acesso em: 28. Fev. 2023
- AL-HAZMI, A. S; TARIQJAVEED, M. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viridae* against *Meloidogyne javanica* on tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**. vol.23, [s/n], p.: 288-292. 2016. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007> Acesso em: 12. Mar. 2022
- AITA, B.C. **Produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido e imobilização por spray drying**. 2020. 152 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Campus Santa Maria, RS / 2020.
- AITA, B.C, *et al*; Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. Vol.7, [s/n], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103193> Acesso em: 02. Jun. 2022
- ALMEIDA, A.M.R.; TORRES, E.; FARIAS, J.R.B.; BENATO, L.C; PINTO, M.C.; MARIN, S.R.R. **Macrophomina phaseolina em soja: Sistema de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética**. Londrina-PR: Embrapa Soja, 2001, 47p.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. 1163 p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz; v.4).
- ASH, G. J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, n. 3, p. 230–240, mar. 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.08.007> > Acesso em: 20.Dez.2022
- ARMANDO, Q. *et. al*. Efectividad de fungicidas convencionales y biorracionales sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. **Revista Mexicana Ciencias Agrícolas**. vol.11, [s/n] p.:2149–2156. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6nspe11/2007-0934-remexca-6-spe11-2149.pdf> Acesso em: 13. Mar. 2022.
- ARTHURS, S.; DARA, S. K. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol.165 p.13-21. 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008> > Acesso em: 12.Jan.2023.

- BARBOSA, T. S *et. al.* Susceptibility of *Tetranychus ogmophallos* (Acari: Tetranychidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Florida Entomologist**. vol.101, n.2, p.: 249-253. 2018. Disponível em: doi: <http://dx.doi.org/10.1653/024.101.0215>. Acesso: 15. Mar.2022.
- BARRETO, A.A. **Eficiência de *Trichoderma asperellum* na cultura da soja no município de Formoso do Araguaia**. 2019. 23 f. Monografia (Monografia do Curso de Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Curupi, TO / 2019.
- BEGUM, M.M *et al.* Patogenicidade de *Colletotrichum truncatum* e sua influência na qualidade de sementes de soja. **Revista Internacional de Agricultura e Biologia**, v.10, n.4, p.393-398, 2008. ISSN. Online: 1814–9596 07– 443/MFA/2008/10– 4–393–398 <http://www.fspublishers.org>
- BERNARDO, J. T. *et. al.* Isolamento on farm de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**. 2019; 5(3): 263-270. Doi: <https://doi.org/10.21674/2448-0479.53.263-270>
- BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2009. 341p.
- BETTIOL, W *et al.* **IV curso teórico e prático: Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma***. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. Disponível em: < [https://www.cnpma.embrapa.br/down\\_site/forum/2012/trichoderma/Apostila\\_Trichoderma\\_2012.pdf](https://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/trichoderma/Apostila_Trichoderma_2012.pdf) > Acesso em: 21. Dez. 2022
- BHANU PRAKASH GVS, PADMAJA V, SIVA KIRAN RR. Statistical optimization of process variables for the large scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. vol.99, p.1530–1537. 2008.
- BISSETT, J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA Fungus**. vol. 6, n.2, p.:263-295. Disponível em: doi: <http://dx.doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02> Acesso em: 14. Mar. 2022
- BOARETTO, C; DANELLI, A.L.D. Podridão cinzenta da raiz. In: Reis, E. M.; Casa, R. T. **Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado**. Passo Fundo: Berthier, 2012. p. 281-296.
- BOLAND, G.J; HALL, R., 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. vol.16, n.2 p.:93–108. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07060669409500766>. Acesso em: 16. Mar. 2022.
- 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**. vol.7,

[s/n] p.:1–16. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x>. Acesso em: 16. Mar. 2022.

BON, V. J. **Efeito da interação de *Trissolcus basal* e *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) na efetividade do controle biológico de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2021. 89f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP/ 2021.

BRUN, T. **Controle de plantas daninhas com bioherbicida produzido por fermentação de *Diaporthe schini***. 2020. 75 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola. Área de Concentração: Engenharia Agroambiental.) – Universidade Federal de Santa Maria, Campus Santa Maria, RS / 2020.

BUENO, A. F *et al.* 2012. Inimigos naturais das pragas da soja. In: Hoffmann-Campo, C. B., Corrêa-Ferreira, B. S., Moscardi, F. (Eds.), Soja: manejo integrado de insetos e outros Artrópodes-praga. Brasília, DF: Embrapa, p. 493-630.

CARVALHO, D. D. C. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. vol.50, n.12, p.: 1220-1224.2015. Disponível em: doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015001200012> Acesso em: 12. Mar.2022.

CHAGAS, L.F.B *et al.* Bioprospecção de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum cliviae* e *C. truncatum*. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 14, n.4, p. 238-242, out. /dez. 2016. Disponível em: <<https://www.seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/114658/61956>> Acesso em: 01.Jan. 2022.

CHEN *et al.* PCR-based Detection and Differentiation of Anthracnose Pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from Vegetable Soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology**. Vol.154, [s/n], p.654–662. 2006. Disponível em: DOI: 10.1111/j.1439-0434.2006. 01163.x

COLEY-SMITH, J; COOKE, R. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Phytopathology**. vol.9 [s/n] p.:65–92. 1971. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.py.09.090171.000433> Acesso em 14. Mar.2022.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Boletim da safra de Grãos**. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>> Acesso em: 08 Maio 2023.

CONTE, O. *et al.* Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2017/18 no Paraná. **Documentos 402**. Embrapa Soja, Londrina/PR, 2018.

- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina: Embrapa-CNPSO, p.45 (Circular Técnica, 24), 1999.
- CRUZ, I., 1994. Manejo Integrado De Pragas De Milho Com Ênfase Para O Controle Biológico. Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em: <https://www.embrapa.br/buscade-publicacoes/-/publicacao/478707/manejo-integrado-de-pragas-de-milho-com-enfase-aocntrole-biologico> acesso em: 31. Maio.2022
- CRUZ-QUIROZ *et al.*, Inibição do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phytophthora capsici* por cepas nativas de *Trichoderma mexicanas*. **Karbala International Journal of Modern Science** (2018), <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.03.002>
- DANIEL, J.L.A. **Efeito de agentes de controle sobre *Euschistus heros* (hemiptera: pentatomidae) na cultura da soja, em diferentes estádios fenológicos e estratos do dossel**. 2019. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas. Área de Concentração: Agroecossistemas) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos.PR/2019.
- DANIELSON, G.A, NELSON, B.D; HELMS T.C. Effect of *Sclerotinia stem rot* on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**. vol.88., no3 p.:297–300. 2004. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS.2004.88.3.297> Acesso em: 12.Mar. 2022.
- DARA, S.K. Preliminary report on the potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* s.l. in antagonizing the charcoal rot causing fungus *Macrophomina phaseolina* in strawberry. **E-journal of entomology and biologicals**. 2016. [s/n]. Disponível em: <<https://ucanr.edu/blogs/strawberries-vegetables/index.cfm?start=17>> Acesso em: 01. Fev. 2023.
- DENNIS, C. E WEBSTER, J. (1971) Propriedades antagônicas de grupos de espécies de *Trichoderma*: II. Produção de Antibióticos Voláteis. **Transactions of the British Mycological Society**, vol.57, p.:363-369.
- DEY, S; DUTTA, P; MAJUMDAR, S.; Biological Control of *Macrophomina phaseolina* in *Vigna mungo* L. by Endophytic *Klebsiella pneumoniae* HR1. **Jordan Journal of Biological Sciences**, vol,12, n.2, p.219-227. ISSN 1995-663. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/333601537\\_Biological\\_Control\\_of\\_Macrophomina\\_phaseolina\\_in\\_Vigna\\_mungo\\_L\\_by\\_Endophytic\\_Klebsiella\\_pneumoniae\\_HR1](https://www.researchgate.net/publication/333601537_Biological_Control_of_Macrophomina_phaseolina_in_Vigna_mungo_L_by_Endophytic_Klebsiella_pneumoniae_HR1)> Acesso em: 05. Ago.2022.
- DIAS, R.P. **Produtos fitossanitários com uso aprovado para agricultura orgânica Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016.. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais>

tematicas/documentos/camaras-tematicas/agricultura-organica/anos-anteriores/produtos fitossanitarios-embrapa-27.pdf Acesso em: 10.Jan. 2023

DI, Y. L. Baseline sensitivity and efficacy of trifloxystrobin against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop Protection**. vol.87 p.:31–36. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.020> Acesso em 12.Mar. 2022

FARIAS, O. R; CRUZ, J.M.F. L; DUARTE, I.G. Controle in vitro de *Colletotrichum truncatum* do Feijão Fava (*Phaseolus lunatus*) por *Trichoderma* spp. **Agrarian Sciences Journal**. V.12, p.1-6. 2020. <https://doi.org/10.35699/2447-6218.2020.18464>

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45. 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.

FREITAS, Márcio de Campos Martins de. A cultura da Soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 07, n. 12, p.01-12, maio 2011.

GARCIA, J. F; MACEDO, L. P. M; BOTELHO, S. M. As cigarrinhas da cana-de-açúcar. In: Boletim Técnico Biocontrol 1: controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho; 2006. p. 29-33.

GHOSH, S. K.; CHAKRABORTY, N. In vitro biological control of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of anthracnose of sarpagandha (*Rouwolfia serpentina*). **Agriculture and Biology Journal of North America**, Milford, v. 3, n. 6, p. 306-310, June 2012.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, 29 jan. 2000.

GODOY, K. B.; ÁVILA, C. J.; MARQUES-ACRE, C. C. Controle Biológico de Percevejos Fitófagos da Soja na Região de Dourados, MS. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 40. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 30 p., 2007.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, 15 abr. 2009.

GRIGOLLI, J. F. J. **MANEJO DE DOENÇAS NA CULTURA DA SOJA**. Fundação MS, Tecnologia e Produção: Soja 2014/2015, 2015. Disponível em: <



- <https://www.fundacaoms.org.br/base/www/fundacaoms.org.br/media/attachments/216/216/newarchive-216.pdf> >, acesso em: 15/0/2022.
- GROTH, M; FILHO, R; SOARES, V; BERNARDI, D. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* isolates on *Nezara viridula* and *Dichelops melacanthus* in wheat crop. **Arquivos do Instituto Biológico**. vol.84, [s/n], p.:1-8. 2017. Disponível em: doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000032016> Acesso em: 20. Mar.2022
- 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.
- HADDAD, P.E et. al. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. vol. 52 [s/n] p.:1140–1148. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017001200002> Acesso em: 17. Mar.2022.
- HANADA, R. E; COSTA, I. B. Efeito da inoculação fúngica de *Trichoderma martiale* como agente biocontrole contra podridão parda do cacauieiro. In: Souza, L. A. G. de, Silva Filho, D. F., Benavente, C. A. T., Noda, H. Ciência e tecnologia aplicada aos agroecossistemas da Amazônia Central. Manaus: **Inpa**.2018. p. 133-142.
- Hartman, GL *et al.*; **Compendio de doenças da soja e animais de estimação**. 5ª ed APS Press, St. Paul, Minnesota. 2015.
- HENNING, A.A.; **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 72p. (Embrapa Soja, Documentos, 256).
- HENNING, A. A. MANUAL DE IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇAS DE SOJA. Embrapa, Documentos, n. 256, 2014. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/991687/manual-de-identificacao-de-doencas-de-soja> >, acesso em: 15/07/2022.
- OFFMANN-CAMPO, Clara B. *et al.* Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. **Circular técnica Embrapa Soja**. Londrina: Embrapa Soja, [s/v], n.30, p.1-70, 2000.
- HOFFMAN, D.D et. al. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**. vol.82 no7 p.:826–829, 1998. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS.1998.82.7.826> Acesso em: 15.Mar. 2022
- HUANG, H.C; HOES, J.A. Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. **Canadian Journal of Botany**. vol.54, [s/n], p.:406–410. 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/b76-039> Acesso em: 20.Mar. 2022.

- HUZAR-NOVAKOWISKI J; PAUL, P.A; DORRANCE, A.E. Host resistance and chemical control for management of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ohio. **Phytopathology**. vol. 107 p.:937–949.2017 Disponível em: <https://doi.org/10.1094/phyto-01-17-0030-r> Acesso em 13.Mar. 2022
- ITO, M.F.; PARISI, J.J.D. **Mofô branco: Doença que exige muita atenção principalmente no período outono inverno**. *Trichoderma* spp., em áreas cultivadas do cerrado. *JV Biotecnologia*. 2010. 9p. Disponível em: <http://www.agronomianet.com.br/Trichoderma.pdf> Acesso em: 01. Set. 2021.
- KLAIC, R. *et al.* An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. Em: **Fungal Biomolecules**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p.183–199.
- LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>>.Acesso em: 28.Fev.2023.
- LANA, U.G.P *et al.* Avaliação da Qualidade de Biopesticidas à Base de *Bacillus thuringiensis* Produzidos em Sistema “*on farm*”. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 23 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 191).
- LIANG HJ *et. al.* Baseline sensitivity and control efficacy of fluazinam against *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**. vol. 142 p.:691–699. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-015-0644-5> Acesso em:17. Março.2022.
- LI, Y.; PENG, X.; CHEN, H. Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.20, n.20, p 1-6, 2013.
- LOBO JUNIOR, M. Manejo do mofô-branco. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 10., 2011, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2011.
- LORENCETTI, G *et al.* Eficiência de *Beauveria bassiana* Vuill. e *Isaria* sp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Ciência Florestal**. vol.28, n.1, p.: 403-411. 2018. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.5902/1980509831612>. Acesso em: 21. Mar.2022.
- MARQUES, R. P., MONTEIRO, A. C., PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*) **Ciência Rural**. v.34, n.6, nov-dez, 2004.
- MARQUEZ, N *et.al.* *Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. **Frontiers in Plant Science**. v 12, [s/n], 2021. Disponível em: <

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.634397/full>> Acesso em: 15.Jul.2022.

MARTINEZ-MEDINA, A., Pozo, M. J., Cammue, B. P. A., and Vos, C. M. F. (2016). "Belowground defence strategies in plants: The plant–Trichoderma dialogue,". **Springer International Publishing**, [s/n], [s/v], p. 301–327. Disponível em: <doi: 10.1007/978-3-319-42319-7\_1> Acesso em: 18.Jul.2022

MASCARIN, G. M *et al.* The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological Control**. 66(3), 209–218, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.05.001>

MASCARIN, GM e JARONSKI, ST. A produção e usos de *Beauveria bassiana* como inseticida microbiano. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32(11), 177. 2016. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>

MASCARIN, G. M. *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2018.

MELLO, S. C *et al.* Cepas de *Trichoderma spp.* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11, n. 1, p. 3-9, 2007.

MENGISTU, A. et. al. Evaluation of soybean genotypes for resistance to charcoal rot. **Plant Management Network**, Saint Paul, v., n., p.1-15, 2011. Disponível em:<<https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2011/charcoal/>>. Acesso em: 17.Jul. 2022.

MENTEN, J.O.M.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, n.2, p.57-66, 1976 IN: SOUZA, P.B. **Avaliação do cultivo pareado de *Trichoderma spp* no controle biológico de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*)**. 2018. 10 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas.) –. Fundação Carmelitana Mário Palmério, Campus Monte Carmelo.MG/ 2017.

MESQUITA, D. C. M et. al. Antagonismo in vitro de *Trichoderma spp.* a *Sclerotinia sclerotiorum* do feijão comum. **Agropecuária Científica no Semiárido**. vol.13, n., p.: 1-4. 2017. Disponível em: doi: <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v13i1.710>. Acesso em: 15. Mar.2022.

MEYER, M. C *et al.* **Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2018/19: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos**. Londrina: Embrapa Soja, 2019. 5 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 152).

- MEYER, M.C *et al.* **Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2019/2020: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos.** Londrina: Embrapa Soja, 2020. 10 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 165).
- MISHRA, S; KUMAR, P; MALIK, A. Suitability of agricultural by-products as production médium. for spore production by *Beauveria bassiana* HQ917687. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture.** vol.5, [s/n], p.:179–184, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40093-016-0127-5> Acesso em: 28. Fev. 2022.
- MORAES, S.R.G; BONALDO, S.M; GASPARETTO, A.R.R.; Geographical distribution, diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Scientific Electronic Archives.** Vol, 13, n.7. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/342601536\\_Scientific\\_Electronic\\_Archives\\_Geographical\\_distribution\\_diversity\\_and\\_pathogenicity\\_of\\_Colletotrichum\\_associated\\_with\\_soybean\\_anthracnose\\_in\\_Brazil](https://www.researchgate.net/publication/342601536_Scientific_Electronic_Archives_Geographical_distribution_diversity_and_pathogenicity_of_Colletotrichum_associated_with_soybean_anthracnose_in_Brazil)> Acesso em: 02.Ago.2022.
- MUELLER, D.S; HARTMAN, G.L; PEDERSEN, W.L. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease.** vol.83. n.12 p.: 1113–1115. 1999. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS.1999.83.12.1113> Acesso em: 12. Mar.2022.
- NAVA, D. E., 2007. *et al.* Insetos praga e seu controle. In: Antunes, L. E.C.; Raseira, M.C.B. (Ed.). Cultivo de amoreira-preta (*Rubus* spp.). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.79-94.
- NEVES, P. M. J. O., Santoro, P. H. & Silva, R. Z. da. Utilização de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill no manejo integrado da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). In: Vezon, M., De Paula JR., J. T. & Pallini, A. (eds.). Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: Epamig; 2006. p. 137-158.
- NORA, D. D; **Descrição e biologia do percevejo-marrom (*Euschistus heros*).** Disponível em: <<https://elevagro.com/materiais-didaticos/descricao-e-biologia-do-percevejo-marrom-euschistus-heros/>>. Acesso em: 15. Ago.2021.
- NORA, D. D; **Isolamento e seleção de fungos para o controle do percevejo- marrom.** 2019. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo.) –. Universidade Federal de Santa Maria, Câmpus Santa Maria.RS/ 2019.
- NORA, D. D *et al.* Isolation and evaluation of entomopathogenic fungi against the neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) under laboratory conditions. **Biocontrol Science and Technology**, DOI: 10.1080/09583157.2020.1826904. 2020

OLIVEIRA, G.P.; *Trichoderma spp.* como potenciais agentes de controle biológico para podridão vermelha ocasionada por *Colletotrichum falcatum* em resíduos de pós-colheita de cana-de-açúcar. 2020. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia.) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas.MG/2020.

OLIVEIRA, T.A.S; CARVALHO, D.D.C; MELLO, S.C.M. Avaliação da Atividade Antagônica in vitro de Isolados de *Trichoderma sp.* para Biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Comunicado técnico 177**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília-DF. 2008. ISSN 9192-0099. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/190441/1/cot1770808.pdf> > Acesso em:01. Fev.2023

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. de F.; SILVA, F. da. **Insetos que atacam vagens e grãos**. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília: Embrapa, p. 335-420, 2012.

PARRA, J. R et. al, 2002. Controle biológico: terminologia. In: Parra, J. R. P.; Botelho, P. S. M., Correa-Ferreira, B. S., Bento, J. M. S. (Ed.). Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo: Manole, p. 1- 16.

PELTIER AJ *et al.* Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management** vol.3 [s/n] p.:1–7.2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/IPM11033> Acesso em: 15. Mar.2022

QI, G., JI, B., ZHANG, Y., HUANG, L., WANG, J., GAO, W. Microbiome-based screening and co-fermentation of rhizospheric microorganisms for highly ginsenoside Rg3 production. **Microbiological Research**. vol. 261, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127054> Acesso em: 27. Jan.2023

Qu, S.. Wang, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, 83, 96–103. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.010>

ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química.) - Universidade Federal de Uberlândia, Campus Uberlândia. MG/2010.

SAEED, S. *et al.* Microbial conversion of pomegranate peels to biovanillin using submerged fermentation and process optimization through statistical design. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 31 jan. 2022.

SHARMA A, *et al.* Effectiveness of fungal, bacterial and yeast antagonists for management of mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*).

- Egyptian Journal of Biological Pest Control.** (2021) p.31:135.  
<https://doi.org/10.1186/s41938-021-00480-9>
- SHARMA A, et al. Insights into rapid composting of paddy straw augmented with efficient microorganism consortium. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture.** vol.3 p.53-54, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40093-014-0054-2> Acesso em: 01. Set. 2021.
- SCHMALTZ, S. **Produção de enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana* em fermentação submersa assistida por ultrassom.** 2020. 74 f. Tese (Dissertação de mestrado Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Campus Santa Maria, RS / 2020.
- SEIXAS, C. D. S *et al.* Manejo de doenças. In: SEIXAS, C. D.S *et al.* **Tecnologias de produção de soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2020. p. 227-263. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17).
- SESAN, T. E; CSEP, N. (1995) Investigations on *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* spp. to control diseases of industrial crops caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bulletin OILB SROP (France).** [S/v].1995. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR9505744> Acesso em: 20.Mar.2022.
- SINGHANIA, R. R. *et al.* Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, jun. 2010.
- SILVA-SANTANA, M.F *et al.* Selection and characterisation of *Beauveria bassiana* fungus and their potential to control the brown stink bug. **Biocontrol Science and Technology.** Vol 32, p. 90-102, 2022.
- SOSA-GÓMEZ, DR; MOSCARDI, F. Estudos de laboratório e de campo sobre a infecção de percevejos *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol.71, n.2, p. 115–120. 1998.<https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4716>.
- SOUZA, P.B. **Avaliação do cultivo pareado de *Trichoderma* spp no controle biológico de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*).** 2018. 10 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas.) –. Fundação Carmelitana Mário Palmério, Campus Monte Carmelo.MG/ 2017.
- SUJII, E.R *et al.* Controle biológico de insetos-praga na soja orgânica do distrito federal. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.19, n.2, p.299-312, maio/ago. 2002.

- TODERO, I. BRUN, T. **Desenvolvimento de um bioherbicida a partir de metabólitos de *Phoma* sp. para o manejo de plantas daninhas.** 2017. 78 f. Dissertação (Graduação em Ciências biológicas. Área de Concentração: Engenharia Agroambiental.) – Universidade Federal de Santa Maria, Câmpus Santa Maria.RS/ 2017.
- VEGA, F. E. *et al.* Fungal entomopathogens. **Insect Pathology**, v. 2, p. 171-220, 2012.
- Vega, F. E. et al. Chapter 6. Dissemination of beneficial microbial agents by insects. In L. K. Lacey & H. K. Kaya (Eds.), **Field manual of techniques in invertebrate pathology** (pp. 153–177). Kluwer Academic Publishers. 2000. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1547-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1547-8_6)
- VINHOLES, P. S. **Associação genômica para resistência da soja a *Meloidogyne javanica* e *Macrophomina phaseolina*.** 2014. 115f. Tese (doutorado em fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG/ 2014.
- Wang, C., Wang, S. Insect pathogenic fungi. Genomics, molecular interactions, and genetic improvements. **Annual Review of Entomology**, 62(1), 73–90. (2017). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035509>.
- WILLBUR, J et. al. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Tropical Plant Pathology**. vol.44, [s/n], p.:3-11. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0250-0> Acesso em: 14. Mar. 2022
- ZAMBIAZZI *et al.* Controle biológico in-vitro do percevejo-marrom (*Euschistus heros*) com *Beauveria bassiana*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 5, n. 3, p. 43, 2011.
- ZENG, W *et. al.* Use of *Coniothyrium minutans* and other microorganisms for reducing *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**. vol. 60 p.:225–232. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.009> Acesso em: 16. Mar. 2022.
- ZHU, F *et al.* *Aspergicin*, a new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. **Chem Nat Compd**. V.47, p.767– 769. 2011. DOI:10.1007/s10600-011-0053-8

## 8. APÊNCICES

### 8.1 APÊNDICE A - EXEMPLO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA - SOFTWARE SISVAR

Variável analisada: MORTALIDAD

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y )

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CALDO	104	187280.423280	1800.773301	6.381	0.0000
erro	210	59259.259259	282.186949		
Total corrigido	314	246539.682540			
CV (%) =	19.74				
Média geral:	85.0793651	Número de observações:	315		

Teste Tukey para a FV CALDO

DMS: 60,3571010231785 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 9,69857289937744

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
MTTC2	0.000000	a1
BVMT7	0.000000	a1
BVMT6	0.000000	a1
BVMT14	33.333333	a1 a2
BVMT13	33.333333	a1 a2
MTTC7	33.333333	a1 a2
MTTC8	33.333333	a1 a2
MTTC1	33.333333	a1 a2
BV15	33.333333	a1 a2
BVTC2	44.444444	a1 a2 a3
BVTC10	44.444444	a1 a2 a3
BV8	55.555556	a1 a2 a3
BV14	55.555556	a1 a2 a3
BVMTTC12	55.555556	a1 a2 a3
BVMTTC11	55.555556	a1 a2 a3
BVMT3	55.555556	a1 a2 a3
TC13	66.666667	a2 a3
BV1	66.666667	a2 a3
BVTC9	66.666667	a2 a3
BV5	66.666667	a2 a3
MT7	66.666667	a2 a3
BVMT8	66.666667	a2 a3
BVTC12	66.666667	a2 a3
BVMT15	66.666667	a2 a3
BV13	77.777778	a2 a3
BVMTTC14	77.777778	a2 a3
MT13	77.777778	a2 a3
BV11	77.777778	a2 a3
BV3	77.777778	a2 a3
BVTC6	88.888889	a2 a3
BVMTTC2	88.888889	a2 a3
MT14	88.888889	a2 a3



BVTC1	88.888889	a2 a3
BVTC3	88.888889	a2 a3
BV4	88.888889	a2 a3
BV6	88.888889	a2 a3
BVTC11	88.888889	a2 a3
MT2	88.888889	a2 a3
MT9	88.888889	a2 a3
BVMTTC10	88.888889	a2 a3
BVMTTC15	88.888889	a2 a3
MT8	88.888889	a2 a3
BVMT5	88.888889	a2 a3
MTTC10	100.000000	a3
MTTC11	100.000000	a3
MTTC14	100.000000	a3
MTTC13	100.000000	a3
BV12	100.000000	a3
MTTC15	100.000000	a3
MT6	100.000000	a3
MTTC12	100.000000	a3
MTTC3	100.000000	a3
TC3	100.000000	a3
TC4	100.000000	a3
TC15	100.000000	a3
TC2	100.000000	a3
TC5	100.000000	a3
TC8	100.000000	a3
TC9	100.000000	a3
TC6	100.000000	a3
TC7	100.000000	a3
TC14	100.000000	a3
MTTC6	100.000000	a3
BV10	100.000000	a3
MTTC4	100.000000	a3
MTTC5	100.000000	a3
MTTC9	100.000000	a3
TC11	100.000000	a3
TC12	100.000000	a3
TC1	100.000000	a3
TC10	100.000000	a3
BVMTTC13	100.000000	a3
BVMTTC3	100.000000	a3
BVMT9	100.000000	a3
BVMTTC1	100.000000	a3
BVMTTC6	100.000000	a3
BVMTTC7	100.000000	a3
BVMTTC4	100.000000	a3
BVMTTC5	100.000000	a3
BV2	100.000000	a3
BVMT1	100.000000	a3
BVMT10	100.000000	a3
BV7	100.000000	a3
BV9	100.000000	a3
BVMT2	100.000000	a3
BVMT4	100.000000	a3
BVMT11	100.000000	a3
BVMT12	100.000000	a3
MT11	100.000000	a3
MT12	100.000000	a3
MT1	100.000000	a3
MT10	100.000000	a3
MT4	100.000000	a3
MT5	100.000000	a3
MT15	100.000000	a3
MT3	100.000000	a3
BVTC8	100.000000	a3
BVTC13	100.000000	a3
BVTC14	100.000000	a3
BVMTTC8	100.000000	a3
BVMTTC9	100.000000	a3
BVTC5	100.000000	a3
BVTC7	100.000000	a3
BVTC15	100.000000	a3
BVTC4	100.000000	a3

---



		Dia Pós Aplicação																				%			
		1 - 15/11/2022		2 - 16/11/2022		3 - 17/11/2022		4 - 18/11/2022		5 - 19/11/2022		6 - 20/11/2022		7 - 21/11/2022		8 - 22/11/2022		9 - 23/11/2022		10 - 24/11/2022					
		Repetição	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M					
T R A T A M E N T O	1 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	0	3	100	
		3	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	2 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100	
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	100
	3 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	100
	4 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	100
	5 TC	1	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	100
6 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100	
7 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100	
8 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	1	1	1	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	0	1	2	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100	
9 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	100	
10 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100	
	2	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	100	
11 TC	1	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	0	3	100	
12 TC	1	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100	
13 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	0
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	100	
14 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	100	
15 TC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	100	

		Dia Pós Aplicação																							
		1 - 15/11/2022		2 - 16/11/2022		3 - 17/11/2022		4 - 18/11/2022		5 - 19/11/2022		6 - 20/11/2022		7 - 21/11/2022		8 - 22/11/2022		9 - 23/11/2022		10 - 24/11/2022					
		Repetição	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	%		
T R A T A M E N T O	1 MT	1	3	0	3	0	3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	3	0	3	100	
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100		
	2 MT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	0	2	0	2	0	1	2	66.66667		
		2	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100	
	3 MT	1	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	100		
		3	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	100		
	4 MT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	100		
	5 MT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	100		
	6 MT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	1	2	0	3	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	100		
	7 MT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0		
	8 MT	1	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	66.66667		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	1	2	0	3	100		
	9 MT	1	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100		
		2	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	66.66667		
	10 MT	1	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	100		
		2	3	0	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100		
	11 MT	1	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	100		
	12 MT	1	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100		
	13 MT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	66.66667		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	66.66667		
	14 MT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	66.66667
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	100		
	15 MT	1	3	0	3	0	2	1	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100		
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	100		
		3	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	100		

		Dia Pós Aplicação																				%	
		1 - 16/11/2022		2 - 17/11/2022		3 - 18/11/2022		4 - 19/11/2022		5 - 20/11/2022		6 - 21/11/2022		7 - 22/11/2022		8 - 23/11/2022		9 - 24/11/2022		10 - 25/11/2022			
		Repetição	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M			
T R A T A M E N T O	1 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.66667
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	100
	2 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.33333
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.33333
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	66.66667
	3 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	1	2	66.66667
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100
	4 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	5 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	100
	6 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.66667
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	100
	7 BVTC	1	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	8 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	0	3	100
	9 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.33333
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	66.66667
	10 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.66667
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.33333
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.33333
	11 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	66.66667
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	100
	12 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	66.66667
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	66.66667
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	66.66667
	13 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100
		3	1	2	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	14 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	0	3	0	3	100
	15 BVTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	100

		Dia Pós Aplicação																				%	
		1 - 16/11/2022		2 - 17/11/2022		3 - 18/11/2022		4 - 19/11/2022		5 - 20/11/2022		6 - 21/11/2022		7 - 22/11/2022		8 - 23/11/2022		9 - 24/11/2022		10 - 25/11/2022			
		Repetição	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M			
T R A T A M E N T O	1 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	100
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100
	2 BVMT	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3	100
		2	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	100
	3 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.6667
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.6667
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.3333
	4 BVMT	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3	100
		2	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	0	3	0	3	100
		3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3	100
	5 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.6667
		2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	100
		3	2	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3	100
6 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	
7 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	
8 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.6667	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	66.6667	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	66.6667	
9 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100	
10 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100	
11 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	100	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100	
12 BVMT	1	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3	100	
	2	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	0	3	0	3	100	
13 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.3333	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.3333	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.3333	
14 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.3333	
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.3333	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.3333	
15 BVMT	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.6667	
	2	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	66.6667	
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.6667	

T R A T A M E N T O	Repetição	Dia Pós Aplicação																				
		1 - 16/11/2022		2 - 17/11/2022		3 - 18/11/2022		4 - 19/11/2022		5 - 20/11/2022		6 - 21/11/2022		7 - 22/11/2022		8 - 23/11/2022		9 - 24/11/2022		10 - 25/11/2022		
		V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	
1 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.33333
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.33333
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.33333
2 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0
3 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	0	3	100
4 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	100
5 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	100
6 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
7 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.33333
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.33333
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.33333
8 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.33333
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.33333
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	33.33333
9 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	100
10 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
11 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
12 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	0	3	100
13 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
14 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	100
15 MTTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0			0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0			0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0			0	3	100

T R A T A M E N T O	Dia Pós Aplicação																				%	
	Repetição	1 - 16/11/2022		2 - 17/11/2022		3 - 18/11/2022		4 - 19/11/2022		5 - 20/11/2022		6 - 21/11/2022		7 - 22/11/2022		8 - 23/11/2022		9 - 24/11/2022		10 - 25/11/2022		
		V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V		M
1 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
2 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	1	2	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	66.66667
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	100
3 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	0	2	1	0	3	100
	3	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	100
4 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	2	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	100
5 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	100
6 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	3	1	2	1	2	1	1	2	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	0	0	2	0	3	0	3	100
7 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
8 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	0	2	0	0	3	0	3	100
9 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	1	1	1	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	1	2	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	100
10 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	66.66667
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	0	3	100
11 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	66.66667
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	66.66667
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	33.33333
12 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	2	1	2	1	33.33333
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	66.66667
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	1	2	1	2	66.66667
13 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	100
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	0	3	0	3	100
14 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	2	1	33.33333
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	100
15 BVM TTC	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	1	2	1	2	66.66667
	2	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	0	3	0	3	100
	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	100



### 8.3.1 APÊNDICE C - TABELAS EXCEL® COM RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS- Exemplo de tabela de conídios – Parte 1

CoFeSU	Classificação	Diluição	Campo 1					Campo 2				
			E1	E2	E3	E4	E5	E1	E2	E3	E4	E5
BVMTTC1	TRIO	10 <sup>-3</sup>	35	49	70	70	60	69	62	60	65	60
BVMTTC2	TRIO	10 <sup>-3</sup>	58	56	60	50	70	54	50	49	60	62
BVMTTC3	TRIO	10 <sup>-3</sup>	50	51	61	55	30	68	60	55	56	60
BVMTTC4	TRIO	10 <sup>-3</sup>	52	54	66	59	54	62	55	54	66	57
BVMTTC5	TRIO	10 <sup>-3</sup>	55	54	59	50	50	61	54	66	66	52
BVMTTC6	TRIO	10 <sup>-3</sup>	60	56	58	60	61	54	54	53	47	56
BVMTTC7	TRIO	10 <sup>-3</sup>	46	45	38	55	50	40	43	60	60	58
BVMTTC8	TRIO	10 <sup>-3</sup>	47	78	50	60	57	60	60	64	56	65
BVMTTC9	TRIO	10 <sup>-3</sup>	50	42	66	65	62	44	72	48	65	60
BVMTTC10	TRIO	10 <sup>-3</sup>	52	40	50	51	50	55	50	56	40	45
BVMTTC11	TRIO	10 <sup>-3</sup>	60	45	55	65	50	68	68	65	62	50
BVMTTC12	TRIO	10 <sup>-3</sup>	53	48	56	70	55	50	65	72	64	50
BVMTTC13	TRIO	10 <sup>-3</sup>	60	52	55	57	60	60	59	62	65	55
BVMTTC14	TRIO	10 <sup>-3</sup>	58	42	59	66	61	66	59	49	60	60
BVMTTC15	TRIO	10 <sup>-3</sup>	50	50	58	53	60	59	59	62	62	61

## 8.3.2. APÊNCICE C - TABELAS EXCEL® COM RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS- Exemplo de tabela de conídios – Parte 2

XC1	XC2	C/mL	Tempo de contagem	Papel Filtro (g)	Peso Biomassa + Papel Filtro (g)	Biomassa (g)
56.8	63.2	15000000	24 h	0.800	1.486	0.686
58.8	55	14225000	24 h	0.800	1.190	0.390
49.4	59.8	13650000	24 h	0.780	1.031	0.251
57	58.8	14475000	24 h	0.790	1.130	0.340
53.6	59.8	14175000	24 h	0.780	1.126	0.346
59	52.8	13975000	24 h	0.780	1.097	0.317
46.8	52.2	12375000	24 h	0.790	1.024	0.234
58.4	61	14925000	24 h	0.800	1.391	0.591
57	57.8	14350000	24 h	0.780	1.255	0.475
48.6	49.2	12225000	24 h	0.790	0.930	0.140
55	62.6	14700000	24 h	0.770	0.985	0.215
56.4	60.2	14575000	24 h	0.800	1.352	0.552
56.8	60.2	14625000	24 h	0.790	1.371	0.581
57.2	58.8	14500000	24 h	0.790	1.014	0.224
54.2	60.6	14350000	24 h	0.790	1.036	0.246

### 8.3.3 APÊNCICE C - TABELAS EXCEL® COM RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS - Cultivos pareados

Rep	<i>C. glesporioides</i>			<i>C. truncatum</i>			<i>S. sclerotiorum</i>			<i>M. phaseolina</i>		
	Fcombatido	Fcontrole	Inibicao	Fcombatido	Fcontrole	Inibicao	Fcombatido	Fcontrole	Inibicao	Fcombatido	Fcontrole	Inibicao
BV1	4.00	3.00	55.56	5.2	3.8	42.2222	7.5	1.5	16.6667	8.1	0.9	10
BV2	5.00	2.30	44.44	5	3.5	44.4444	5.5	2	38.8889	5.5	3.5	38.8889
BV3	7.20	1.40	20.00	6	3	33.3333	6.5	2.5	27.7778	4.8	4.2	46.6667
MT1	8.00	0.00	11.11	4	4.8	55.5556	4	1.5	55.5556	0.5	8.5	94.4444
MT2	8.10	0.00	10.00	5.5	3	38.8889	4	2	55.5556	1	8	88.8889
MT3	8.10	0.00	10.00	4.5	4.2	50	5	1.5	44.4444	0.8	8.2	91.1111
TC1	5.60	2.60	37.78	2.8	6	68.8889	5.5	3	38.8889	5.3	3.7	41.1111
TC2	6.00	2.50	33.33	6	3	33.3333	4	4	55.5556	8.2	0.3	8.88889
TC3	7.00	2.50	22.22	7	2	22.2222	4	5	55.5556	8.6	0.1	4.44444
BVMT1	0.00	8.50	100.00	6	2.2	33.3333	0.2	1.2	97.7778	6.5	2.5	27.7778
BVMT2	7.50	1.30	16.67	5	2.8	44.4444	3	0.8	66.6667	2	7	77.7778
BVMT3	6.00	1.70	33.33	5	1.8	44.4444	4	3.5	55.5556	8	1	11.1111
BVTC1	6.00	2.10	33.33	7	1.5	22.2222	6.5	2.5	27.7778	7	2	22.2222
BVTC2	6.00	3.50	33.33	7	1.8	22.2222	3	0.8	66.6667	6	3	33.3333
BVTC3	7.00	2.30	22.22	4.5	3	50	2.1	0.7	76.6667	5	4	44.4444
MTTC1	7.50	2.00	16.67	6	2.2	33.3333	5	0.9	44.4444	6.9	2.1	23.3333
MTTC2	6.75	2.50	25.00	5	4	44.4444	6	0.5	33.3333	5.5	3.5	38.8889
MTTC3	6.00	3.00	33.33	5	4	44.4444	4.5	0.8	50	6	3	33.3333
BVMTTC1	6.50	2.90	27.78	4.5	4	50	4.5	4.5	50	8.7	0.2	3.33333
BVMTTC2	6.00	2.80	33.33	5.4	3	40	7	2	22.2222	7	2	22.2222
BVMTTC3	5.50	3.30	38.89	6.5	2	27.7778	6	0.8	33.3333	8	1	11.1111