

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**INDUÇÃO BIOLÓGICA DE RESISTÊNCIA E CONTROLE  
DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Barry NA CULTURA  
DA SOJA**

ANDERSON DOS SANTOS DIAS

DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL  
2024

**INDUÇÃO BIOLÓGICA DE RESISTÊNCIA E CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) NA CULTURA DA SOJA**

Anderson dos Santos Dias  
Engenheiro agrônomo

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. SILVANA DE PAULA QUINTÃO SCALON

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Dourados  
Mato Grosso do Sul  
2024

**INDUÇÃO BIOLÓGICA DE RESISTÊNCIA E CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) NA CULTURA DA SOJA.**

por

Anderson dos Santos Dias

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
**MESTRE EM AGRONOMIA**

Aprovado em: 24 de fevereiro de 2025

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** SILVANA DE PAULA QUINTAO SCALON  
Data: 07/04/2025 08:59:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dra. Silvana de Paula Q. Scalon  
Orientadora - UFGD/FCA

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** FELIPE ANDRE SGANZERLA GRAICHEN  
Data: 04/04/2025 13:32:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Felipe André Sganzerla Grai-  
chen  
UEMS

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI  
Data: 27/03/2025 16:22:51-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dra. Lilian Maria A. Bacchi  
Coorientadora - UFGD/FCA

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** PAULO HENRIQUE NASCIMENTO DE SOUZA  
Data: 03/04/2025 22:11:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Paulo Henrique Nascimento de  
Souza  
Fundação - MT

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

D541i Dias, Anderson Dos Santos

INDUÇÃO BIOLÓGICA DE RESISTÊNCIA E CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*  
(Lib.) de Barry NA CULTURA DA SOJA [recurso eletrônico] / Anderson Dos Santos Dias. --  
2025.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Silvana de Paula Quintão Scalon.

Coorientadora: Lilian Maria Arruda Bacchi.

Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2025.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. biocontrole. 2. miceliogênese. 3. germinação carpogênica. 4. indução de resistência. 5.  
componente antioxidante. I. Scalon, Silvana De Paula Quintão. II. Bacchi, Lilian Maria Arruda. III.  
Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

*A Deus, aos meus pais, Aparecido Dias e Roseli Ramos dos Santos Dias e ao meu irmão, Matheus dos Santos Dias.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aparecido Dias e Roseli Ramos dos Santos Dias, e ao meu irmão, Matheus dos Santos Dias, minha eterna gratidão pelo incentivo incansável e pelo apoio constante ao longo de toda a minha trajetória acadêmica, sempre me orientando a seguir com honra, dedicação e gratidão.

Minha sincera gratidão às minhas orientadoras, Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lilian Maria A. Bacchi e Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Silvana de Paula Quintão Scalon, pela orientação dedicada e por todo o apoio oferecido ao longo dessa jornada, sempre demonstrando um imenso carisma e uma excelência inquestionável no profissionalismo.

Minha profunda gratidão ao Professor Dr. Cleberton Correia dos Santos, por sua coorientação incansável, pelo apoio constante ao longo desta jornada e, sobretudo, pela amizade genuína e preciosa que se revelou a cada passo desse caminho.

Aos amigos e integrantes do GEEP, Grupo de Estudos em Ecofisiologia de Plantas da UFGD, minha gratidão pela parceria essencial na condução dos experimentos e por todos os momentos de alegria, descontração e amizade que tornaram esta jornada ainda mais especial.

Aos meus queridos amigos Juliana Silvério Milene, Jessica Aline Linné, Rodrigo Bernardes e Thaise Dantas, minha imensa gratidão pela parceria de cada momento, pela amizade verdadeira e pelos momentos de descontração que tornaram essa jornada ainda mais leve e especial.

À Universidade Federal da Grande Dourados e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelo suporte prestado durante esse período.

À CAPES, pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos.

À banca examinadora pelas valiosas contribuições.

“Toda glória vai ser dada à Deus mas não posso esquecer daqueles que me estenderam a mão”.

## SUMÁRIO

INDUÇÃO BIOLÓGICA DE RESISTÊNCIA E CONTROLE DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) NA CULTURA DA SOJA.....	ix
RESUMO GERAL .....	ix
BIOLOGICAL INDUCTION OF RESISTANCE AND CONTROL OF <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (LIB.) IN SOYBEAN CROP .....	xi
GENERAL ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19
CAPITULO I: ANTAGONISMO DE <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> E FORMULAÇÕES COMERCIAIS NO CONTROLE <i>in vitro</i> DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (LIB.) DE BARY .....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2. 1. LOCAL DE CONDUÇÃO EXPERIMENTAL .....	26
2. 2. TRATAMENTOS UTILIZADOS .....	26
2. 3. PRÉ-SELEÇÃO DOS ISOLADOS FITOPATOGÊNICOS .....	26
2. 4. MULTIPLICAÇÃO DOS ISOLADOS SELECIONADOS.....	27
2. 5. ISOLAMENTO DE <i>Bacillus subtilis</i> E <i>Trichoderma harzianum</i> DE PRODUTOS COMERCIAIS .....	27
2. 6. ENSAIO I: EFEITO DE METABOLITOS VOLÁTEIS NO CONTROLE <i>in vitro</i> DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	28
2. 7. ENSAIO II: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTAGÔNICA NO CONTROLE <i>in vitro</i> DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> EM CULTURAS PAREADAS .....	30
2. 8. ANÁLISE VISUAL DA ESTRUTURA MORFOLOGICA DO MICÉLIO.....	31
2. 9. ENSAIO III: POTENCIAL ANTAGÔNICO DE PRODUTOS COMERCIAIS OU MICRORGANISMOS ISOLADOS NA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA E SOBREVIVÊNCIA DE ESCLERÓDIOS DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	31
2. 10. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
3. RESULTADOS .....	32
3. 1. ENSAIO I: EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS NO CONTROLE <i>in vitro</i> DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	32
3. 1. 1. ISOLADO DC18 .....	33
3. 1. 2. ISOLADO PS16 .....	37

3. 2. ENSAIO II: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTAGÔNICA NO CONTROLE <i>in vitro</i> DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> EM CULTURAS PAREADAS. ....	40
3. 2. 1. ISOLADO DC18 .....	40
3. 2. 2. ISOLADO PS16 .....	44
3. 3. ENSAIO III: POTENCIAL ANTAGÔNICO DE PRODUTOS COMERCIAIS OU MICRORGANISMOS ISOLADOS NA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA E SOBREVIVÊNCIA DE ESCLERÓDIOS DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . ....	48
4. DISCUSSÃO .....	50
5. CONCLUSÃO .....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
CAPITULO 2: BIOCONTROLE COM FORMULAÇÕES E ISOLADOS DE <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> INFLUENCIAM NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO E DE DEFESA CONTRA <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	58
RESUMO.....	58
CHAPTER 2: BIOCONTROL WITH FORMULATIONS AND ISOLATES OF <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Trichoderma harzianum</i> INFLUENCE PHOTOSYNTHETIC METABOLISM AND DEFENSE AGAINST <i>S. sclerotiorum</i> .....	59
ABSTRACT.....	59
1. INTRODUÇÃO .....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	62
2. 1. LOCAL DE CONDUÇÃO EXPERIMENTAL .....	62
2. 2. CULTIVARES, PREPARO DOS VASOS E SEMEADURA .....	63
2. 3. SELEÇÃO DO ISOLADO FITOPATOGÊNICO E OBTENÇÃO DA CULTURA PURA.....	64
2. 4. AJUSTE DE SUSPENSÕES E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	64
2. 5. INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO.....	65
2. 6. VARIÁVEIS AVALIADAS.....	66
2. 6. 1. PATOMETRIA.....	66
2. 6. 2. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS .....	67
2. 6. 3. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	68
2. 7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	68
3. RESULTADOS .....	68
3. 1. POTENCIAL DE BIOCONTROLE DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS E ISOLADOS MICROBIOLÓGICOS CONTRA <i>S. sclerotiorum</i> EM DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA.....	68
3. 2. EFEITOS DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS E ISOLADOS MICROBIOLÓGICOS NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DE DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA APÓS INOCULAÇÃO COM <i>S. sclerotiorum</i> . ....	71

3. 3. EFEITOS DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS E ISOLADOS MICROBIOLÓGICOS NOS COMPONENTES ANTIOXIDANTES E PROTEICO DE DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA APÓS INOCULAÇÃO COM <i>S. sclerotiorum</i> . .....	76
4. DISCUSSÃO .....	80
5. CONCLUSÃO .....	86
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	95
5. ANEXOS .....	96

## INDUÇÃO BIOLÓGICA DE RESISTÊNCIA E CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) NA CULTURA DA SOJA

### RESUMO GERAL

O mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) é uma das principais doenças da soja, sendo favorecida por condições de alta umidade e temperaturas moderadas, o que pode resultar em severas reduções de produtividade. O patógeno sobrevive no solo por longos períodos na forma de escleródios, tornando seu controle desafiador. Nesse sentido, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* têm se mostrado como uma alternativa promissora ao controle químico, sendo uma abordagem mais sustentável e menos agressiva ao meio ambiente. Contudo, grande parte das informações a respeito da atividade antagônica desses agentes disponíveis na literatura diz a respeito à utilização de culturas puras no biocontrole, o que pode justificar diferentes respostas antagônicas em razão da utilização de formulados comerciais por apresentarem metabólitos prontamente disponíveis. Dado esse contexto, objetivou-se avaliar as características antagônicas de isolados de *T. harzianum* e *B. subtilis* contra *S. sclerotiorum*, comparando sua eficácia com formulações comerciais *in vitro*. Além disso, buscou-se investigar as diferenças na eficácia entre produtos microbiológicos e culturas puras de antagonistas no metabolismo fotossintético e na indução de resistência ao mofo branco em soja *in vivo*. No primeiro capítulo, foram conduzidos três ensaios *in vitro* para avaliar o efeito antagônico de cinco tratamentos (testemunha, *B. subtilis*, *T. harzianum*, Raiz Performance® e BioGreen®). O primeiro ensaio analisou a eficácia de compostos voláteis no crescimento micelial e na esclerogênese ao longo do tempo em dois isolados de *S. sclerotiorum* (DC18 e PS16). No segundo, avaliou-se a ação do confronto direto nos mesmos parâmetros para ambos isolados fitopatogênicos. O terceiro ensaio abordou o antagonismo na germinação carpopêgica e na sobrevivência de escleródios do isolado DC18 de *S. sclerotiorum*. Os isolados do fitopatógeno demonstraram diferentes sensibilidades aos tratamentos nos intervalos avaliados, com isso, DC18 mostrou menor sensibilidade a *T. harzianum* no confronto direto, com significância a partir de 60 horas após a incubação, enquanto que produtos comerciais exibiram maior efeito antagônico no ensaio de compostos voláteis havendo inibição acima de 58% para ambos os isolados do patógeno. Em ambos ensaios, BioGreen® e *T. harzianum* reduziram o número e a massa de escleródios tanto para o isolado DC 18 quanto para PS16. Por outro lado, produtos comerciais estimularam a germinação carpopêgica com médias germinativas superiores a 33% e diferenciação de estipes em apotécios superior a 24,38% indicando alterações na fisiologia do patógeno mediante a condição do biocontrole *in vitro*. No segundo capítulo, foi conduzido um ensaio *in vivo* utilizando duas cultivares de soja (MSOY 6410 e DM64i63). Os sete tratamentos avaliados no experimento foram compostos por quatro agentes biológicos (*Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, Raiz Performance® e BioGreen®), um indutor químico (Acibenzolar-S-Metílico – Bion®) e duas testemunhas, sendo uma inoculada com o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e outra não inoculada. Decorridos 7 dias após a aplicação, procedeu-se a inoculação com o patógeno pelo método do pecíolo, com avaliações das trocas gasosas e a eficiência quântica potencial fotoquímica aos 3 e 5 dias após a inoculação (DAI), enquanto que aos 7 DAI avaliou-se o índice de clorofila, índices de patometria e atividade de enzimas antioxidantes. Plantas sob tratamento biológico reduziram o tamanho da lesão embora na área abaixo da curva tenham apresentando

desempenho inferior ao indutor químico. A aplicação do indutor químico promoveu o aumento na taxa fotossintética aos 3 DAI, contudo, o efeito não se manteve aos 7 DAI, sendo que o tratamento com *B. subtilis* e BioGreen® promoveram ajustes metabólicos nos componentes associados ao aparato fotossintético. Em termos de proteína total, plantas tratadas com Raiz Performance® apresentaram resultados semelhantes à testemunha não inoculada. O metabolismo antioxidante foi influenciado sistemicamente pela aplicação de produtos biológicos, com redução na atividade da superóxido dismutase, havendo diferentes respostas das cultivares na atividade da peroxidase. Os resultados destes estudos validaram parcialmente a hipótese visto que, produtos microbiológicos (Raiz Performance® e BioGreen®) destacaram-se na redução do crescimento micelial *in vitro*, embora o desempenho varie entre os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*. Em relação à indução de resistência, não houve diferenças claras entre isolados e formulados na redução de lesões e área abaixo da curva, mas o metabolismo fotossintético foi favorecido por *B. subtilis* e BioGreen®. Além disso, os produtos e isolados microbiológicos modularam o metabolismo antioxidante de forma sistêmica, restringindo o progresso da doença e fortalecendo a resistência da soja ao mofo branco.

**Palavras-chave:** biocontrole, miceliogênese, germinação carpogênica, indução de resistência, componente antioxidante.

## BIOLOGICAL INDUCTION OF RESISTANCE AND CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) IN SOYBEAN CROP

### GENERAL ABSTRACT

White mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) is one of the main diseases of soybean, favored by conditions of high humidity and moderate temperatures, which can result in severe reductions in productivity. The pathogen survives in the soil for long periods in the form of sclerotia, making its control challenging. In this sense, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* have shown themselves to be promising alternatives to chemical control, being a more sustainable and less aggressive approach to the environment. However, much of the information about the antagonistic activity of these agents available in the literature concerns the use of pure cultures in biocontrol, which may justify different antagonistic responses due to the use of commercial formulations because they present readily available metabolites. Given this context, the objective of this study was to evaluate the antagonistic characteristics of *T. harzianum* and *B. subtilis* isolates against *S. sclerotiorum*, comparing their efficacy with commercial formulations in vitro. Furthermore, we sought to investigate the differences in efficacy between microbiological products and pure cultures of antagonists on photosynthetic metabolism and induction of resistance to white mold in soybean in vivo. In the first chapter, three in vitro assays were conducted to evaluate the antagonistic effect of five treatments (control, *B. subtilis*, *T. harzianum*, Raiz Performance<sup>®</sup> and BioGreen<sup>®</sup>). The first assay analyzed the efficacy of volatile compounds on mycelial growth and sclerogenesis over time in two isolates of *S. sclerotiorum* (DC18 and PS16). In the second, the action of direct confrontation was evaluated on the same parameters for both phytopathogenic isolates. The third assay addressed the antagonism in carpogenic germination and sclerotia survival of the DC18 isolate of *S. sclerotiorum*. The phytopathogen isolates demonstrated different sensitivities to treatments at the evaluated intervals. Thus, DC18 showed lower sensitivity to *T. harzianum* in direct confrontation, with significance starting 60 hours after incubation, while commercial products exhibited greater antagonistic effect in the volatile compounds assay, with inhibition above 58% for both pathogen isolates. In both assays, BioGreen<sup>®</sup> and *T. harzianum* reduced the number and mass of sclerotia for both isolates DC 18 and PS16. On the other hand, commercial products stimulated carpogenic germination with germination averages above 33% and differentiation of stipes into apothecia above 24.38%, indicating changes in the physiology of the pathogen under the in vitro biocontrol condition. In the second chapter, an in vivo assay was conducted using two soybean cultivars (MSOY 6410 and DM64i63). The seven treatments evaluated in the experiment consisted of four biological agents (*Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, Raiz Performance<sup>®</sup> and BioGreen<sup>®</sup>), one chemical inducer (Acibenzolar-S-Methyl – Bion<sup>®</sup>) and two controls, one inoculated with the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* and the other non-inoculated. Seven days after application, inoculation with the pathogen was performed using the petiole method, with evaluations of gas exchange and photochemical potential quantum efficiency at 3 and 5 days after inoculation (DAI), while at 7 DAI the chlorophyll index, pathometry indices and antioxidant enzyme activity were evaluated. Plants under biological treatment reduced lesion size although in the area

below the curve they presented inferior performance to the chemical inducer. The application of the chemical inducer promoted an increase in the photosynthetic rate at 3 DAI; however, the effect was not maintained at 7 DAI, and the treatment with *B. subtilis* and BioGreen<sup>®</sup> promoted metabolic adjustments in the components associated with the photosynthetic apparatus. In terms of total protein, plants treated with Raiz Performance<sup>®</sup> presented results similar to the non-inoculated control. The antioxidant metabolism was systemically influenced by the application of biological products, with a reduction in the activity of superoxide dismutase, with different responses of the cultivars in the activity of peroxidase. The results of these studies partially validated the hypothesis since microbiological products (Raiz Performance<sup>®</sup> and BioGreen<sup>®</sup>) stood out in the reduction of mycelial growth in vitro, although the performance varied among the isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Regarding resistance induction, there were no clear differences between isolates and formulas in lesion reduction and area under the curve, but photosynthetic metabolism was favored by *B. subtilis* and BioGreen<sup>®</sup>. In addition, the microbiological isolates and products modulated antioxidant metabolism in a systemic manner, restricting disease progression and strengthening soybean resistance to white mold.

**Keywords:** biocontrol, myceliogenesis, carpogenic germination, resistance induction, antioxidant component.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional e a necessidade de aumentar a produção de alimentos de forma sustentável têm imposto desafios cada vez maiores à agricultura. Esse cenário exige maior eficiência na produção agrícola, ao mesmo tempo que intensifica a necessidade de estratégias fitossanitárias eficazes para mitigar perdas causadas por doenças.

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merril) representa grande importância para a economia global, colocando o Brasil como um dos maiores produtores e exportadores mundiais (USDA, 2024). A expansão das áreas cultivadas, aliada a mudanças climáticas, como variações na temperatura, aumento da umidade e alterações no regime de chuvas, tem tornado as lavouras de soja mais suscetíveis a fitopatógenos. Essas condições podem favorecer o desenvolvimento e a disseminação de doenças, resultando em perdas expressivas na produtividade (MWANGI et al., 2023; SINGH et al., 2023; GAI E WANG, 2024)

A Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO, 2023) estimou que as doenças de plantas custam à economia global cerca de US\$ 220 bilhões por ano, com até 40% da produção agrícola perdida devido a depreciação ocasionada por fitopatógenos.

Dentre os fitopatógenos de maior impacto na agricultura, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary destaca-se pela sua ampla distribuição global e elevado potencial destrutivo. Sua capacidade de persistência no solo e a ineficácia de muitos métodos convencionais de controle têm motivado pesquisas para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de manejo (SILVA et al., 2021; JAHAN et al., 2022; FERREIRA, 2024). A doença causada por esse patógeno fúngico é conhecida por diversos nomes, contudo, o termo mofo branco é mais frequentemente usado para se referir à doença causada por *S. sclerotiorum* (HOSSAIN et al., 2023).

O fungo pertence à família Sclerotiniaceae e é caracterizado pela formação de um micélio algodinoso esbranquiçado. No final de seu ciclo de vida, produz estruturas melanizadas chamadas escleródios, que atuam como estruturas de sobrevivência no solo (ZHU et al., 2024a; DUO et al., 2025). Se tratando da natureza germinativa, os escleródios apresentam uma capacidade bimodal, podendo germinar carpogenicamente ou miceliogenicamente, sendo ambas as formas consideradas altamente infectivas (SHANG et al., 2024; ZAMANI-NOOR et al., 2024).

A patogenicidade de *S. sclerotiorum* está diretamente associada à secreção de ácido oxálico, que acidifica os tecidos da planta, comprometendo sua integridade estrutural e fisiológica. Esse mecanismo facilita a infecção ao inibir respostas de defesa e promover a morte celular do hospedeiro (CHAUDHARY et al., 2024; DANIEL et al., 2024).

O mofo branco pode causar perdas de produtividade de até 70% o que torna essencial o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo da doença. A dificuldade no controle deve-se à necessidade de aplicação localizada de fungicidas, à germinação carpopêgica que induz a variabilidade genética e dissemina o patógeno para longas distâncias e à capacidade do patógeno de formar escleródios, estruturas de resistência que garantem sua sobrevivência no solo por longos períodos (ALBERT et al., 2022; ANTWI-BOASIAKO et al., 2022).

Dado esse contexto, diversos autores atestaram o impacto econômico do mofo branco em lavouras de soja e de outras culturas no Brasil e no mundo, onde a infecção pode levar a perdas de até 70% na produtividade, enfatizando a necessidade de estratégias de manejo da doença (ALBERT et al., 2022; ANTWI-BOASIAKO et al., 2022).

Em virtude da baixa eficiência de controle mediante o uso de fungicidas químicos, a ampla gama de hospedeiros e a falta de resistência efetiva, fazem com que novas técnicas de manejo e gerenciamento da doença sejam aplicadas. Nesse contexto, o biocontrole é definido como a inibição direta ou indireta de uma doença, ou do agente patogênico, por outro organismo, sendo esse último considerado um agente de controle biológico (BCA) (BAKER e COOK, 1973). Definições mais amplas acrescentam a ideia da inibição por metabolitos especializados com atividade sinalizadora, antibiótica ou atrativa que remetem ao controle biológico (ROBERTS e TAYLOR, 2016).

Se tratando de agentes químicos capazes de induzir sinais de defesa nas plantas, o acibenzolar-S-metil (ASM) representa uma das moléculas mais comumente estudadas em ensaios de resistência de plantas a doenças (PICANÇO et al., 2022; HENIPMAN, et al., 2024). Por agir como um análogo ao ácido salicílico, o ASM gera um sinal sistêmico na tradução de genes que conferem aumento na produção de proteínas PR, enzimas antioxidantes, fitoalexina e ligninas, ativando assim, múltiplas vias de resistência na planta (DANNER et al., 2008; RESENDE et al., 2002).

Essa abordagem é considerada uma alternativa ecologicamente correta e complementar às práticas de manejo atuais, que são fortemente dependentes de aplicações químicas (ZHU et al., 2024b). Embora os métodos químicos proporcionem proteção

imediate às plantas, muitas vezes o uso indiscriminado e a capacidade de sobrevivência do patógeno acaba por conduzir à seleção de indivíduos resistentes em uma população de patógenos e a toxicidade em organismos vivos não alvos (BAKER et al., 2020; YIN et al., 2023). Assim, diversos estudos estão sendo realizados sobre o uso de microrganismos como agentes de controle biológico.

O biocontrole de fitopatógenos ocorre por meio de múltiplos mecanismos, incluindo competição por nutrientes e espaço, produção de metabólitos antimicrobianos e indução de resistência na planta. Esses processos variam entre os diferentes agentes de biocontrole, mas desempenham um papel essencial na inibição de fitopatógenos (AWAL et al., 2024; HAQ et al., 2024)

Alguns microrganismos são amplamente utilizados no biocontrole de doenças de plantas devido ao antagonismo, resistência ambiental e facilidade de formulação, qualidades essenciais para o manejo sustentável de patógenos agrícolas. Entre eles, destacam-se a bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* e o fungo filamentosso *Trichoderma harzianum*, que apresentam alta adaptação a estresses ambientais, como seca, radiação e baixa disponibilidade de nutrientes. Essas características favorecem sua aplicação no controle biológico, seja pela introdução direta dos microrganismos na planta ou solo, seja pela ação dos metabólitos que produzem, os quais contribuem para o condicionamento das plantas contra infecções patogênicas (AYAZ et al., 2024; ABDELRHIM et al., 2024).

Em termos de agentes de biocontrole, a espécie bacteriana mais bem estudada é *Bacillus subtilis*. Devido às suas características, como a capacidade de promover a resistência sistêmica e de produzir lipopeptídeos e enzimas hidrolíticas, essa bactéria foi introduzida no mercado como um agente de controle de fitopatógenos, estando presente em diversas formulações comerciais (MAPA, 2024).

Evidências acumuladas confirmaram que as espécies de *Bacillus* podem produzir uma ampla gama de substâncias antagônicas com considerável diversidade estrutural, sendo muitas substâncias de natureza antibacteriana e antifúngica, como fengicina, surfactina e iturina sendo capazes de inibir a atividade de diversos fitopatógenos em plantas. Recentemente, Liu et al. (2023) relataram que metabólitos produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* inibiram o crescimento micelial de *Fusarium incarnatum*, bem como ocasionaram alterações morfológicas nas hifas do patógeno.

Por outro lado, as espécies de *Trichoderma* têm sido amplamente estudadas como agente de biocontrole visto a expressão de diversos mecanismos como a produção de metabólitos difusíveis e voláteis com atividade antagônica, podendo até mesmo,

induzir a resistência e a promoção de crescimento em plantas (YAO et al., 2023). Assim, esse fungo antagonista é capaz de colonizar os espaços intercelulares das plantas sendo eficaz contra uma variedade de patógenos que infectam folhas e raízes (MATIAS et al., 2024)

Alguns autores demonstraram que isolados do gênero *Trichoderma* liberam proteases e outras enzimas líticas que degradam a parede celular de diversos patógenos, gerando deformações na rede hifal ou até mesmo, sendo capazes de inviabilizar os escleródios de *S. sclerotiorum* por ação do micoparasitismo (MUKHERJEE et al., 2022; TOMAH et al., 2024).

A partir dessas alterações no hospedeiro, a resposta do hospedeiro na ISR pode ocorrer de maneira não específica, incluindo a ativação de genes que regulam as defesas da planta, reações de hipersensibilidade, acúmulo de proteínas associadas à patogênese, produção de compostos fenólicos, síntese de fitoalexinas, sinalização hormonal e ação de componentes antioxidantes, sendo este último pouco explorado (HONING et al., 2023; LIANG et al., 2023; KUMAR et al., 2024;). Tal observação foi relatada por Abbas et al. (2022) onde *T. atroviride* foi capaz ativar genes específicos responsáveis pela síntese de enzimas lipoxigenases em plantas, que desempenham um papel fundamental nos mecanismos de defesa contra *Rhizoctonia solani*.

Além disso, a utilização de *Bacillus subtilis* ou *Trichoderma harzianum* podem auxiliar na mitigação dos efeitos do estresse biótico causado por patógenos, contribuindo para a manutenção e o incremento da fotossíntese (SANTOYO et al., 2024) Esses microrganismos auxiliam o metabolismo vegetal mediante a produção de metabólitos bioativos e fitormônios que induzem resistência sistêmica e melhoram a capacidade antioxidante da planta (CHATURVEDI et al., 2022). Além disso, a colonização pelas rizobactérias e fungos benéficos pode melhorar a absorção de nutrientes, especialmente nitrogênio e magnésio, elementos essenciais para a síntese de clorofila e para o funcionamento dos fotossistemas. Dessa forma, *B. subtilis* e *T. harzianum* não apenas suprimem o crescimento do patógeno, mas também promovem a recuperação e a eficiência fisiológica da planta, garantindo melhor desempenho fotossintético e maior resiliência às condições adversas impostas pela infecção.

Durante a infecção por *Sclerotinia sclerotiorum*, há um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio. Essas moléculas, em condições controladas, podem sinalizar e ativar respostas de defesa na planta (ALI et al., 2023). No entanto, sob ataque de hemibiotróficos, essa produção é manipulada para prejudicar as células do

hospedeiro e superar as barreiras defensivas naturais. Portanto, a estratégia ideal envolve a supressão e a eliminação dessas espécies reativas dos tecidos do hospedeiro, visando conter a extensão da infecção.

No entanto, grande parte dos trabalhos encontrados na literatura atesta a eficácia de culturas puras de antagonistas, as quais foram empregadas diretamente no biocontrole para supressão da atividade de fitopatógenos. Assim, pouco se sabe sobre as influências das formulações comerciais no potencial de biocontrole visto que, muitas vezes, esses produtos são enriquecidos com diversos compostos orgânicos e transportadores inorgânicos (como diluentes, adjuvantes e/ou surfactantes), tanto em estado sólido quanto em caldo nutritivo (MARTINEZ et al., 2023).

Com isso, alguns autores afirmam ainda que, algumas formulações comerciais poderiam apresentar uma maior quantidade de metabolitos microbianos, o que poderia resultar em um potencial de biocontrole distinto quando comparado às ações diretas e isoladas dos microrganismos (NIRANJA et al., 2009; PELLAN et al., 2020; JANJIR et al., 2021; TSOLAKIDOU et al., 2024).

Isolados distintos de *Sclerotinia sclerotiorum* podem apresentar variações significativas em sua resposta a agentes de biocontrole. Essas diferenças são resultado da diversidade genética entre isolados de diferentes regiões, influenciando características como virulência, produção de enzimas degradadoras, formação de escleródios e suscetibilidade a metabolitos bioativos de microrganismos antagonistas. Essa variabilidade representa um desafio no desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo, uma vez que determinados isolados podem ser mais resistentes a certos agentes biológicos (RATHER et al., 2022; AZEEM et al., 2022; MARAL-GÜL e ELTEM, 2024).

Fatores como a composição da parede celular do patógeno, seu metabolismo secundário e sua capacidade de competição por nutrientes no ambiente podem influenciar diretamente a eficácia dos agentes biológicos de controle. Dessa forma, para que programas de biocontrole sejam bem-sucedidos, é essencial não apenas selecionar antagonistas eficazes, mas também compreender as características específicas dos isolados de *S. sclerotiorum*. Esse conhecimento reforça a importância de pesquisas regionais para otimizar as estratégias de manejo e garantir sua aplicabilidade em diferentes condições ambientais.

Dado esse contexto, este trabalho visa avaliar as características antagônicas de isolados de *T. harzianum* e *B. subtilis* contra *S. sclerotiorum*, comparando sua eficácia com formulações comerciais. Além disso, buscou-se investigar as diferenças na eficácia

entre produtos microbiológicos e culturas puras de antagonistas no metabolismo fotossintético e na indução de resistência ao mofo branco em soja.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; MUBEEN, M.; ZHENG, H.; SOHAIL, M. A.; SHAKEEL, Q.; SOLANKI, M. K.; IFTIKHAR, Y.; SHARMA, S.; KASHYAP, B. K.; HUSSAIN, S.; ROMANO, M. C. Z.; MOYA-ELIZONDO, E.; ZHOU, L. *Trichoderma* spp. Genes Involved in the Biocontrol Activity Against *Rhizoctonia solani*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, e884469, 2022.
- ABDELRHIM, A. S.; HEMEDA, N. F.; MWAHEB, M. A.; OMAR, M. O. A.; DAWOOD, M. F. A. The role of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma harzianum* in mitigating the combined stresses motivated by *Sclerotinia sclerotiorum* and salinity in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Plant Stress**, v. 11, e100370, 2024
- ALBERT, D.; DUMONCEAUX, T.; CARISSE, O.; BEAULIEU, C.; FILION, M. Combining desirable traits for a good biocontrol strategy Against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microorganisms**, v. 10, e1189, 2022.
- ALI, S.; TYAGI, A.; BAE, H. ROS interplay between plant growth and stress biology: Challenges and future perspectives. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 203, e108032, 2023.
- ANTWI-BOASIAKO, A.; WANG, Y.; DAPAAH, H.K.; ZHAO, T. Mitigating against *Sclerotinia* Diseases in Legume Crops: A Comprehensive Review. **Agronomy**, v. 12, e3140, 2022.
- AWAL, M. A.; ABDULLAH, N. S.; PRISMANTORO, D.; DWISANDI, R. F.; SAFITRI, R.; MOHD-YUSUF, Y.; SUHAUMI, N. S. M.; DONI, F. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against *Fusarium* in horticultural crops. **Soil & Crop Science**, v. 10, n. 1, e2394685, 2024.
- AYAZ, M.; ALI, Q.; ZHAO, W.; CHI, Y. K.; ALI, F.; RASHID, K. A.; CAO, S.; HE, Y. Q.; BUKERO, A. A.; HUANG, W. K.; QI, R. D. Exploring plant growth promoting traits and biocontrol potential of new isolated *Bacillus subtilis* BS-2301 strain in suppressing *Sclerotinia sclerotiorum* through various mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, e1444328, 2024
- AZEEM, S.; AGHA, S. I.; JAMIL, N.; TABASSUM, B.; AHMED, S.; RAHEEM, A.; JAHAN, N.; ALI, N.; KHAN, A. Characterization and survival of broad-spectrum biocontrol agents against phytopathogenic fungi. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 54, n. 3, p. 233-242, 2022.
- BAKER, K.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1974, 433 p.
- BAKER, B. P., GREEN, T. A., LOKER, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, vol. 140, e104095, 2020.
- CHATURVEDI, H.; SINGH, B.; JAJOO, A.; PRAKASH, A. Shielding of Photosynthetic Apparatus by Consortia of Bacterial Endophytes in Tomato Plants Suffering From *Fusarium* Wilt. **Frontiers in Agronomy**. v. 4, e831731, 2022

CHAUDHARY, S.; LAL, M.; SAGAR, S.; SHARMA, S.; MEENA, A. L.; KUMAR, M. Variation in oxalic acid production, mycelial compatibility and pathogenicity amongst isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* causing white mold disease. **Vegetos**, v. 37, p. 1294-1306, 2024.

DANIEL, A. I.; BASSON, G.; KEYSTER, M.; KLEIN, A.; GOKUL, A. Molecular mechanism of oxalic acid synthesis as virulence factor of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 134, e102412, 2024.

DUO, H.; YIN, M.; WANG, R. Molecular mechanisms of resistance and future perspectives in plant breeding strategies against *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Crops**, v. 2, e100046, 2025.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **New standards to curb the global spread of plant pests and diseases**. Disponível em: <http://www.fao.org/news/story/en/item/1187738/icode>. Acesso: 4 nov. 2024.

FERREIRA, T. C. *Sclerotinia sclerotiorum* research from Brazil (2000-2022). **Revista Semiárido de Visu**, v. 12, n. 2, p. 753-762, 2024.

GAI, Y.; WANG, H. Plant Disease: A Growing Threat to Global Food Security. **Agronomy**, v. 14, e1615, 2024

HAQ, I. U.; RAHIM, K.; YAHYA, G.; IJAZ, B.; MARYAM, S.; PAKER, N. P. Eco-smart biocontrol strategies utilizing potent microbes for sustainable management of phytopathogenic diseases. **Biotechnology Reports**, v. 4, e00895, 2024.

HENIPMAN, H. S.; PRIA, M. D.; RINALDI, P. E. C.; JACQUES, F. L.; REIS, L. Alternative products for controlling *Sclerotinia sclerotiorum* *in vivo* and *in vitro* in canola crops. **Bioscience Journal**, v. 40, e40013, 2024.

HONIG, M.; ROEBER, V. M.; SCMULLING, T.; CORTLEVEN, A. Chemical priming of plant defense responses to pathogen attacks. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, e1146577, 2023.

JAHAN, R.; SIDDIQUE, S. S.; JANNAT, R.; HOSSAIN, M. M. Cosmos white rot: First characterization, physiology, host range, disease resistance, and chemical control. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, p. 911–929, 2022.

JANJIR, M.; SHARMA, S.; SHARMA, S. Development of next-generation formulation against *Fusarium oxysporum* and unraveling bioactive antifungal metabolites of biocontrol agentes. **Scientific Reports**, v. 11, e22895, 2021.

KUMAR, S.; SHUKLA, V.; TRIPATHI, Y. N.; AAMIR, M.; DIVYANSHU, K.; YADAV, M.; UPADHYAY, R. S. Biochemical changes, antioxidative profile, and efficacy of the bio-stimulant in plant defense response against *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Heliyon**, v. 10, n. 1 e23030, 2024.

LIANG, X.; NIU, Q.; KONG, J.; ZHAO, X.; ZHANG, B.; LI, L.; JIAO, C.; GAI, Y. Role of Antioxidant Molecules in the Oxidative Stress Response Networks in the Tangerine Pathotype of *Alternaria alternata*. **Agronomy**, v. 13, e2735, 2023.

LIU, J.; QIN, D.; HUANG, W.; WANG, X.; LI, Y.; ZHANG. Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* Baf1 against *Fusarium incarnatum* causing fruit rot in postharvest muskmelon (cv. Yugu) fruit. **LWT**, v. 181, e114714, 2023.

MARAL-GÜL, D.; ELTEM, R. Evaluation of *Bacillus* isolates as a biological control agents against soilborne phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 20, e004901, 2024.

MARTINEZ, Y.; RIBERA, J.; SCWARZE, F. W. R.; DE FRANCE, K. Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, p. 5595-5612; 2023.

MATIAS, P.; COELHO, L.; REIS, M. Efficacy of slow sand filtration enriched with *Trichoderma atroviride* in the control of *Rhizoctonia solani* in soilless culture. **Crop Protection**, v. 186, e106917, 2024.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2024. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br>. Acesso em: 4 nov. 2024.

MUKHERJEE, P. K.; MENDONZA-MENZONDA, A.; ZEILINGER, S.; HORWITZ, B. A. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. **Fungal Biology Reviews**, v. 39, p. 15-33, 2022.

MWANGI, R. W.; MUSTAFA, M.; CHARLES, K.; WAGARA, I. W.; KAPPEL, N. Selected emerging and reemerging plant pathogens affecting the food basket: A threat to food security. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 14, e100827, 2023.

NIRANJA, S. R.; LALITHA, S.; HARIPRASAD, P. Mass multiplication and formulations of biocontrol agents for use against fusarium wilt of pigeonpea through seed treatment. **International Journal of Pest Management**, v. 55, n. 4, p. 317-324, 2009.

PICANÇO, B. B. M.; SILVA, B. N.; RODRIGUES, F. A. Potentiation of soybean resistance against *Phakopsora pachyrhizi* infection using phosphite combined with free amino acids, *Plant Pathology*, v. 71, n. 7, p. 1496-1510, 2022.

PELLAN, L.; DURAND, N.; MARTINEZ, V.; FONTANA, A.; SCHORR-GALINDO, S.; STRUB, C. Commercial Biocontrol Agents Reveal Contrasting Compartments Against Two Mycotoxigenic Fungi in Cereals: *Fusarium Graminearum* and *Fusarium Verticillioides*. **Toxins**, v. 12, e152, 2020.

SANTOYO G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL C.; AFRIDI, M. S.; MITRA, D.; VALENCIA-CANTERO, E.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. *Trichoderma* and *Bacillus* multifunctional allies for plant growth and health in saline soils: recent advances and future challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, e1423980, 2024.

SHANG, Q.; JIANG, D.; XIE, J.; CHENG, J.; XIAO, X. The schizotrophic lifestyle of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 25, n. 2, e13423, 2024.

SILVA, R. A.; FERRO, C. G.; LEHNER, M. DA S.; PAULA, T. J.; MIZUBUTI, E. S. G. The Population of *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil is Structured by Mycelial Compatibility Groups. **Plant Disease**, v. 105, p. 3376-3384, 2021.

SINGH, B. K.; DELGADO-BAQUERIZO, M.; EGIDI, E.; GUIRADO, E.; LEACH, J. E.; LIU, H.; TRIVEDI, P. Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, p. 640–656, 2023.

RATHER, R. A.; AHANGER, F. A.; AHANGER, S. A.; BASU, U.; WANI, M. A.; RASHID, Z.; SOFI, P. A.; SINGH, V.; JAVEED, K.; BAAZEEM, A. Morpho-Cultural and Pathogenic Variability of *Sclerotinia sclerotiorum* Causing White Mold of Common Beans in Temperate Climate. **Journal of Fungi**, v. 8, e755, 2022.

ROBERTS, M. R.; TAYLOR, J. E. Exploiting plant induced resistance as a route to sustainable crop production. In: Collinge, D.B. (Ed.) **Biotechnology for plant disease control**. Wiley Blackwell: New York and London, pp. 319–339, 2016.

TOMAH, A. A.; KHATTAK, A. A.; ALDARRAJI, M. H.; AL-MAID, A. A. H.; MOHANY, M.; AL-REJAIE, S. S.; OGUNYEMI, S. O. Sclerotia degradation by *Trichoderma*-mycoparasitic; an effective and sustainable trend in the drop lettuce disease control caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Archives of Microbiology**, v. 206, e286, 2024.

TSOLAKIDOU, M.-D.; DEMETRIOU, G.; PANAGIOTOU, S.; VASSILIOU, L.; GOULAS, V.; PANTELIDES, I. Efficacy of Commercial Biocontrol Products for the Management of *Verticillium* and *Fusarium* Wilt in Greenhouse Tomatoes: Impact on Disease Severity, Fruit Yield, and Quality. **Agriculture**, v. 14, e882, 2024.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Production, Supply and Distribution (PSD) on line**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em: 18 out. 2024

YAO, X.; GUO, H.; ZHANG, K.; ZHAO, M.; RUAN, J.; CHEN, J. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, e1160551, 2023.

YIN, Y.; MIAO, J.; SHAO, W.; LIU, X.; ZHAO, Y.; MA, Z. Fungicide Resistance: Progress in Understanding Mechanism, Monitoring, and Management. **Phytopathology**, vol. 113, n. 4, p. 707-718. 2023

ZAMANI-NOOR, N.; KLOCKE, B.; DOMINIC, A.R.; BRAND, S.; WÜSTHOFF, N.; PAPENBROCK, J. *In-Vivo* and *In-Vitro* Investigation of Germination Rate of Buried Sclerotia, and Variability in Carpogenic Germination Among *Sclerotinia sclerotiorum* Isolates. **Agriculture**, v. 14, e1939, 2024.

ZHU, Y.; WU, C.; DENG, Y.; YUAN, W.; ZHANG, T.; LU, J. Recent advances in virulence of a broad host range plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*: a mini-review. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, e1424130, 2024a.

ZHU, F.; CAO, M. -Y.; ZHANG, Q. -P.; MOHAN, R.; SCHAR, J.; MITCHELL, M.; CHEN, H.; LIU, F.; WANG, D.; FU, Z. Q. Join the green team: Inducers of plant immunity in the plant disease sustainable control toolbox. **Journal of Advanced Research**, v. 57, p. 15-42, 2024b.

**CAPITULO I: ANTAGONISMO DE *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* E  
FORMULAÇÕES COMERCIAIS NO CONTROLE *in vitro* DE *Sclerotinia  
sclerotiorum* (LIB.) DE BARY**

**RESUMO**

A utilização de microrganismos para o controle do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* tem aumentando nos últimos anos. Contudo, é possível que as formulações comerciais respondam de maneira distinta ao uso de culturas puras dos microrganismos de biocontrole, podendo levar expressão de diferentes mecanismos antagônicos. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar as características antagônicas de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* em isolados de *S. sclerotiorum* (DC18 e PS16) e comparar a eficácia dos isolados com as formulações comerciais disponíveis para o biocontrole. Com isso, três ensaios foram conduzidos *in vitro* para avaliar o efeito antagônico de cinco tratamentos (testemunha, *B. subtilis*, *T. harzianum*, Raiz Performance<sup>®</sup> e BioGreen<sup>®</sup>). O primeiro ensaio avaliou a eficácia de compostos voláteis no crescimento micelial e na esclerogênese em dois isolados de *S. sclerotiorum* (DC18 e PS16). No segundo, avaliou-se a ação de compostos difusíveis nos mesmos parâmetros e isolados. O terceiro ensaio abordou o antagonismo na germinação carpogênica e na sobrevivência de escleródios do isolado DC18 de *S. sclerotiorum*. Com relação as avaliações, no ensaio de compostos difusíveis e voláteis foram avaliados o diâmetro médio da colônia em intervalos de 12 horas após a incubação (HAI) prologando até o crescimento máximo obtido no tratamento testemunha, taxa de inibição (%), área abaixo da curva para o crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento micelial, tempo para formação dos escleródios, quantidade e massa de escleródios formados. No ensaio de germinação carpogênica foram quantificados a germinação (%), número de estipes e apotécios por escleródio e a diferenciação destes (%). Foi observado comportamento variável em ambos os isolados do patógeno submetidos aos diferentes tratamentos. Se tratando de compostos difusíveis, *B. subtilis* e Raiz Performance<sup>®</sup> reduziram o crescimento micelial do isolado DC18 nos primeiros períodos de incubação. Por outro lado, o isolado PS16 demonstrou sensibilidade aos tratamentos a partir de 36 HAI, havendo maior antagonismo ao confrontar com *T. harzianum* e BioGreen<sup>®</sup>. Se tratando de produtos comerciais, maior resposta antagônica foi observada no ensaio de compostos voláteis havendo inibição superior a 58% para ambos os isolados do patógeno. Em adição, *T. harzianum* e BioGreen<sup>®</sup> inibiram o processo de esclerogênese nos ensaios difusíveis e voláteis para ambos os isolados do fitopatógeno, resultando no menor número e massa de escleródios formados. A via carpogênica foi estimulada pela ação dos produtos comerciais, com média germinativa de até 34% e diferenciação superior a 24,4%. Os resultados obtidos evidenciam que isolados patogênicos de diferentes localidades respondem de maneira distinta às interações antagônicas de microrganismos e produtos microbiológicos. Além disso, por afetarem a esclerogênese do patógeno, *T. harzianum* e BioGreen<sup>®</sup> podem atuarem como redutor de inóculo no ciclo primário da doença a campo, possibilitando o gerenciamento da doença de maneira integrada. Por fim, produtos comerciais demonstraram estimular parâmetros relacionados à germinação carpogênica, sugerindo alterações na fisiologia do patógeno sob condições *in vitro*.

**Palavras-chave:** biocontrole, miceliogênese, esclerogênese, germinação carpogênica.

**CHAPTER 1: ANTAGONISM OF *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* AND COMMERCIAL FORMULATIONS ON THE *in vitro* CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY**

**ABSTRACT**

The use of microorganisms to control the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* has increased in recent years. However, it is possible that commercial formulations respond differently to the use of pure cultures of biocontrol microorganisms, which may lead to the expression of different antagonistic mechanisms. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antagonistic characteristics of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* in *S. sclerotiorum* isolates (DC18 and PS16) and to compare the efficacy of the isolates with commercial formulations available for biocontrol. Therefore, three *in vitro* assays were conducted to evaluate the antagonistic effect of five treatments (control, *B. subtilis*, *T. harzianum*, Raiz Performance® and BioGreen®). The first assay evaluated the efficacy of volatile compounds on mycelial growth and sclerogenesis in two *S. sclerotiorum* isolates (DC18 and PS16). In the second, the action of diffusible compounds was evaluated on the same parameters and isolates. The third assay addressed the antagonism in carpogenic germination and survival of sclerotia of the DC18 isolate of *S. sclerotiorum*. Regarding the evaluations, in the diffusible and volatile compounds assay, the mean colony diameter was evaluated at 12-hour intervals after incubation (HAI) extending until the maximum growth obtained in the control treatment, inhibition rate (%), area under the curve for mycelial growth, mycelial growth velocity index, time for sclerotia formation, quantity and mass of sclerotia formed. In the carpogenic germination assay, germination (%), number of stipes and apothecia per sclerotia and their differentiation (%) were quantified. Variable behavior was observed in both isolates of the pathogen subjected to the different treatments. Regarding diffusible compounds, *B. subtilis* and Raiz Performance® reduced the mycelial growth of isolate DC18 in the first incubation periods. On the other hand, isolate PS16 demonstrated sensitivity to treatments from 36 HAI, with greater antagonism when confronted with *T. harzianum* and BioGreen®. Regarding commercial products, a greater antagonistic response was observed in the volatile compounds assay, with inhibition greater than 58% for both isolates of the pathogen. In addition, *T. harzianum* and BioGreen® inhibited the sclerogenesis process in the diffusible and volatile assays for both isolates of the phytopathogen, resulting in the lowest number and mass of sclerotia formed. The carpogenic pathway was stimulated by the action of commercial products, with a germination average of up to 34% and differentiation greater than 24,4%. The results obtained show that pathogenic isolates from different locations respond differently to antagonistic interactions between microorganisms and microbiological products. Furthermore, by affecting the sclerogenesis of the pathogen, *T. harzianum* and BioGreen® can act as inoculum reducers in the primary cycle of the disease in the field, enabling integrated disease management. Finally, commercial products have been shown to stimulate parameters related to carpogenic germination, suggesting changes in the physiology of the pathogen under *in vitro* conditions.

**Keywords:** biocontrol, myceliogenesis, sclerogenesis, carpogenic germination.

## 1. INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um dos patógenos mais devastadores e economicamente importantes, conhecido por causar doenças em mais de 600 espécies hospedeiras (DERBYSHIRE et al., 2022; JAHAN et al., 2022; HOSSAIN et al., 2023).

O fungo com hábito de vida hemibiotrófico, é caracterizado por formar micélio algodonoso de coloração branca, além de produzir nos estágios finais de infecção, quando nenhuma fonte nutricional está disponível, estruturas anamórficas melanizadas denominadas escleródios (ISLAM et al., 2021). Essas estruturas de resistência podem germinar carpogenicamente produzindo ascósporos, os quais são transportados pelo ar a longas distâncias ou germinar miceliogenicamente afetado órgãos vegetais próximos dos escleródios (OJAGHIAN et al., 2019; ALBERT et al., 2022;).

Muitas abordagens têm sido utilizadas para o controle desse fitopatógeno, incluindo práticas culturais, mecânicas e, mais comumente, o uso de fungicidas sintéticos (O'SULLIVAN et al., 2021). Contudo, o uso extensivo e a exposição prolongada destas moléculas químicas no meio ambiente podem levar à poluição ambiental, além de afetar a saúde de mamíferos e, ainda, levar ao aparecimento de cepas resistentes (WANG et al., 2015; ZUBROD et al., 2019; YIN et al., 2023;). Portanto, existe a necessidade de busca por métodos eficazes e ecológicos, destinados a minimizar o uso de fungicidas sintéticos para o controle do fitopatógeno.

Nesse sentido, a utilização de microrganismos antagônicos tem sido testada para inibir o crescimento e desenvolvimento de *S. sclerotiorum*. É de se observar que, indivíduos do gênero *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. apresentam maior interesse para a comunidade científica, considerando-se a adaptabilidade dos isolados antagônicos aos diferentes ambientes de cultivo e a capacidade de sintetizar uma vasta gama de substâncias com potencial antagônico (NIHORIMBERE et al, 2024; SAM-OM et al., 2024).

O fungo *T. harzianum* é um dos principais agentes empregados no biocontrole com grande potencial para complementar as estratégias de controle atuais. Alguns estudos têm demonstrado que a interação entre *Trichoderma* e fitopatógenos é intrinsecamente regulada pela secreção de metabólitos secundários, muitas vezes envolvendo mais de um mecanismo antagônico (ASAD, 2022). *B. subtilis* é uma bactéria gram-positiva, amplamente estudada e utilizada como agente de biocontrole, devido à versatilidade em

estabelecer relações endofíticas com o hospedeiro e biossintetizar lipopeptídeos com potencial antibiótico (ZHANG et al., 2024).

Há de se considerar que a efetividade em controlar o fitopatógeno pode estar diretamente correlacionada com a formulação comercial (FARIAS et al., 2019; JANGIR et al., 2021; MARTINEZ et al., 2023). Assim, é possível que a composição comercial possa influenciar o sucesso no biocontrole, visto que conídios do fungo *Trichoderma* e unidades formadoras de colônia de *Bacillus* como ingrediente ativo são formulados e acrescidos de diferentes compostos orgânicos e transportadores inorgânicos (diluentes ou surfactantes), seja em estado sólido ou em caldo nutritivo, podendo apresentar comportamento diferente quando comparado com as ações diretas e isoladas dos microrganismos.

A caracterização do potencial antagonico de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de diferentes regiões é essencial para avaliar a eficácia do biocontrole, uma vez que a variabilidade genética do patógeno pode influenciar sua suscetibilidade aos agentes biológicos.

Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar as características antagonicas de *T. harzianum* e *B. subtilis* em dois isolados de *S. sclerotiorum* e comparar a eficácia com as formulações comerciais disponíveis para o biocontrole.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. LOCAL DE CONDUÇÃO EXPERIMENTAL**

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados.

### **2.2. TRATAMENTOS UTILIZADOS**

Os ensaios experimentais compartilharam dos mesmos tratamentos, sendo: controle (ausência do antagonista), isolado de *B. subtilis*, isolado de *T. harzianum*, Raiz Performance® e BioGreen®.

### **2.3. PRÉ-SELEÇÃO DOS ISOLADOS FITOPATOGÊNICOS**

Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* armazenados na Micoteca Microbiana do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da UFGD foram

selecionados para a realização de pré-testes visando avaliar a viabilidade e caracterizar seu comportamento *in vitro*. Ao final, dois isolados distintos em termos de patogenicidade e crescimento micelial foram selecionados para a realização do presente ensaio

**QUADRO 1.** Caracterização dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* de acordo com as culturas de onde foram coletados, os municípios e ano de coleta.

CÓD. ISOLADO	CULTURA DE COLETA	MUNICÍPIO DE COLETA	ANO*
DC18	Cártamo	Dourados (MS)	2018
PS16	Soja	Palotina (PR)	2016

\*ano de coleta

Os escleródios desinfestados foram dispostos no centro de placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em câmara do tipo BOD sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C) e fotoperíodo de 12 horas, sendo repicados até a obtenção de culturas puras do fungo.

#### 2. 4. MULTIPLICAÇÃO DOS ISOLADOS SELECIONADOS

Após a obtenção de culturas puras, os isolados fúngicos foram multiplicados em Erlenmeyers contendo discos de cenoura (NASSER et al., 1995). Para tal, 200 g de cenouras foram cortadas em discos com espessura aproximada de 2 mm e acondicionadas em frascos Erlenmeyer de 1000 mL sendo, posteriormente, autoclavados por 20 min a  $120^{\circ} \text{C} \pm 1$  atm.

Após o resfriamento, fragmentos de meio BDA contendo as culturas puras foram depositados sobre o material. Em seguida, o conjunto foi tamponado com algodão esterilizado e incubado a  $25^{\circ} \text{C} (\pm 2^{\circ} \text{C})$  sob escuro contínuo, permanecendo nessas condições por um período aproximado de 45 dias.

Por fim, os escleródios produzidos foram coletados em peneira de 40 mesh (0,42 mm) sendo lavados em água corrente, posteriormente, foram secos em temperatura ambiente e armazenados em câmara fria ( $5^{\circ} \text{C}$ ) até o momento da utilização.

#### 2. 5. ISOLAMENTO DE *Bacillus subtilis* E *Trichoderma harzianum* DE PRODUTOS COMERCIAIS

Para a extração da bactéria *B. subtilis* CCT 7993 (Solubio Raiz Performance<sup>®</sup>) foi adotada a metodologia adaptada de Bettioli et al. (2022). Foram confeccionadas lâminas para observação das células e esporos bacterianos em microscópio sendo empregada a técnica de coloração de Gram para confirmação do sucesso no isolamento.

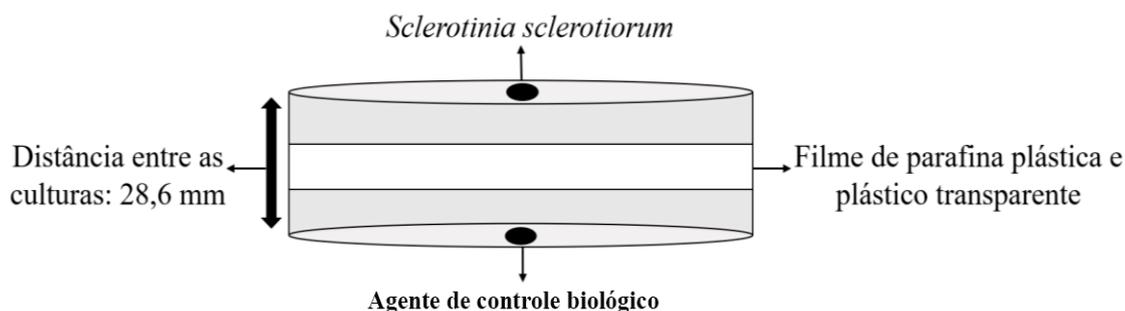
Para isolamento de *T. harzianum* IB19/17 do produto comercial BioGreen<sup>®</sup>, foi preparada cerca de 150 mL de calda, utilizando água destilada estéril. A suspensão foi agitada durante um período de 2 minutos em mesa agitadora a 200 rpm. Logo após, com o uso de micropipeta esterilizada foram transferidos 100  $\mu$ L da suspensão para a superfície de cinco placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sendo lacrado com filme plástico e colocado em câmara incubadora tipo BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento micelial, foram montadas lâminas em microscópio ótico para observação dos conídios e conidióforos da espécie.

## 2. 6. ENSAIO I: EFEITO DE METABOLITOS VOLÁTEIS NO CONTROLE *in vitro* DE *Sclerotinia sclerotiorum*

O efeito de metabólitos voláteis, produzidos pelos isolados antagônicos ou presentes nos produtos comerciais, no crescimento micelial de *S. sclerotiorum in vitro*, foi avaliado por meio da técnica das placas duplas, proposta por Dennis e Webster (1971).

Nesta técnica, placas de Petri contendo meio cultura BDA solidificado receberam os diferentes agentes antagônicos ao centro. Se tratando de isolados, um disco de micélio (3 mm,  $\varnothing$ ) colonizado por *Trichoderma* ou 1 alçada de colônias bacterianas de *B. subtilis* CCT 7993 foram dispostas nas placas. Ao se tratar de produtos comerciais, esses foram contidos em minipoços (5 mm,  $\varnothing$ ) ao centro das placas, os quais foram preenchidos com 50  $\mu$ L da calda comercial.

Da mesma forma, no centro de outra placa de Petri, foi colocado um disco de micélio colonizado pelo patógeno. As placas contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas formando uma atmosfera compartilhada (Figura 1). Por fim, o conjunto foi selado com filme de parafina plástica, de forma que as placas contendo o patógeno ficassem na posição superior e o antagonista na posição inferior. O tratamento controle foi representado por placas contendo o patógeno, mas na ausência do antagonista na parte inferior. As placas foram incubadas em câmara do tipo BOD a 25° C com fotoperíodo de 12 horas.



**FIGURA 1.** Diagrama do experimento de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* exposto aos compostos orgânicos voláteis dos diferentes agentes antagonísticos. Fonte: Adaptado de Dennis e Webster (1971).

As avaliações foram realizadas em intervalos periódicos de 12 horas após a incubação até a estabilização do crescimento no tratamento controle. Foi mensurado o diâmetro da colônia fúngica em eixos ortogonais usando duas medidas diametralmente opostas (X e Y) com auxílio de um paquímetro digital. Além disso, o efeito antagonista foi determinado através do cálculo da taxa de inibição (TI) usando a seguinte fórmula:

$$TI = \frac{(DCA - DCT)}{DCA} \times 100$$

Em que,

TI: é a taxa de inibição;

DCA: diâmetro micelial da colônia na ausência dos antagonistas (controle)

DCT: diâmetro micelial da colônia na presença dos antagonistas.

Para a área abaixo da curva de progresso para o crescimento micelial (AACCM) essa foi calculada com base no proposto por Shaner e Finney (1977), a partir do comprimento médio micelial por meio da equação descrita abaixo:

$$AACCM = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) \times (T_{i+1} - T_i)$$

Onde,  $Y_i$ : valores de crescimento de colônia na época de avaliação  $i$  ( $i=1, n$ )

$Y_{i+1}$ : valores de crescimento de colônia  $i + 1$   $T_i$ : época da avaliação  $i$ , que considerou o intervalo entre as avaliações.  $T_{i+1}$ : época da avaliação  $i + 1$   $n$ : número de observações.

Os valores obtidos do crescimento micelial foram utilizados para o cálculo do IVCM (índice de velocidade de crescimento micelial) conforme Oliveira (1991), sendo determinado através da equação:

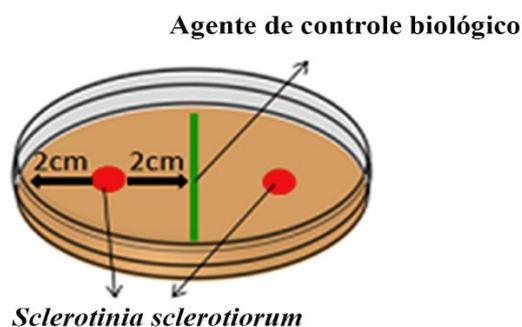
$$IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Onde,  $D$ : diâmetro atual da colônia;  $D_a$ : diâmetro da colônia do dia anterior;  $N$ : número de dias após a inoculação.

Para verificação do efeito na esclerogênese, as unidades experimentais foram monitoradas periodicamente até a estabilização da formação dos escleródios no controle. Com isso, foi registrado o tempo necessário para formação dos escleródios (h), quantidade formada (unid.) e massa total (mg).

## 2. 7. ENSAIO II: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTAGÔNICA NO CONTROLE *in vitro* DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM CULTURAS PAREADAS

O efeito inibitório de metabólitos antifúngicos produzidos pelos microrganismos ou contidos nos produtos formulados foi avaliado conforme a metodologia proposta por Rosa et al. (2010). Nesse procedimento, dois discos de micélio de *S. sclerotiorum* com 3 mm de diâmetro foram dispostos a 2 cm de ambas às bordas da Placas de Petri (98 mm, Ø) e ao centro da placa foram dispostos os agentes de antagonismo (Figura 2).



**FIGURA 2.** Diagrama do experimento de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* exposto aos compostos orgânicos voláteis dos diferentes agentes antagonísticos. Fonte: Adaptado de Silva (2020).

Com relação aos tratamentos, estes foram similares ao ensaio anterior. Assim, cada microrganismo/formulado constituiu um tratamento, sendo dispostos nas placas descartáveis respeitando algumas particularidades. Primeiramente, para o isolado de *B. subtilis*, duas alçadas contendo crescimento bacteriano foram dispostas ao centro das Placas de Petri. Para *T. harzianum*, um disco de micélio (3 mm, Ø) do isolado foi centralizado nas placas. Por fim, produtos comerciais foram contidos em minipoços (5 mm Ø) preenchidos com 50 µL da calda comercial. Para esse ensaio, o controle constituiu apenas do crescimento do fungo na ausência dos agentes antagonísticos. As placas foram incubadas em câmara do tipo B.O.D a 25°C com fotoperíodo de 12 horas.

A medição do crescimento micelial foi realizada em intervalos periódicos de 12 horas incubação até a estilização do crescimento no tratamento controle com o auxílio de um paquímetro digital, sendo realizadas aferições no crescimento micelial do patógeno em eixos ortogonais estabelecidos em ambos os discos do patógeno presente em cada unidade experimental.

O efeito antagônico foi calculado com base na taxa de inibição de crescimento micelial (PIC), área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM), índice de velocidade de crescimento (IVCM) e produção de escleródios.

## **2. 8. ANÁLISE VISUAL DA ESTRUTURA MORFOLOGICA DO MICÉLIO.**

Tendo em vista que as relações antagônicas observadas no isolado DC18 de *S. sclerotiorum* serem mais evidentes, optou-se por avaliar os danos morfológicos causados pelos tratamentos. Foram confeccionadas lâminas utilizando micélio do fitopatógeno próximo da região de confronto coradas com azul de lactofenol para sendo observadas em microscópio óptico (40x/0.65).

## **2. 9. ENSAIO III: POTENCIAL ANTAGÔNICO DE PRODUTOS COMERCIAIS OU MICRORGANISMOS ISOLADOS NA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA E SOBREVIVÊNCIA DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotinia sclerotiorum***

Escleródios do isolado DC18 de *S. sclerotiorum* produzidos *in vitro* passaram por um processo de desinfestação superficial em solução de álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos, seguido por lavagem em água destilada e esterilizada por mais 1 minuto, assim como as caixas de acrílico também passaram pelo mesmo processo para garantir as condições assépticas do ensaio.

Após a secagem das caixas, meio ágar-água foi vertido e solidificado para o plaqueamento dos escleródios respeitando o padrão de 4x5, resultando num total de 20 escleródios por unidade experimental.

Após o plaqueamento, foi pipetado 50 µL da suspensão aquosa dos mesmos tratamentos anteriores utilizados nos ensaios anteriores, com a adoção de algumas particularidades relacionadas aos isolados microbianos e aos formulados comerciais. Para os isolados microbianos, foram ajustadas suspensões aquosas com concentrações similares às dos produtos comerciais, sendo que, no caso do isolado bacteriano de *B. subtilis* CCT 7993, a suspensão foi ajustada para  $1,08 \times 10^8$  UFC/mL, enquanto o isolado fúngico de *T. harzianum* IB19/17 foi preparado com  $2,1 \times 10^9$  conídios/mL. Em relação aos formulados comerciais, foi aplicada uma calda de 50 µL em cada escleródio. O controle foi representado pela aplicação de 50 µL de água destilada estéril.

Após a aplicação, o conjunto Gerbox foi lacrado com filme plástico e colocado em câmara incubadora tipo BOD a 15°C e fotoperíodo de 12 horas. Assim, cada gerbox foi considerada uma unidade experimental sendo monitoradas periodicamente até o aparecimento dos estipes.

Imediatamente após a detecção das primeiras estipes, tiveram início as avaliações semanais onde foram quantificados: (1) número de escleródios germinados, (2) número de estipes por unidade experimental, (3) número de apotécios por unidade experimental. Ao final, foi calculada a porcentagem de escleródios germinados, tempo médio para o aparecimento dos apotécios, quantidade de estipes e apotécios formados e a porcentagem de diferenciação de estipes em apotécios.

## **2. 10. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para os ensaios de compostos voláteis e difusíveis, os dados relativos ao crescimento micelial dos isolados foram analisados individualmente em cada tempo de incubação. Assim, os valores obtidos ao longo do tempo foram transformados em  $\sqrt{X} + 1$  e submetidos a análise de variância, quando significativos pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ) as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Para o ensaio de germinação carpogênica, os dados de germinação (%) foram transformados em arco seno  $\sqrt{X} + 1/100$ , e os demais em  $\sqrt{X} + 1$ , sendo submetidos a análise de variância. A análise de regressão foi realizada para verificar possíveis associações entre dias após a incubação (DAI) vs tratamento. Em casos de ausência de interação significativa ( $p > 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2003).

## **3. RESULTADOS**

### **3. 1. ENSAIO I: EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS NO CONTROLE *in vitro* DE *Sclerotinia sclerotiorum***

O crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum* foi afetado negativamente pelo efeito de compostos voláteis produzidos por microrganismos antagonistas e/ou presentes em formulações comerciais. Os diferentes agentes antagônicos influenciaram o desenvolvimento micelial para ambos os isolados fitopatogênicos ao longo dos períodos de incubação (Apêndice A).

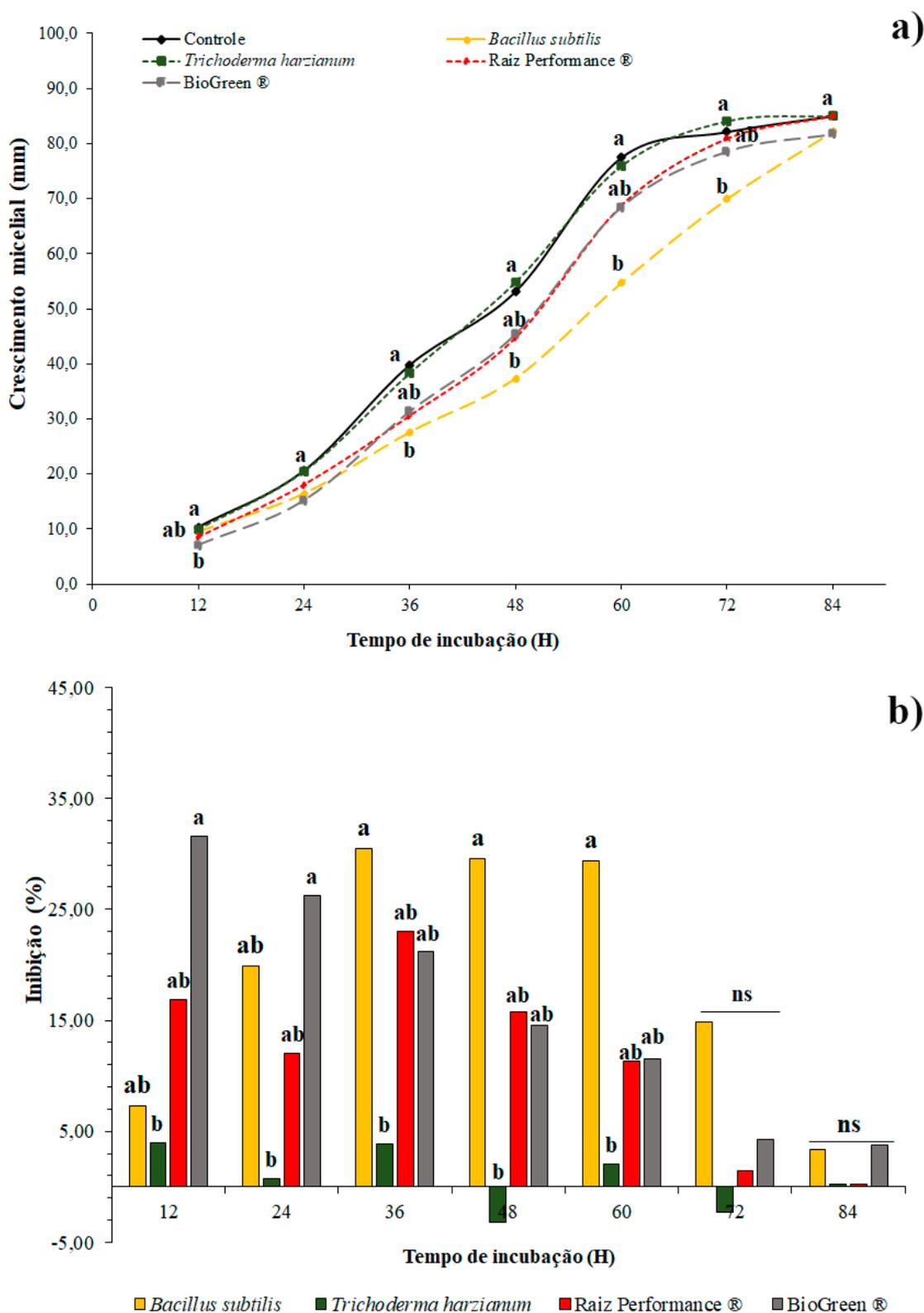
### 3. 1. 1. ISOLADO DC18

No período de 12 HAI, pouca interferência foi observada no crescimento da colônia fúngica do isolado fitopatogênico DC18, sendo que, somente o produto comercial BioGreen® apresentou diferença significativa em relação ao controle (10,35 mm), com diâmetro de 7,08 mm (Fig. 03-a). Assim, observou-se máxima inibição para o mesmo tratamento nesse período (31,61%) (Fig. 03-b).

No período posterior, sendo 24 HAI, não foram observadas diferenças significativas no crescimento micelial entre os tratamentos. Apesar disso, a inibição apresentou destaque mediante a utilização do BioGreen® havendo 26,2% de inibição sobre a testemunha (Fig. 03-b).

Nos períodos de 36 a 48 HAI, a exposição indireta a *B. subtilis* CCT 7993 resultou na redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* DC18 apresentando crescimento médio de 27,64 mm e 37,40 mm, respectivamente (Fig. 03-a), o que refletiu em maior porcentagem de inibição (Fig. 03-b).

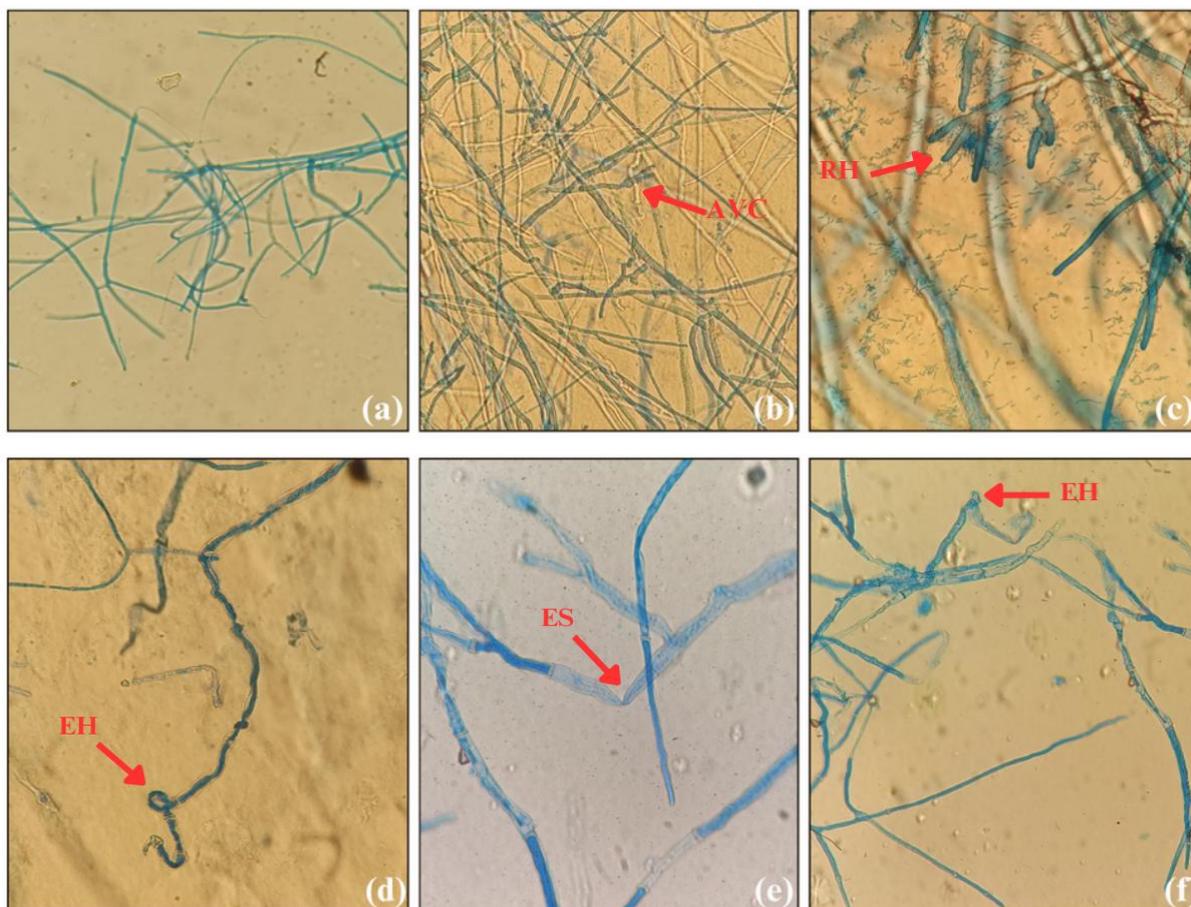
No período de 48 HAI, os compostos voláteis produzidos por *T. harzianum* apresentaram baixa efetividade em inibir o crescimento do isolado DC18 do fitopatógeno. Assim, o diâmetro médio de colônia fúngica observada foi 54,77 mm, não diferindo da testemunha (53,09 mm). Por sua vez, tal resultado corrobora com o observado nas porcentagens de inibição desse isolado apresentando valores negativos (-3,16%) (Fig. 03-b).



Com relação ao período final de incubação para o DC18 de *S. sclerotiorum*, somente compostos voláteis produzidos por *B. subtilis* CCT 7993 foram eficazes em reduzir o crescimento micelial do isolado fitopatogênico no período de 60 e 72 HAI, havendo diâmetro médio de colônia fúngica em 54,71 mm e 69,94 mm, respectivamente. Com isso, *B. subtilis* apresentou maior efetividade em inibir o crescimento micelial do fitopatógeno, contudo, não diferiu do observado para Raiz Performance® e BioGreen® (Fig. 03-b).

Por fim, para a última avaliação realizada no período de 84 HAI, compostos voláteis produzidos pelos tratamentos deixaram de afetar o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* DC18, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Analisando a morfologia dos micélios em placas confrontadas com os compostos voláteis produzidos pelos microrganismos antagonistas, foi possível observar anormalidades recorrentes na estrutura física do micélio. Foi observado que a exposição a compostos voláteis produzidos por *B. subtilis* CCT 7993 resultou no aumento volumétrico entre os septos (Fig. 04 - d), enrolamento excessivo e estrangulamento da parede celular. Ainda, compostos voláteis produzidos por *T. harzianum* IB19/17 apresentaram as mesmas anomalias citadas, com exceção do enrolamento das hifas do patógeno (Fig. 04 - ef).



**FIGURA 4.** Microscopia óptica para análise visual micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* DC18 sob influência do confronto direto e a compostos voláteis oriundos de diferentes isolados ou produtos microbiológicos em 60 horas após a incubação. Dourados-MS, UFGD, 2024. NOTA: (a) - Testemunha; (b) – confronto direto com *Trichoderma harzianum* IB19/17; (c) – confronto direto com *Bacillus subtilis* CCT 7993; (d) – confronto com compostos voláteis produzidos por *Bacillus subtilis* CCT 7993; (e-f) – confronto com compostos voláteis produzidos por *Trichoderma harzianum* IB19/17. Todas as imagens possuem inserções com ampliação de 40/0,65. Nota: AVC – aumento de volume celular; RH – ramificações hifais; EH – enrolamento hifal; ES – estrangulamento de septos.

A respeito do índice de velocidade de crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, verificou-se que os compostos voláteis dos tratamentos não foram efetivos em reduzir a velocidade do crescimento do isolado DC18 de *S. sclerotiorum*. Portanto, diferenças significativas não foram observadas. Além disso, apenas a cepa CCT 7993 de *B. subtilis*, afetou a AACCM em relação a testemunha (quadro 02).

**QUADRO 02.** Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) do isolado DC18 de *S. sclerotiorum* submetido a exposição de compostos voláteis oriundos de isolados ou produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024.

Tratamentos	IVCM <sup>1</sup>	AACCM
Testemunha	62,50 a	312,94 a
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7993	53,89 a	245,54 b
<i>Trichoderma harzianum</i> IB19/17	61,94 a	313,26 a
Raiz Performance <sup>®</sup>	56,93 a	283,20 ab
BioGreen <sup>®</sup>	53,57 a	277,85 ab
<b>CV (%)</b>	<b>4,3</b>	<b>9,81</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Para fins de análise estatística, os dados obtidos foram transformados em raiz de x+1

Em relação a esclerogênese, observou-se que a exposição ao *T. harzianum* IB19/17 e BioGreen<sup>®</sup> reduziu a quantidade média de escleródios formados. Entretanto, apenas *T. harzianum* IB19/17<sup>®</sup> foi efetivo em possibilitar uma menor massa total dos escleródios formados (quadro 03).

**QUADRO 03.** Tempo de formação, quantidade e massa total de escleródios do isolado DC18 de *S. sclerotiorum* sob influência direta de diferentes isolados e produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024.

Tratamentos	Tempo (h) <sup>1</sup>	Quantidade (un)	Massa Total (mg)
Testemunha	159,87 a	32,20 a	428,40 a
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7993	187,33 a	23,50 a	303,20 ab
<i>Trichoderma harzianum</i> IB19/17	138,90 a	5,80 b	144,20 b
Raiz Performance <sup>®</sup>	144,49 a	17,40 ab	317,80 ab
BioGreen <sup>®</sup>	91,20 a	5,40 b	161,80 ab
<b>CV (%)</b>	<b>50,65</b>	<b>27,73</b>	<b>41,75</b>

<sup>1</sup>Tempo médio, expresso em horas, para formação de uma população de 50% do total de escleródios formados;

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para fins de análise estatística, os dados obtidos foram transformados em Raiz de x + 1

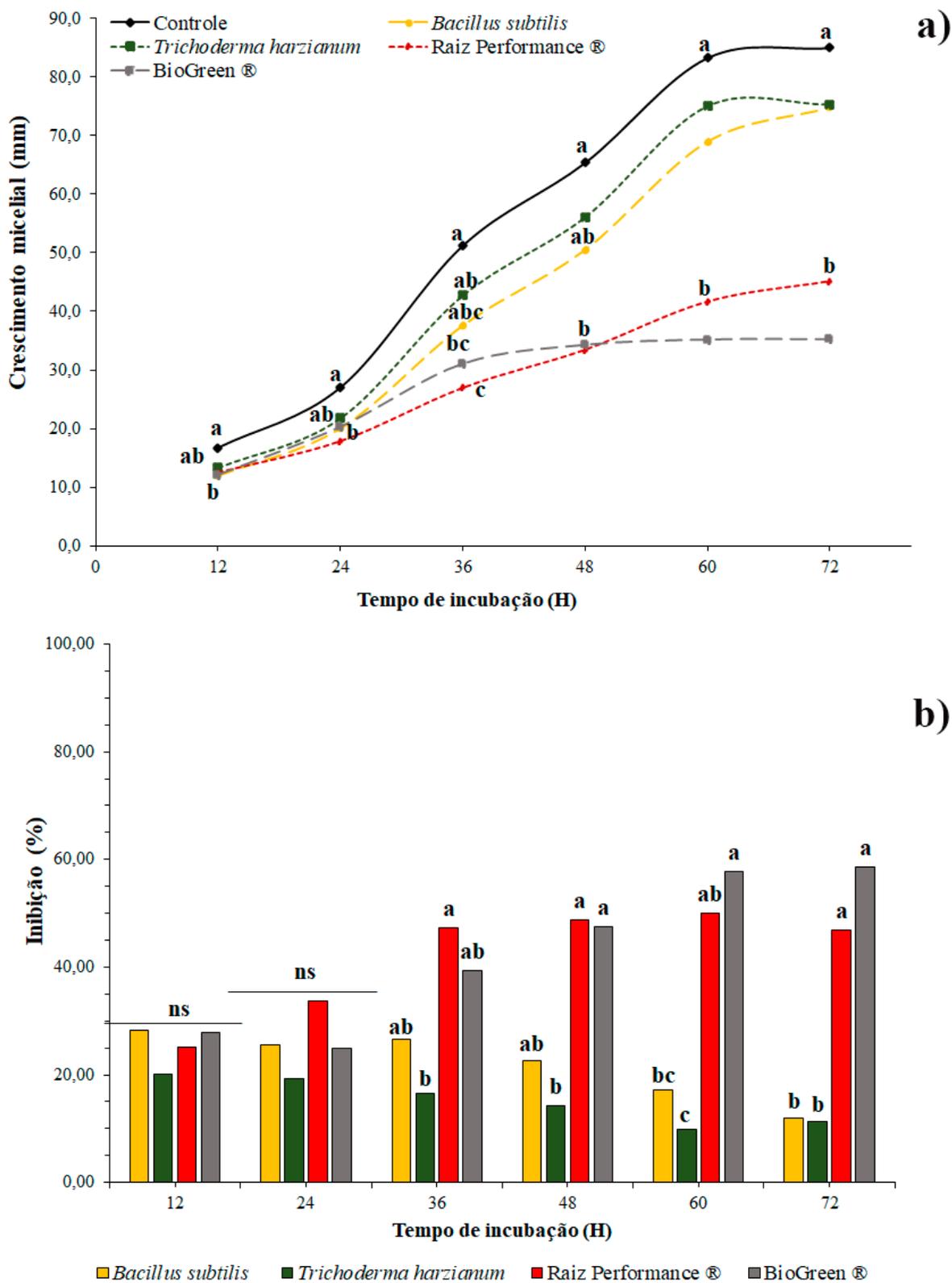
### 3. 1. 2. ISOLADO PS16

Em relação ao comportamento do PS16, a exposição aos compostos voláteis do BioGreen<sup>®</sup> reduziu significativamente o crescimento micelial, apresentando valor médio de 12,04 mm no período de 12 HAI (Fig. 05-a). No período de 24 HAI, apenas a utilização do Raiz Performance<sup>®</sup> foi significativamente menor ao controle, com crescimento médio de 17,90mm. Contudo, não foram detectadas diferenças significativas na taxa de inibição para ambos os períodos (Fig. 05-b).

No período de 36 a 48 HAI, o confronto indireto com BioGreen® e Raiz Performance® resultou em diminuição do crescimento micelial, com diâmetro médio de colônia de 26,95 mm e 31,05 mm para o período de 36 HAI, respectivamente, e 33,46 mm e 34,27 mm, respectivamente, para o período de 48 HAI, diferindo estatisticamente da testemunha, porém não entre si (Fig. 05-a). O que por sua vez, manteve as mais altas taxas de inibição no mesmo intervalo em estudo (Fig. 05-b).

No período de 60 a 72 HAI, o isolado PS16 de *S. sclerotiorum* apresentou maior sensibilidade aos compostos voláteis dos produtos comerciais (Fig. 05-a). Assim, BioGreen® e Raiz Performance® apresentaram a maior diminuição do crescimento fúngico para ambos os períodos, sendo 35,19 mm e 41,68 mm, respectivamente, em 60 HAI, e 35,25 e 45,15 mm em 72 HAI, sendo ambos os resultados estatisticamente semelhantes.

Seguindo os resultados anteriores, a mesma razão foi observada para a inibição do crescimento micelial. Assim, BioGreen® e Raiz Performance® apresentaram valores de inibição entre 57,76% e 49,97%, respectivamente, para o período de 60 HAI, e 58,53% e 46,88%, respectivamente, em 72 HAI (Fig. 05-b).



**FIGURA 5.** Crescimento micelial (mm) (a) e inibição do crescimento micelial (b) do fungo *S. sclerotiorum* PS16 sob influência de compostos voláteis de *B. subtilis*, *T. harzianum* ou produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024. Linhas ou colunas seguidas pela mesma letra minúscula em um mesmo período não diferem entre si, conforme o teste de Tukey para os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). *ns* indica não significância.

O índice de velocidade de crescimento do isolado PS16 de *S. sclerotiorum* apresentou redução significativa quando expostos a compostos voláteis dos produtos comerciais. Logo, BioGreen® e Raiz Performance® apresentaram as menores velocidades de crescimento micelial. Reflexo desses parâmetros foram observados para AACCM refletindo em menores valores (quadro 04).

**QUADRO 04.** Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) do isolado PS16 de *S. sclerotiorum* submetido a exposição de compostos voláteis oriundos de isolados ou produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024.

<b>Tratamentos</b>	<b>IVCM<sup>1</sup></b>	<b>AACCM</b>
Testemunha	50,79 a	282,69 a
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7993	42,12 a	224,37 ab
<i>Trichoderma harzianum</i> IB19/17	44,19 a	244,14 a
Raiz Performance®	29,95 b	152,65 bc
BioGreen®	27,53 b	148,19 c
<b>CV (%)</b>	<b>7,53</b>	<b>18,13</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Para fins de análise estatística, os dados obtidos foram transformados em raiz de x+1

Para o isolado PS16 de *S. sclerotiorum*, não foram observadas diferenças significativas para a esclerogênese e demais parâmetros mediante a exposição dos compostos voláteis originários de isolados ou produtos microbiológicos.

### **3. 2. ENSAIO II: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTAGÔNICA NO CONTROLE *in vitro* DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM CULTURAS PAREADAS.**

O crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum* foi afetado negativamente pelo confronto direto com os microrganismos antagonistas e os produtos comerciais. Os agentes antagônicos influenciaram no micelial de ambos os isolados fitopatogênicos quando confrontados diretamente em culturas pareadas ao longo dos períodos de incubação (Apêndice A).

#### **3. 2. 1. ISOLADO DC18**

No período inicial de 12 a 24 horas após a incubação (HAI), o confronto direto com *T. harzianum* IB19/17 e BioGreen® não afetou o desenvolvimento micelial de *S. sclerotiorum* DC18, apresentando crescimento médio de 11,18 mm e 6,69 mm, respectivamente para o intervalo de 12 HAI, e 19,95 mm e 12,86 mm, respectivamente para o período de 24 HAI (Fig. 06-a).

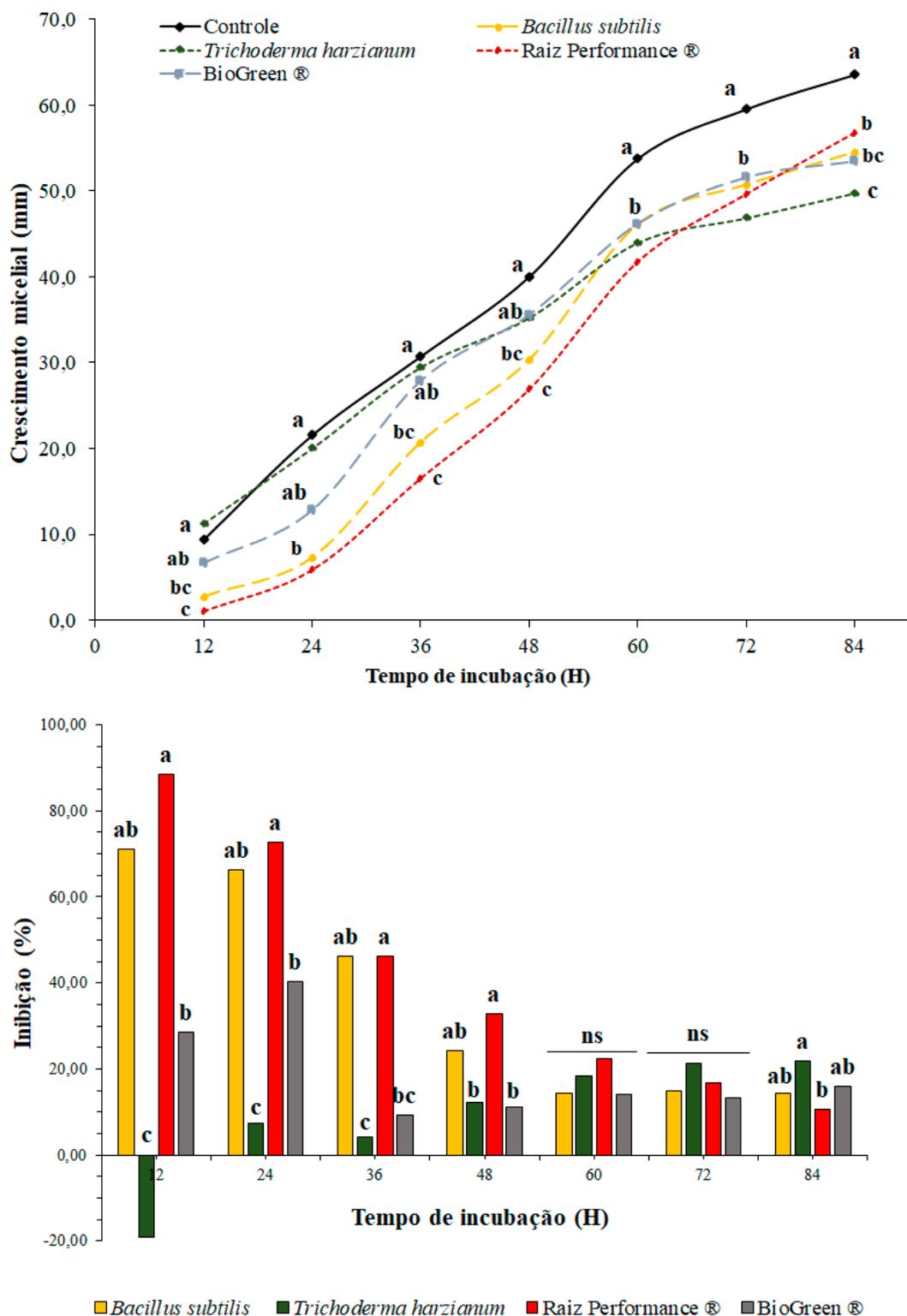
Por outro lado, observou-se que as confrontações diretas com *B. subtilis* CCT 7993 e Raiz Performance<sup>®</sup> apresentaram os menores crescimentos da colônia fúngica para ambos os períodos, apresentando diâmetro médio de 2,70 mm e 1,08 mm em 12 HAI e, 7,26 mm e 5,90 mm para o período de 24 HAI, respectivamente (Fig 06-a).

Em relação as taxas de inibição para o DC18 de *S. sclerotiorum*, observou-se que no período de 12 HAI, houve a inibição de 88,51%, 71,16% e 28,62% em relação a testemunha quando feito o pareamento de culturas com Raiz Performance<sup>®</sup>, *B. subtilis* CCT 7993 e BioGreen<sup>®</sup>, respectivamente. Nesse mesmo período, as porcentagens de inibição para *T. harzianum* IB19/17 apresentaram valores negativos (-19,21%), indicando a baixa eficiência de inibição desse isolado quando confrontado com o DC18 de *S. sclerotiorum* (Fig. 06-b).

Nos intervalos subsequentes, o menor crescimento micelial foi observado ao confrontar diretamente com Raiz Performance<sup>®</sup> e *B. subtilis* CCT 7993 com valores de crescimento médio de 16,56 mm e 20,71 mm, respectivamente, para o intervalo de 36 horas após a incubação e, 26,92 mm e 30,35 mm para o intervalo de 48 horas após a incubação, a qual diferiram significativamente da testemunha (30,74 mm e 40,04 mm, respectivamente) (Fig. 06-a).

Em relação a inibição, Raiz Performance<sup>®</sup> e *B. subtilis* CCT 7993 apresentaram maior inibição do patógeno DC18 no período de 36 e 48 horas após a incubação (Fig. 06-b). Em ambos os tempos avaliados, observou-se resultados estatisticamente semelhantes.

O período final avaliativo para DC18 compreendeu entre 60 a 84 HAI. Assim, todos os tratamentos apresentaram crescimento micelial inferior a testemunha (53,80 mm e 59,57 mm, respectivamente), contudo, não diferiram entre si (Fig. 06-a), o que refletiu na inibição do crescimento micelial para o período citado (Fig. 06-b).



**FIGURA 06.** Crescimento micelial (mm) (a) e inibição do crescimento micelial (b) do fungo *S. sclerotiorum* DC18 sob influência direta de *B. subtilis*, *T. harzianum* ou produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024. Linhas ou colunas seguidas pela mesma letra minúscula em um mesmo período não diferem entre si, conforme o teste de Tukey para os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). *ns* indica não significância.

Analisando a aparência morfológica do micélio na zona de confronto direta com microrganismos antagonistas, foi possível observar anormalidades morfológicas. O confronto com *T. harzianum* IB19/17 resultou no aumento do volume celular das hifas havendo espessamento hifal e, em menor grau, foi observado o estrangulamento entre os septos das hifas do patógeno (Fig. 04 – b). Em lado oposto, o confronto com a bactéria antagonista resultou em encurtamento das hifas e, por vezes, ramificações excessivas (Fig. 04– c).

Por fim, para o último período de incubação do DC18 compreendido em 84 HAI, todos os tratamentos demonstraram efetividade em diminuir o crescimento da colônia fúngica final, havendo diferença significativa em relação a testemunha (63,59 mm) (Fig. 06-a).

A inibição do crescimento micelial apresentou variação entre 21,84%, 15,89% e 14,24% para *T. harzianum* IB19/17, BioGreen® e *B. subtilis* CCT 7993, respectivamente. Contudo, para os dois últimos tratamentos citados, não foram observadas diferenças ( $p \leq 0,05$ ).

A respeito da velocidade do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* DC18 submetido a cultura pareada com agentes antagônicos, verificou-se que o confronto direto com Raiz Performance® e *B. subtilis* CCT 7993 apresentaram os menores valores do índice e para a área sob a curva de crescimento micelial (quadro 05).

**QUADRO 05.** Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de *S. sclerotiorum* DC18 submetido ao confronto direto a diferentes isolados ou produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024.

<b>Tratamentos</b>	<b>IVCM<sup>1</sup></b>	<b>AACCM</b>
Testemunha	50,28 a	234,47 a
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7993	32,69 bc	181,36 b
<i>Trichoderma harzianum</i> IB19/17	45,61 a	197,97 ab
Raiz Performance®	29,87 c	167,97 b
BioGreen®	40,02 ab	199,44 ab
<b>CV (%)</b>	<b>6,76</b>	<b>10,01</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Para fins de análise estatística, os dados obtidos foram transformados em Raiz de  $x+1$

Em relação a esclerogênese, o confronto direto com *T. harzianum* IB19/17 antecipou a formação de uma população parcial de escleródios do isolado DC18. Além disso, o isolado antagonista e o BioGreen® reduziram a quantidade e a massa total de escleródios formados (quadro 06). Para os demais tratamentos, não houve diferenças estatísticas entre si.

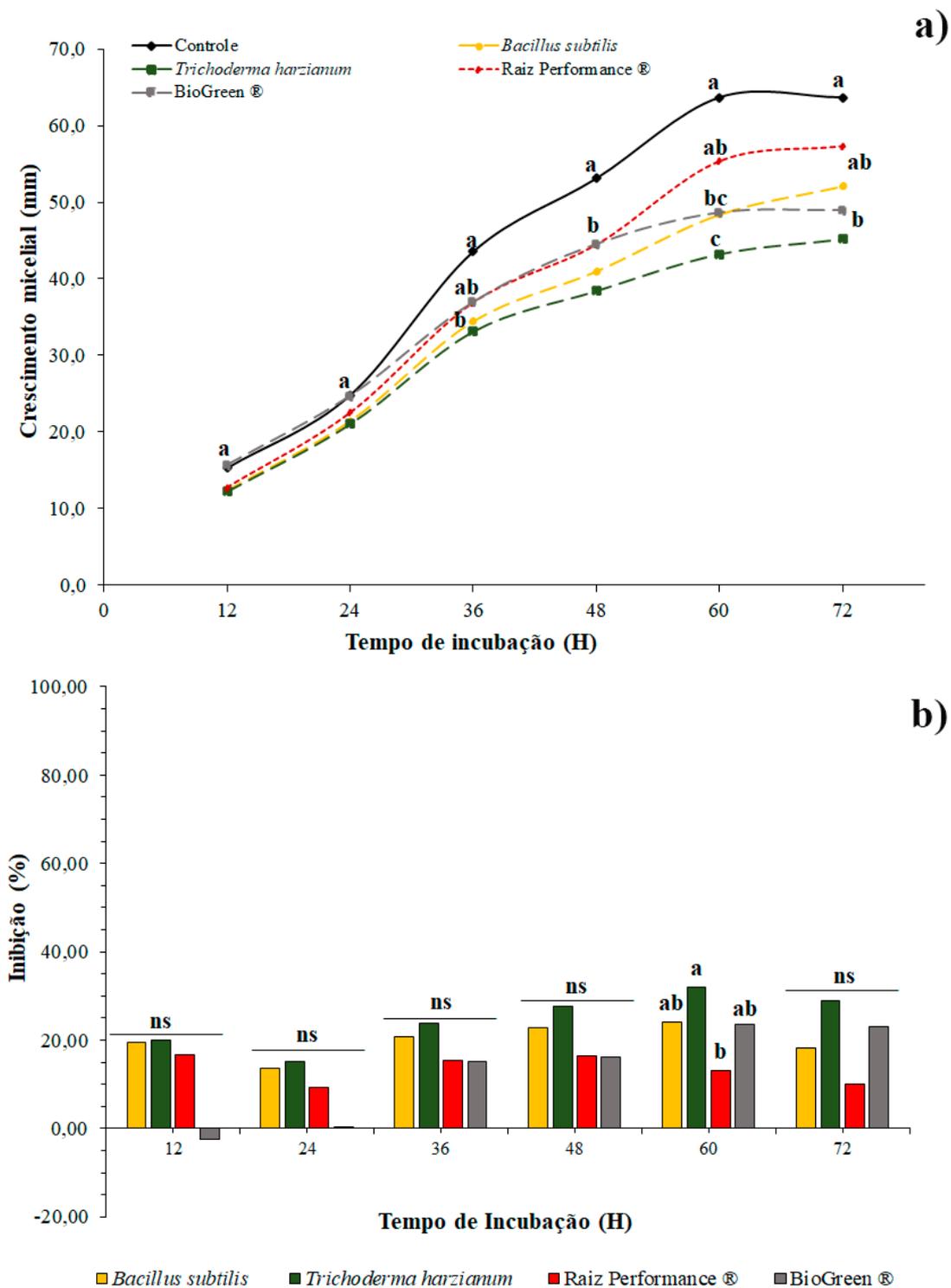
**QUADRO 06.** Tempo de formação, quantidade e massa total de escleródios de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* DC18 sob influência direta de diferentes isolados e produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024.

<b>Tratamentos</b>	<b>Tempo (H)<sup>1</sup></b>	<b>Quantidade (un)</b>	<b>Massa Total (mg)</b>
Testemunha	161,00 ab	25,60 a	399,40 a
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7993	161,00 ab	21,40 a	266,80 a
<i>Trichoderma harzianum</i> IB19/17	86,40 b	1,20 b	12,00 b
Raiz Performance <sup>®</sup>	151,80 ab	24,20 a	342,20 a
BioGreen <sup>®</sup>	188,80 a	4,20 b	40,80 b
<b>CV (%)</b>	<b>31,23</b>	<b>14,83</b>	<b>14,95</b>

<sup>1</sup>Tempo médio, expresso em horas, para formação de uma população de 50% do total de escleródios formados; médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para fins de análise estatística, os dados obtidos foram transformados em Raiz de  $x + 1$

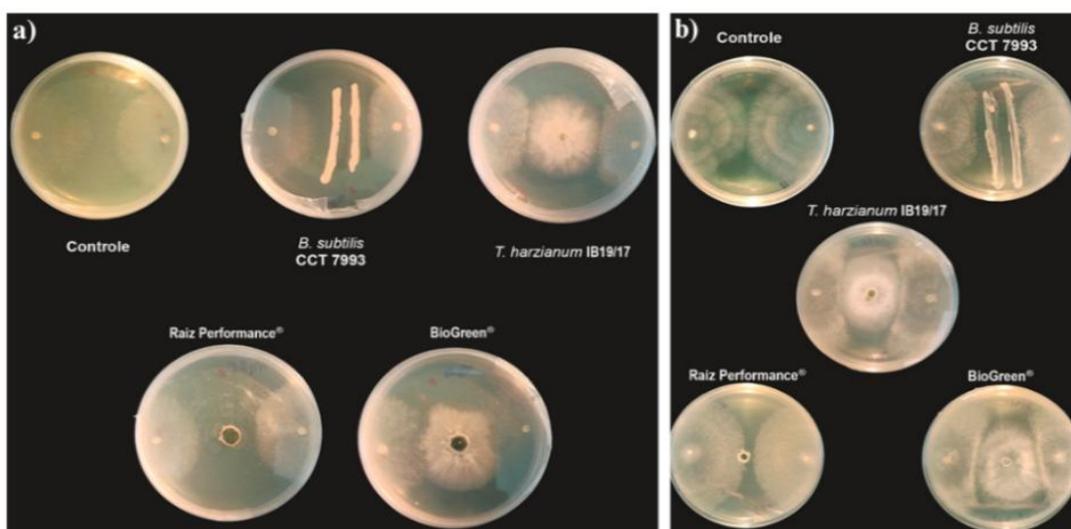
### 3. 2. 2. ISOLADO PS16

O isolado PS16 não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos durante os períodos de 12 e 24 HAI (Fig. 07-a), havendo o mesmo comportamento no que diz respeito a taxa inibitória sobre o PS16 para o período citado (Fig. 07-b).



**FIGURA 07.** Crescimento micelial (mm) (a) e inibição do crescimento micelial (b) do fungo *S. sclerotiorum* PS16 sob influência direta de *B. subtilis*, *T. harzianum* ou produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024. Linhas ou colunas seguidas pela mesma letra minúscula em um mesmo período não diferem entre si, conforme o teste de Tukey para os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). *ns* indica não significância.

O efeito visual dos tratamentos começou a se tornar evidente em 36 HAI ao observar o comportamento do isolado PS16 de *S. sclerotiorum*, sendo possível observar as zonas de contato íntimo entre antagonista e patógeno (Fig. 8). Com isso, o menor crescimento micelial foi observado no confronto com *T. harzianum* IB19/17 e *B. subtilis* CCT 7993, sendo estatisticamente equivalentes (Fig. 07-a). Nas avaliações de 48 HAI, todos os tratamentos diferiram da testemunha, no entanto, não diferindo entre si.



**FIGURA 08.** Crescimento micelial (PIC) dos isolados PS16 (a) e DC18 (b) de *S. sclerotiorum* sob influência direta de diferentes isolados ou produtos microbiológicos em 36 horas após a incubação. Dourados-MS, UFGD, 2024.

O período final de incubação compreendeu entre 60 a 72 horas. Assim, em 60 HAI, o menor crescimento micelial foi observado quando houve o pareamento com *T. harzianum* IB19/17, BioGreen® e *B. subtilis* CCT 7993, apresentando crescimento micelial médio de 43,23 mm, 48,62 mm e 48,39 mm, respectivamente (Fig. 07-a).

A maior inibição do fitopatógeno PS16 observada para esse período foi de 32,12%, mediante a confrontação com *T. harzianum* IB19/17. Entretanto, tal observação não diferiu significativamente de *B. subtilis* CCT 7993 e BioGreen® com valores entre 23,99% e 23,64%, respectivamente (Fig. 07-b).

Para o período de 72 HAI do PS16, apenas o confronto com *T. harzianum* IB19/17 e BioGreen® apresentaram diâmetro de colônia inferior a testemunha (63,68 mm), com valores compreendidos entre 45,18 mm e 48,93 mm. Em adição, não houve diferença significava entre as taxas de inibição conferidas pelos tratamentos no período analisado.

O isolado PS16 de *S. sclerotiorum* apresentou menor velocidade de crescimento quando confrontado com *T. harzianum* IB19/17 e *B. subtilis* CCT 7993 (quadro 07). Por sua vez, com exceção do produto comercial Raiz Performance<sup>®</sup>, todos os demais tratamentos foram efetivos em reduzir o valor da AACPD em relação a testemunha (229,16) mas foram estatisticamente semelhantes.

**QUADRO 07.** Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de *S. sclerotiorum* PS16 submetido ao confronto direto a diferentes isolados ou produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024.

Tratamentos	IVCM <sup>1</sup>	AACCM
Testemunha	41,35 a	229,16 a
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7993	34,03 b	181,22 b
<i>Trichoderma harzianum</i> IB19/17	31,42 b	168,31 b
Raiz Performance <sup>®</sup>	36,65 ab	198,07 ab
BioGreen <sup>®</sup>	35,29 ab	191,69 b
<b>CV (%)</b>	<b>4,28</b>	<b>8,78</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Para fins de análise estatística, os dados obtidos foram transformados em Raiz de  $x+1$

Em relação a esclerogênese, os agentes antagonistas *T. harzianum* IB19/17 e BioGreen<sup>®</sup> foram efetivos em inibir completamente a formação dos escleródios. Em adição, para os demais tratamentos, não foram observadas diferenças significativas, quando comparado com a testemunha (quadro 08).

**QUADRO 08.** Tempo de formação, quantidade e massa total de escleródios de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* PS16 sob influência direta de diferentes isolados e produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024.

Tratamentos	Tempo (H) <sup>1</sup>	Quantidade (un)	Massa Total (mg)
Testemunha	138,14 a	23,40 a	268,20 a
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7993	190,80 a	17,20 a	223,20 a
<i>Trichoderma harzianum</i> IB19/17	- -	0,00 b	0,00 b
Raiz Performance <sup>®</sup>	151,52 a	13,20 ab	189,40 a
BioGreen <sup>®</sup>	- -	0,00 b	0,00 b
<b>CV (%)</b>	<b>47,73</b>	<b>47,19</b>	<b>65,58</b>

<sup>1</sup>Tempo médio, expresso em horas, para formação de uma população de 50% do total de escleródios formados; médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para fins de análise estatística, os dados obtidos foram transformados em Raiz de  $x + 1$ .

### 3. 3. ENSAIO III: POTENCIAL ANTAGÔNICO DE PRODUTOS COMERCIAIS OU MICRORGANISMOS ISOLADOS NA GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA E SOBREVIVÊNCIA DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*.

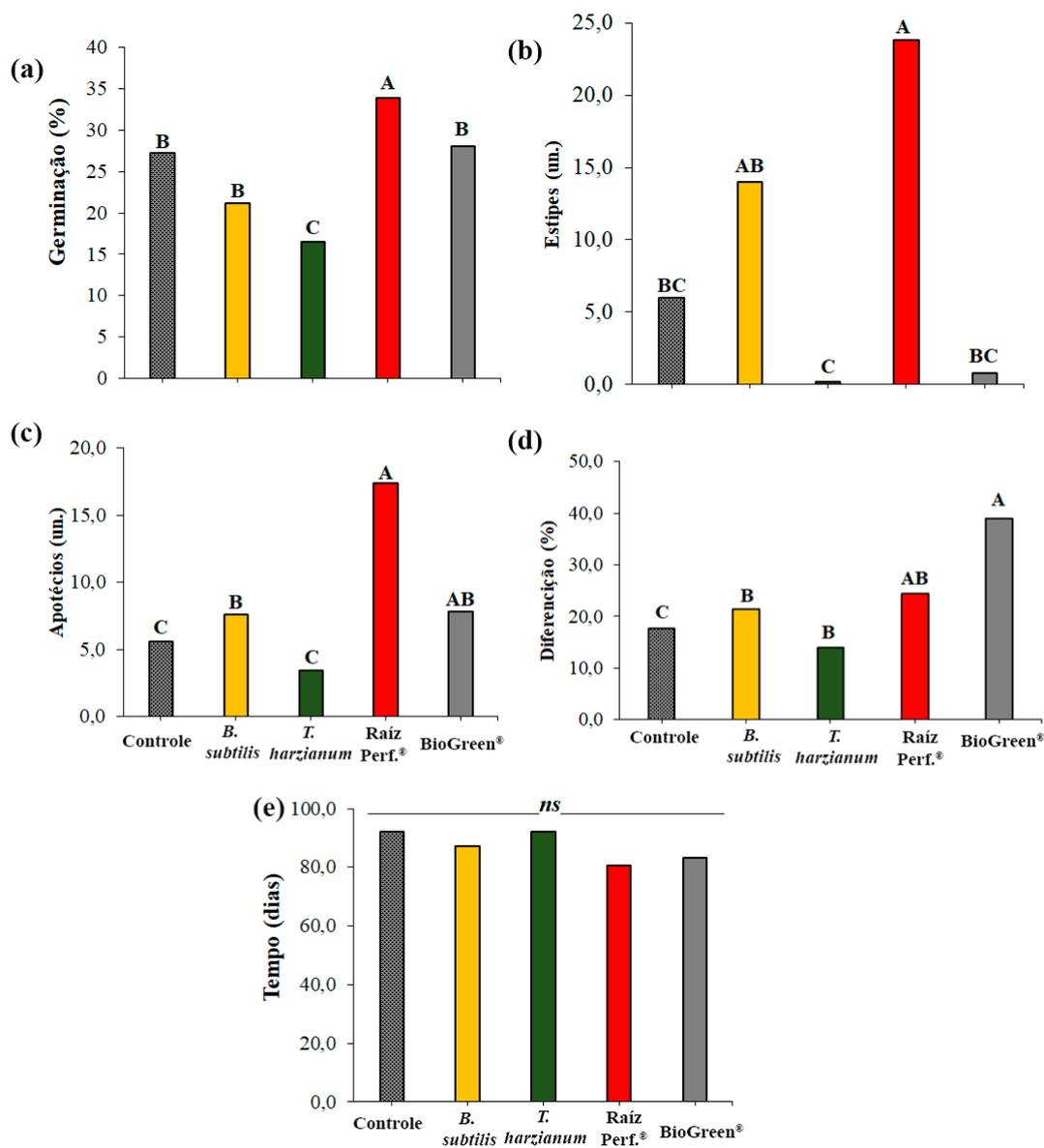
A germinação carpogênica e os parâmetros associados foram afetados pelo contato direto com microrganismos antagonistas e/ou formulações comerciais. Contudo, a análise de variância revelou não haver interação significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos nos diferentes tempos avaliados. Assim, as respostas observadas entre os diferentes agentes antagônicos e os parâmetros testados para o isolado DC18 foram comparadas isoladamente.

A primeira avaliação iniciou-se 62 dias após a incubação sendo realizada semanalmente até o 111 DAI, onde se constatou a estabilização da emissão de estipes e apotécios no tratamento controle. Assim, em relação a germinação carpogênica (%), Raiz Performance<sup>®</sup> resultou na maior média observada (33,87%), diferindo da testemunha (27,25%). O tratamento com a suspensão ajustada de conídios de *T. harzianum* IB19/17 resultou na maior redução da taxa de germinação de escleródios (16,50%) (Fig. 09-a).

O maior número médio de estipes formados por unidade experimental foi observado no tratamento dos escleródios com Raiz Performance<sup>®</sup> (23,8), diferindo significativamente da testemunha (6,0) (Fig. 09-b).

Ao se tratar do número médio de apotécios formados por unidade experimental, escleródios tratados com Raiz Performance<sup>®</sup> também apresentou maior média de apotécios formados (17,40), não diferindo do BioGreen<sup>®</sup> (7,80).

Corroborando com o observado, a utilização de BioGreen<sup>®</sup> e Raiz Performance<sup>®</sup> afetaram positivamente a diferenciação de estipes em apotécios. Assim, com relação à formulação fúngica, cerca de 39,01% dos estipes formados completaram o desenvolvimento e diferenciaram em apotécios. Seguindo o mesmo padrão, Raiz Performance<sup>®</sup> apresentou média de 24,38% de diferenciação. (Fig. 09-d).



**FIGURA 09.** Porcentagem de germinação carpogênica do fungo *S. sclerotiorum* e parâmetros associados do isolado DC18 sob influência de *B. subtilis*, *T. harzianum* ou produtos microbiológicos. Dourados-MS, UFGD, 2024. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, conforme o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). *ns* indica não significância.

Por fim, para o tempo médio para o aparecimento dos apotécios, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, conforme do teste de F da ANOVA ( $p > 0,05$ ) (Fig. 09-e).

#### 4. DISCUSSÃO

Acreditava-se inicialmente que as formulações comerciais poderiam apresentar uma maior eficácia no processo de biocontrole *in vitro* em um amplo espectro de isolados de um mesmo fitopatógeno, devido à maior concentração de metabólitos disponíveis e armazenados nos formulados com maior efetividade a um amplo espectro de isolados de um mesmo fitopatógeno. Contudo, observamos uma contradição parcial à hipótese, já que isolados de diferentes regiões apresentaram sensibilidade variável às formulações e culturas puras.

Assim, *B. subtilis* e Raiz Performance<sup>®</sup> foram efetivos em inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* DC18 no início da incubação por metabólitos difusíveis permanecendo o comportamento até o período de 84 horas após a incubação. No entanto, o biocontrole direto não foi igualmente eficaz para o isolado PS16, sendo efetivo apenas a partir de 36 HAI. Em adição, este último isolado apresentou maior sensibilidade aos metabólitos voláteis produzidos por esses tratamentos. Essas respostas entre isolados do patógeno podem indicar variações na especificidade sugerindo maior sensibilidade dos isolados de *S. sclerotiorum* aos compostos voláteis e difusíveis de origem bacteriana.

Aliado a possível sensibilidade distinta dos isolados fitopatogênicos, as fontes de nutrientes disponíveis no meio de cultura também podem influenciar a secreção de compostos com propriedade antifúngica (CHANG et al., 2021). Meio de crescimento microbiano com baixa qualidade nutricional pode influenciar negativamente a síntese de biomoléculas, atrasando a liberação de metabolitos antifúngicos, visto que a produção ocorre na fase pós estabelecimento do antagonista conforme os resultados observados por XIONG et al. (2022) e BAPTISTA et al. (2022).

Essas informações explicam a diferença de desempenho entre a cepa e o produto comercial. A presença de 70% m/v de compostos orgânicos na formulação do Raiz Performance<sup>®</sup>, possivelmente, sustentou o desenvolvimento nutricional e a produção de moléculas antibióticas, inibindo efetivamente o crescimento, AACCM e a velocidade da colônia fúngica.

A capacidade do antagonista em alterar o ciclo de vida do fitopatógeno foi evidente ao final do período de incubação em ambos os ensaios envolvendo compostos voláteis e difusíveis. Nesse contexto, *T. harzianum* demonstrou interferir significativamente no ciclo de vida dos isolados do fitopatógeno, inibindo a formação de

estruturas de sobrevivência do fungo. Essa característica destaca seu alto potencial de aplicação, considerando sua capacidade de reduzir o inóculo disponível no campo.

Possivelmente, essa interferência no ciclo de vida é reflexo do potencial de micoparasitismo conferido por *T. harzianum* (SILVA et al., 2022b). Ainda, mesmo que haja a produção de escleródios, é possível que o contato com os metabólitos do *Trichoderma* possa alterar a produção do ácido oxálico, componente crucial para a patogenicidade de *S. sclerotiorum*, dificultando o estabelecimento de novas infecções (WU et al., 2023).

Apesar de reduzirem a velocidade e a área sob a curva de crescimento micelial, *B. subtilis* e Raiz Performance<sup>®</sup> não afetaram os parâmetros de esclerogênese. Isso indica que a ação antagônica é fungistática e não persistente, permitindo a esclerogênese. Similaridade foi observada por Akgul e Belguzar (2024) onde o confronto direto com *B. cereus* afetou somente o crescimento micelial, não tendo efeito na formação de escleródios.

A ausência de efeito significativo no IVMC e AACCM ao usar *T. harzianum* pode ser atribuída ao atraso no contato entre o antagonista e o patógeno, devido à alta velocidade de crescimento micelial do isolado DC18 (quadro 2). Assim, patógenos com rápido crescimento micelial, como *S. sclerotiorum*, podem comprometer a eficiência do biocontrole, conforme observado por Shang et al. (2024). Em contraste, o isolado PS16 apresentou sensibilidade ao contato direto com *T. harzianum*, resultando em uma redução significativa no IVMC e AACCM. Esses resultados indicam que diferentes isolados fitopatogênicos possuem níveis variados de sensibilidade ao mesmo agente antagônico, reforçando a ideia de comportamentos intraespecíficos no controle biológico.

Foi observado um maior desempenho dos metabólitos voláteis do BioGreen<sup>®</sup> em reduzir o crescimento micelial de ambos isolados, quando comparado com *T. harzianum*. Essa diferença no desempenho entre o produto formulado e o microrganismo isolado (*T. harzianum*) pode ser atribuída ao perfil quantitativo dos metabólitos voláteis emitidos pelo BioGreen<sup>®</sup> em comparação ao microrganismo isolado. Possivelmente, o produto comercial poderia conter uma maior presença de compostos químicos com ação antimicrobiana, liberando uma maior quantidade de metabólitos voláteis nos primeiros períodos de incubação (12 a 36 HAI), inibindo mais efetivamente o patógeno do que o isolado de *T. harzianum*, que ainda estava em estágio de estabelecimento.

De maneira similar, os dados obtidos corroboram com Marques et al. (2022) e Montalvão et al. (2023) onde compostos voláteis produzidos por *Trichoderma* não apresentaram inibição no crescimento de *S. sclerotiorum*, havendo maior efeito de metabolitos difusíveis, com supressão de até 52% no crescimento do patógeno.

As alterações morfológicas observadas podem estar ligadas a secreção de lipopeptídeos cíclicos produzidos por *B. subtilis*, sendo capazes de alterar processos vitais como o desenvolvimento da parede celular e a síntese da membrana celular (LIANG et al., 2023; NARASIMMAN e RAMACHANDRAN, 2023; YOUSFI et al., 2024).

O ergosterol, principal componente da membrana celular fúngica (RODRIGUES et al., 2018), é alvo de metabólitos com propriedades anfífilas produzidos por *B. subtilis*, que ao se ancorarem na camada lipídica da membrana fúngica promovem alterações físico-químicas, resultando em deformações e segmentos pouco desenvolvidos (Fig. 06 - c). Resultados semelhantes foram reportados por Yang et al. (2020), que observaram a supressão do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e deformações na morfologia hifal em interação direta com *B. amyloliquefaciens*.

Por fim, foi observado que os produtos comerciais estimularam a germinação carpogênica, a emissão de estipes e a diferenciação em apotécios em comparação aos isolados microbianos (fig. 9). Isso sugere que os metabólitos presentes nas formulações comerciais podem ter induzido respostas de sobrevivência do patógeno, induzindo a expressão do fenotípica para adaptação e sobrevivência a condição experimental *in vitro*.

Em contradição aos resultados observados, outros autores observaram efetividade dos metabólitos voláteis de *T. azevedoi* em inibir a germinação carpogênica. Em complemento, os autores relatam que a atmosfera compartilhada entre patógeno e antagonista induziu sinais específicos de comunicação na transcrição de genes de defesa no patógeno na tentativa de induzir a sobrevivência a ação antagônica *in vitro* (SILVA et al., 2022b).

A ação inibitória dos compostos difusíveis e voláteis de microrganismos antagonistas em *S. sclerotiorum* já foi descrita em outros estudos. No entanto, este é o primeiro estudo que teve como objetivo elucidar diferentes respostas de isolados fitopatogênicos às formulações comerciais e seus respectivos microrganismos de origem.

Em perspectivas futuras, é necessário atestar se essas diferenças são observadas em condições *in vivo*, com um hospedeiro compatível na condição de biocontrole, uma vez que, as condições controladas de um experimento *in vitro*, como temperatura, umidade e nutrientes, são mais homogêneas e previsíveis do que as

condições do ambiente real onde as plantas são cultivadas, podendo influenciar o desempenho dos isolados microbiológicos.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciam que isolados patogênicos de diferentes localidades respondem de maneira distinta às interações antagônicas de microrganismos e produtos microbiológicos.

*B. subtilis* e Raiz Performance® apresentaram maior efetividade em reduzir o crescimento da colônia fúngica, além de interferir na velocidade de crescimento e na área abaixo da curva de progresso para o crescimento micelial de ambos os isolados de *S. sclerotiorum*. Contudo, o mesmo comportamento não foi observado na esclerogênese.

*T. harzianum* e BioGreen® apresentaram elevada efetividade em afetar a esclerogênese, o que indica a possibilidade de atuarem como redutor de inóculo no ciclo primário da doença.

Por fim, produtos comerciais estimularam os parâmetros associados a germinação carpogênica, indicando alterações na fisiologia do patógeno mediante a condição estimulada *in vitro*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKGÜL, A. C.; BELGÜZAR, S. The Use of Rhizobacteria on White Rot Disease and Growth of Lettuce. **Black Sea Journal of Agriculture**, v. 7, n. 2, p. 176-183. 2024
- ALBERT, D.; DUMONCEAUX, T.; CARISSE, O.; BEAULIEU, C.; FILION, M. Combining desirable traits for a good biocontrol strategy against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microorganisms**, v. 10, e1189. 2022
- ASAD, S. A. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review. **Ecological Complexity**, v. 49, e100978, 2022.
- BAPTISTA, J. P., TEIXEIRA, G. M.; DE JESUS, M. L. A.; BERTÊ, R.; HIGASHI, A.; MOSELA, M.; DA SILVA, D. V.; DE OLIVEIRA, J. P.; SANCHES, D. S.; BRANCHER, J. D.; BALBI-PENÑA, M. I.; PEREIRA, U, DE P.; DE OLIVIERA, A. G. Antifungal activity and genomic characterization of the biocontrol agent *Bacillus velezensis* CMRP 4489. **Scientific Reports**, v. 12, e17401 2022.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M. **Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: proposta metodológica. Comunicado Técnico 59.** Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/239978/1/Bettiol-Controle-qualidade-2022-2.pdf>>. Acesso em: 14 Abril 2023.
- CHANG, J. D.; VAUGHAN, E. E.; LIU, C. G.; JELINSKI, J. W.; TERWILLIGER, A. L.; MARESSO, A. W. Metabolic profiling reveals nutrient preferences during carbon utilization in *Bacillus* species. **Scientific Reports**, v. 13, n. 11, e23917. 2021
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species - groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v. 57, p. 363-369, 1971.
- DERBYSHIRE, M. C.; NEWMAN, T. E.; KHENTRY, Y.; OWOLABI, T. A. The evolutionary and molecular features of the broad-host-range plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, p. 1075–1090, 2022.
- FARIAS, O. R.; NASCIMENTO, L. C.; CRUZ, J. M. F. L.; SILVA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. D. M.; BRUNO, R. L. A.; ARRIEL, N. H. C. Biocontrol Potential of *Trichoderma* and *Bacillus* Species on *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2019.
- HOSSAIN, M. M.; SULTANA, F.; LI, W.; TRAN, L. S. P.; MOSTOFA, M. G. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the Pathogenomic Features of a Global Pathogen. **Cells**, v. 12, e1063. 2023.
- ISLAM, M. R.; AKANDA, A. M.; HOSSAIN, M. M.; HOSSAIN, M. M. First characterization of a newly emerging phytopathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* causing white mold in pea. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 923-939, 2021.
- JAHAN, R.; SIDDIQUE, S. S.; JANNAT, R.; HOSSAIN, M. M. Cosmos white rot: First characterization, physiology, host range, disease resistance, and chemical control. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, p. 911–929. 2022.

JANGIR, M.; SHARMA, S.; SHARMA, S. Development of next-generation formulation against *Fusarium oxysporum* and unraveling bioactive antifungal metabolites of biocontrol agents. **Scientific Reports**, v. 11, e22895, 2021.

LIANG, Y.; WU, W.; LI, R.; LU, Y.; WANG, G.; TAN, S.; CHEN, H.; XI, J.; HUANG, X.; HE, C.; YI, K. Evaluation of *Bacillus subtilis* Czkl Metabolites by LC–MS/MS and Their Antifungal Potential against *Pyrrhoderma noxium* Causing Brow Rot Disease. **Agriculture**, v. 13, e1396, 2023.

MARQUES, E.; ABREU, V. P.; DE OLIVEIRA, D. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, F. H. C.; CASTRO, K. H. M. DE.; DA CUNHA, M. G. Antagonism and molecular identification of *Trichoderma* isolated from rhizosphere of medicinal plants. **Journal of Biological Control**, v. 36, n.1, p. 07–16, 2022.

MARTINEZ, Y.; RIBERA, J.; SCWARZE, F. W. M. R.; DE FRANCE, K. Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, p. 5595-5612, 2023.

MONTALVÃO, S. C. L.; MARQUES, E.; MARTINS, I.; da Silva, J. P.; de Mello, S. C. M. Suppression of the phytopathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. **Biologia**, v. 78, p.2941–2952, 2023.

NARASIMMAN, V.; RAMACHANDRAN, S. Isolation and characterization of bioactive metabolites of *Bacillus enclensis* CARE-V7 strain from southeast coast of India. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 1, e04113, 2023.

NASSER, L. C. B.; BOLAND, G. J.; SUTTON, J. C. Meio de cultura semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 376, 1995.

NIHORIMBERE, G.; ALLELUYA, V. K.; NIMBESHAHO, F.; NIHORIMBERE, V.; LEGRÈVE, A.; ONGENA, M. *Bacillus*-based biocontrol beyond chemical control in central Africa: the challenge of turning myth into reality. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, e1349357, 2024.

O’SULLIVAN C. A.; BELT, K.; THATCHER, L. F. Tackling Control of a Cosmopolitan Phytopathogen: *Sclerotinia*, **Frontiers in Plant Science**, v. 12, e707509, 2021.

OJAGHIAN, S.; WANG, L.; XIE, G. -L.; ZHANG, J. -J. Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 139, e103999, 2019.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

RODRIGUES, M. L. The Multifunctional Fungal Ergosterol. **mBio**, v. 9, n. 5, e01755, 2018.

ROLLINS, J. A. The *Sclerotinia sclerotiorum* pac1 gene is required for sclerotial development and virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 9, e785-95, 2003.

- ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1491–1502, 2010.
- SAM-ON, M. F. S.; MUSTAFA, S.; YUSOF, M. T.; MOHD, H. A.; KU, A. K. N. A. Exploring the Global Trends of *Bacillus*, *Trichoderma* and Entomopathogenic Fungi for Pathogen and Pest Control in Chili Cultivation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 31, n. 8, e104046, 2024.
- SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.
- SHANG, Q.; JIANG, D.; XIE, J.; CHENG, J.; XIAO, X. The schizotrophic lifestyle of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 25, e13423, 2024.
- SILVA, L. G.; CAMARGO, R. C.; MASCARIN, G. M.; NUNES, P. S. O.; DUNLAP, C.; BETTIOL, W. Dual functionality of *Trichoderma*: Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and biostimulant of cotton plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, e983127, 2022a.
- SILVA, L. R. **Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle de mofo-branco e promoção de crescimento em alface** / Lincon Rafael da Silva Brasília, 2020. 155p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- SILVA, L. R.; MELLO, S. C. M.; VALADARES-INGLIS, M. C.; COSTA, M. M. C.; SARAIVA, M. A. P.; RÊGO, E. C. S.; ZACARONI, A. B.; MUNIZ, P. H. P. C.; PAPPAS, M. C. R. Transcriptional responses and reduction in carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* exposed to volatile organic compounds of *Trichoderma azevedoi*. **Biological Control**, v. 169, e104897, 2022b.
- WANG, Y.; DUAN, Y.; WANG, J.; ZHOU, M. A new point mutation in the iron–sulfur subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to boscalid in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, p.653–66, 2015.
- WU, Y.; LI, X.; DONG, L.; LIU, T.; TANG, Z.; LIN, R.; NORVIENYEKU, J.; XING, M. A New Insight into 6-Pentyl-2H-pyran-2-one against *Peronophythora litchii* via TOR Pathway. **Journal of Fungi**, v. 9, e863, 2023.
- XIONG, Z. R.; COBO, M.; WHITTAL, R. M.; SNYDER, A. B.; WOROBO, R. W. Purification and characterization of antifungal lipopeptide produced by *Bacillus velezensis* isolated from raw honey. **PLoS ONE**, v. 17, n. 4, e0266470, 2022.
- YANG, X.; ZHANG, L.; XIANG, Y.; DU, L.; HUANG, X.; LIU, Y. Comparative transcriptome analysis of *Sclerotinia sclerotiorum* revealed its response mechanisms to the biological control agent, *Bacillus amyloliquefaciens*. **Scientific Reports**, v. 11, e5071, 2021.
- YIN, Y.; MIAO, J.; SHAO, W.; LIU, X.; ZHAO, Y.; MA, Z. Fungicide Resistance: Progress in Understanding Mechanism, Monitoring, and Management. **Phytopathology**, v.113, n. 4, p. 707-718, 2023.
- YOUSFI, S.; KRIER, F.; DERACINOIS, B.; STEELS, S.; COUTTE, F.; FRIKHAGARGOURI, O. Characterization of *Bacillus velezensis* 32a metabolites and their

synergistic bioactivity against crown gall disease. **Microbiological Research**, v. 280, e127569, 2024.

ZHANG, D.; JIANG, X.; LIU, S.; BAI, M.; LIN, X.; LIU, Y.; GAO, C.; GAN, Y. High-efficiency breeding of *Bacillus siamensis* with hyper macrolactins production using physical mutagenesis and a high-throughput culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 398, p. 71-79, 2024.

ZUBROD, J. P.; BUNDSCHUH, M.; ARTS, G.; BRÜHL, C. A.; IMFELD, G.; KNÄBE, L. A.; PAYRAUDEAU, S.; RASMUSSEN, J. J.; ROHR, J.; SCHARMÜLLER, A.; SMALLING, K.; STEHLE, S.; SCHULZ, R.; SCHÄFER, R. B. Fungicides: An Overlooked Pesticide Class?. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 7, p. 3347-3365, 2019.

**CAPITULO 2: BIOCONTROLE COM FORMULAÇÕES E ISOLADOS DE  
*Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* INFLUENCIAM NO METABOLISMO  
FOTOSSINTÉTICO E DE DEFESA CONTRA *Sclerotinia sclerotiorum***

**RESUMO**

O mofo branco é uma doença potencialmente destrutiva que afeta a cultura da soja em todo o mundo. Dentre as práticas de gerenciamento da doença, o controle biológico é uma alternativa promissora, atuando por mecanismos antagonísticos como a indução de resistência no hospedeiro, competição por recursos, produção de compostos antimicrobianos e parasitismo direto sobre os patógenos. Contudo, pouco se sabe sobre as diferenças no potencial antagonístico de culturas puras e formulados comerciais no controle do mofo branco na cultura da soja. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar as diferenças na eficácia entre produtos microbiológicos e culturas puras de antagonistas na indução de resistência ao mofo branco em soja, além de elucidar os mecanismos fisiológicos que promovem essa resistência contra *S. sclerotiorum*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e, posteriormente, em sala climatizada, em arranjo fatorial 2 x 7. Assim, duas cultivares de soja (MSOY 6410 e DM64i63) receberam aplicações sete tratamentos, sendo eles: Bion<sup>®</sup>, Raiz Performance<sup>®</sup>, BioGreen<sup>®</sup>, suspensão ajustada de *B. subtilis* e suspensão ajustada de *T. harzianum* no estágio V3. Além disso, para comparação e caracterização do processo de indução de resistência, o ensaio constou de duas testemunhas não tratadas inoculadas ou não com o fitopatógeno. Decorridos 7 dias após a aplicação, procedeu-se a inoculação com o patógeno pelo método do pecíolo, com avaliações das trocas gasosas e a eficiência quântica fotoquímica aos 3 e 5 dias após a inoculação (DAI), enquanto que aos 7 DAI avaliou-se o índice de clorofila, índices de patometria e atividade de enzimas antioxidantes. Os tratamentos biológicos reduziram o tamanho da lesão e a área abaixo da curva de progresso da doença, embora com desempenho inferior ao Bion<sup>®</sup>. De maneira geral, *B. subtilis*, e BioGreen<sup>®</sup> promoveram ajustes metabólicos nos componentes bioquímicos que garantiram o incremento no metabolismo fotossintético aos 5 DAI. Houve aumento no teor de proteínas totais em plantas sob tratamento biológico onde, Raiz Performance<sup>®</sup> apresentou similaridade a testemunha não inoculada. O metabolismo antioxidante foi influenciado sistemicamente pela aplicação de produtos e isolados microbiológicos reduzindo a atividade da enzima superóxido dismutase e ainda, cultivares responderam de maneira distinta à atividade da peroxidase sendo os efeitos mais evidentes na cultivar MSOY 6410. Esses resultados destacam o potencial dos produtos microbiológicos em modular respostas metabólicas e antioxidantes, garantindo o crescimento vegetal e a sobrevivência do hospedeiro por promover resistência ao mofo branco na soja.

**Palavras-chave:** Mofo branco, acibenzolar-s-metil, indução de resistência, componente antioxidante.

**CHAPTER 2: BIOCONTROL WITH FORMULATIONS AND ISOLATES OF  
*Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* INFLUENCE PHOTOSYNTHETIC  
METABOLISM AND DEFENSE AGAINST *S. sclerotiorum***

**ABSTRACT**

White mold is a potentially destructive disease that affects soybean crops worldwide. Among the disease management practices, biological control is a promising alternative, acting through antagonistic mechanisms such as induction of resistance in the host, competition for resources, production of antimicrobial compounds, and direct parasitism on the pathogens. However, little is known about the differences in the antagonistic potential of pure cultures and commercial formulations in controlling white mold in soybean crops. Therefore, this study aimed to investigate the differences in efficacy between microbiological products and pure cultures of antagonists in inducing resistance to white mold in soybean, in addition to elucidating the physiological mechanisms that promote this resistance against *S. sclerotiorum*. The experiment was conducted in a greenhouse and, later, in an air-conditioned room, in a 2 x 7 factorial arrangement. Thus, two soybean cultivars (MSOY 6410 and DM64i63) received seven treatments, namely: Bion<sup>®</sup>, Raiz Performance<sup>®</sup>, BioGreen<sup>®</sup>, adjusted suspension of *B. subtilis* and adjusted suspension of *T. harzianum* at stage V3. In addition, for comparison and characterization of the resistance induction process, the assay consisted of two untreated controls inoculated or not with the phytopathogen. Seven days after application, inoculation with the pathogen was carried out by the petiole method, with evaluations of gas exchange and photochemical quantum efficiency at 3 and 5 days after inoculation (DAI), while at 7 DAI, the chlorophyll index, pathometry indices and activity of antioxidant enzymes were evaluated. Biological treatments reduced lesion size and the area under the disease progress curve, although with lower performance than Bion<sup>®</sup>. In general, *B. subtilis* and BioGreen<sup>®</sup> promoted metabolic adjustments in biochemical components that ensured an increase in photosynthetic metabolism at 5 DAI. There was an increase in total protein content in plants under biological treatment, where Raiz Performance<sup>®</sup> showed similarity to the non-inoculated control. Antioxidant metabolism was systemically influenced by the application of microbiological products and isolates, reducing the activity of the superoxide dismutase enzyme. Furthermore, cultivars responded differently to peroxidase activity, with the effects being most evident in cultivar MSOY 6410. These results highlight the potential of microbiological products to modulate metabolic and antioxidant responses, ensuring plant growth and host survival by promoting resistance to white mold in soybean.

**Keywords:** White mold, acibenzolar-s-methyl, resistance induction, antioxidant component.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é uma importante cultura para a economia global, especialmente em países em desenvolvimento, devido ao seu alto teor de proteína e à versatilidade de seus subprodutos (RAMLAL et al., 2022; RAMLAL et al., 2024), colocando o Brasil como o maior produtor e exportador mundial de soja *in natura* (USDA, 2024).

A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) projeta que a área brasileira de semeadura de soja na safra 2024/25 será de 47,33 milhões de hectares, com um crescimento de 2,8% em relação à safra anterior, impulsionado pela expansão das fronteiras agrícolas (CONAB, 2024). Entretanto, a produtividade da soja enfrenta desafios, sendo um dos principais o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, responsável por perdas de até 70% em regiões com condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento (WILLBUR et al., 2019; BANDARA et al., 2020; YANG et al., 2022)

Esse patógeno hemibiotrófico ocasiona a doença conhecida como mofo branco e afeta a integridade morfofisiológica de órgãos vegetais, tanto acima quanto abaixo do solo (ZHU et al., 2024). Nos estágios iniciais de infecção, a produção de ácido oxálico pelo patógeno suprime as defesas do hospedeiro, alterando o estado redox do das células infectadas por acidificar os tecidos infectados, alterando o pH das células e desregulando as funções estomáticas, o que leva a morte celular programada semelhante a apoptose (DANIEL et al., 2024; ZHU et al., 2024; DUO et al., 2025). Com o avanço da infecção, o ácido oxálico anula a atividade das enzimas antioxidantes, levando ao acúmulo das espécies reativas de oxigênio ( $O_2^{-1}$  e  $H_2O_2$ ), afetando assim, a integridade estrutural das células do hospedeiro (HOSSAIN et al., 2023). Com isso, retardar essa explosão oxidativa pode ser uma via para induzir resistência no hospedeiro.

Embora existam diversos produtos químicos destinados ao controle da doença (MAPA, 2024), seu desempenho tem sido insatisfatório devido a fatores como dose, frequência de aplicação, localização da aplicação, intensidade do inóculo e toxicidade ambiental (MEYER et al., 2022; BARRO et al., 2019; WU et al., 2023). Além disso, existe a possibilidade de o uso indiscriminado dessas moléculas estimular a seleção de populações resistentes do patógeno (ISLAM et al., 2024). Assim, o uso de agentes de biocontrole (BCA) surge como uma alternativa sustentável e complementar de manejo da doença.

As respostas imunes durante a interação planta-patógeno-BCA são altamente complexas e diferem entre espécies hospedeiras pois estão intimamente ligadas com o modo de infecção e o estilo de vida do patógeno (MCDONALD e STUKENBROCK, 2016). Assim, as plantas podem se proteger contra o ataque de patógenos através de alteração na estrutura física da parede celular impedindo a entrada e/ou dificultando a colonização dos tecidos do hospedeiro. Além disso, respostas químicas contra a infecção podem ser observadas no processo de indução de resistência tais como a produção de fitoalexinas, glucanases, compostos fenólicos e indução da atividade das enzimas antioxidantes (RISEH e VAZVANI, 2024).

Diversos microrganismos demonstraram propriedades antagônicas em relação a *S. sclerotiorum*. A rizobactéria *B. subtilis*, por exemplo, reduziu o progresso da doença em soja, diminuindo a produção de ácido oxálico pelo patógeno e estimulando o crescimento da planta por meio da produção de fitohormônios e enzimas proteolíticas (AYAZ et al., 2024). Outro exemplo é o fungo *T. harzianum* que atua no biocontrole competindo por nutrientes, secretando substâncias que induzem a resistência e a expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de jasmonato e etileno (HASSAN et al., 2023; KAPPEL et al., 2024; PHILIP et al., 2024).

Pesquisas recentes indicam que espécies resistentes a patógenos hemibiotróficos apresentam uma redução na atividade fotossintética como parte de uma estratégia para redirecionar recursos metabólicos às vias relacionadas ao sistema de defesa celular, o que permite mitigar os danos provocados pela explosão oxidativa desencadeada durante a infecção (OLIVEIRA et al., 2023). Assim, o uso de microrganismos benéficos ou de seus metabólitos emerge como uma alternativa promissora para sustentar o aparato fotossintético da planta durante os períodos de estresse causado pela infecção, promovendo, assim, a indução de resistência a doenças (ROSSI et al., 2021; GÓMEZ-GODÍNEZ et al., 2023).

A eficácia no controle do fitopatógeno depende da formulação comercial, já que a combinação de *Trichoderma* e *Bacillus* com compostos orgânicos e inorgânicos pode influenciar o sucesso do antagonismo, apresentando comportamentos diferentes às ações isoladas dos microrganismos (JANGIR et al., 2021; MARTINEZ et al., 2023). Contudo, poucos são os trabalhos que avaliam o efeito associado de BCA nas alterações fisiológicas e enzimáticas em plantas de soja infectadas com *S. sclerotiorum*.

Dessa forma, surgiu o seguinte questionamento: Existem diferenças entre o potencial antagônico de culturas puras e produtos biológicos na indução de alterações

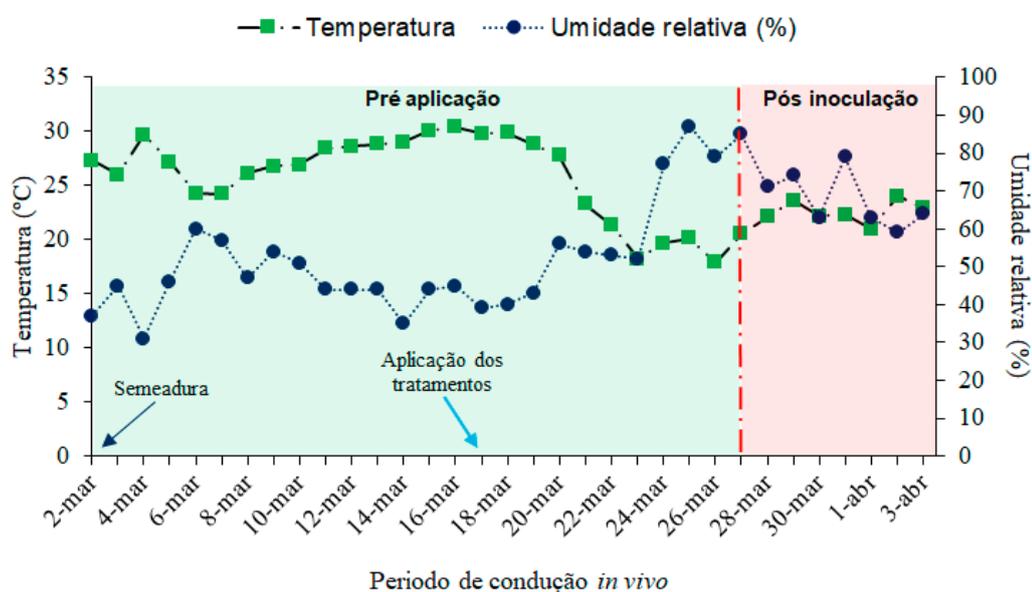
metabólicas em plantas de soja infectadas com o patógeno, que promovem a resistência e, conseqüentemente, impedem a progressão da doença?

O presente estudo teve como objetivo avaliar as diferenças na eficácia entre produtos microbiológicos e culturas puras de antagonistas na indução de resistência ao mofo branco em soja, bem como investigar os mecanismos fisiológicos subjacentes à resistência contra *S. sclerotiorum*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. LOCAL DE CONDUÇÃO EXPERIMENTAL

O ensaio experimental foi desenvolvido em casa de vegetação e, posteriormente, em sala climatizada anexa ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados. O clima predominante da região segundo a classificação de Köppen (1948) é do tipo Cfa (clima temperado úmido), com precipitação média anual de 1.410 mm (FIETZ et al., 2017). Para o acompanhamento da temperatura e umidade relativa do ambiente de cultivo, foi realizada a mensuração utilizando termo-higrômetro, sendo o resultado expresso na figura 01.



**FIGURA 1.** Temperatura e umidade relativa do ar durante o período de condução experimental. Separação temporal em verde representa o período anterior a inoculação e, em vermelho, indica o período a partir da inoculação com o fitopatógeno. NOTA: intensidade luminosa na sala de crescimento aferida foi de 1225 x10 Lux.

## 2. 2. CULTIVARES, PREPARO DOS VASOS E SEMEADURA

Para verificar o efeito dos tratamentos no processo de indução de resistência, duas cultivares de soja com comportamentos distintos à *S. sclerotiorum* foram selecionadas previamente. Assim, uma cultivar considerada suscetível (DM 64i63) e outra, classificada como moderadamente resistente (MONSOY 6410 IPRO) foram selecionadas e as características relativas a variabilidade em tipo de crescimento e grupos de maturidade estão apresentadas no quadro 1.

**QUADRO 1.** Caracterização agronômica das cultivares utilizadas no presente ensaio.

Cultivar	Hábito de crescimento <sup>1</sup>	Grupo de maturação	Altura média (cm)
MISOY 6410 IPRO	Indeterminado	6.4	86
DM 64i63	Indeterminado	6.5	Não informado

O ensaio experimental foi conduzido em vasos de polietileno com capacidade de 0,0049 m<sup>3</sup>, preenchidos com Latossolo Vermelho Distroférrico peneirado em uma malha de 4,0 mm. Para isso, foi realizada a coleta de solo na camada de 0 a 20 cm de profundidade em uma área previamente corrigida na Fazenda Experimental das Ciências Agrárias (FAECA/UFGD). Após a coleta, o solo foi submetido a análise físico-química e os resultados estão apresentados no quadro 2.

**QUADRO 2.** Caracterização química do Latossolo Vermelho Distroférrico utilizado no experimento, coletado na camada de 0-20 cm.

pH	P	K	S	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC	SB	V (%)	
	(mg dm <sup>-3</sup> )						(cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )				
	13,9	346	-	4,63	1,63	0	4,62	11,76	7,14	60,71	
5,0	Areia	Silte	Argila							MO	C.Or
	(g Kg <sup>-1</sup> )									(g dm <sup>-3</sup> )	
	196	617	187							29,39	17,05

As sementes de soja foram inoculadas com *B. japonicum* (100 mL p. c/50 kg de sementes) e deixadas em repouso por 30 minutos. Após a aderência do inoculante, os materiais foram semeados nos vasos de polietileno. A semeadura foi realizada em covas rasas na parte central dos vasos, com aproximadamente 2,5 cm de profundidade, sendo semeadas 10 sementes por vaso.

Após a semeadura, os vasos foram irrigados diariamente para garantir o estabelecimento inicial das plântulas. Em sete dias após a emergência, procedeu-se a

remoção das plantas invasoras e o desbaste, resultando em duas plantas por vaso, sendo mantidas em casa de vegetação até o momento da aplicação dos tratamentos.

### 2. 3. SELEÇÃO DO ISOLADO FITOPATOGÊNICO E OBTENÇÃO DA CULTURA PURA

Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* armazenados na Micoteca Microbiana do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da UFGD foram selecionados para a realização de pré-testes de patogenicidade, visando avaliar sua viabilidade e caracterizar seu comportamento *in vitro*. Ao final, um isolado obtido de plantas de Cártamo infectadas com o patógeno foi selecionado para a realização do presente ensaio.

Para obtenção da cultura pura do patógeno, escleródios desinfestados foram dispostos no centro de placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em câmara do tipo BOD sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C) e fotoperíodo de 12 horas, sendo repicados até o isolamento da colônia fúngica.

### 2. 4. AJUSTE DE SUSPENSÕES E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

As plantas de soja ao apresentarem a emissão da segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida (V3), procedeu-se a aplicação dos tratamentos de acordo com as recomendações apresentadas pelas empresas detentoras (Quadro 03). Além disso, o ensaio apresentou duas testemunhas não tratadas, constando de plantas de soja inoculadas ou não com o patógeno em ambas as cultivares.

**QUADRO 3.** Produtos fitossanitários e doses empregadas na condução do ensaio.

Produto Comercial	Formulação	Ingrediente ativo (i. a.)	Concentração do i.a	Dose comercial	Forma de aplicação
Bion <sup>®</sup>	Granulado dispersível (WG)	Acibenzolar-S-metílico	500 g/Kg	25 g/ha	Foliar
BioGreen <sup>®</sup>	Pó molhável (WP)	<i>T. harzianum</i> IB19/17	$2 \times 10^9$ conídios viáveis/g produto	1,0 Kg/ha	Foliar
<i>T. harzianum</i> IB19/17	Suspensão ajustada	<i>T. harzianum</i> IB19/17	$2 \times 10^9$ conídios viáveis/g produto	-	Foliar

Raiz Performance <sup>®</sup>	Suspensão Concentrada (SC)	<i>B. subtilis</i> CCT7993	1,0 x 10 <sup>8</sup> UFC/mL	6 L/ha	Sulco de plantio
<i>B. subtilis</i> CCT7993	Suspensão ajusta	<i>B. subtilis</i> CCT7993	1,0 x 10 <sup>8</sup> UFC/mL	-	Sulco de plantio

Para a extração da bactéria *B. subtilis* CCT 7993 do produto comercial Raiz Performance<sup>®</sup> foi adotada a metodologia proposta por Bettiol et al. (2022). Para isolamento de *T. harzianum* IB19/17 do produto comercial BioGreen<sup>®</sup>, foi preparada cerca de 150 mL de calda, utilizando água destilada estéril. Logo após, com o uso de uma micropipeta esterilizada foram transferidos 100 µL da suspensão para a superfície de cinco placas de Petri contendo meio de cultura BDA. O conjunto foi lacrado com filme plástico e colocado em câmara incubadora tipo BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Logo após, foram ajustadas suspensões de células mediante a contagem direta das células/conídios com auxílio da câmara de Neubauer em microscópio óptico, cujo as concentrações finais foram aproximadas a dose do produto comercial de origem.

Para a pulverização foliar, foi utilizado o pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub> à pressão constante de 0,28 MPa, acoplado a uma barra de aplicação de dois metros, composta de quatro pontas tipo leque (Jacto AXI-110-02) regulado para vazão de 200 L ha<sup>-1</sup>.

Em referência ao procedimento de aplicação dos produtos de origem bacteriana, visando maior contato de área rizosférica, a inoculação foi feita mediante a inserção de um canalículo com 10,0 cm de profundidade e 0,5 cm de diâmetro, ± 1,5 cm distante do coleto das plantas, adicionando a dose de 1,0 mL do inoculante utilizando micropipeta analítica. Em descrição ao tratamento controle, este consistiu apenas da aplicação via foliar de água sem qualquer adição de produtos ou isolados microbiológicos. Logo após as aplicações, os vasos foram mantidos em casa de vegetação até o momento de inoculação com o *S. sclerotiorum*.

## 2. 5. INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO

Decorrido o período de sete dias após a aplicação dos tratamentos, os vasos foram transportados para sala climatizada onde, foram acomodados em blocos casualizados para realização do procedimento de inoculação.

Para o procedimento, meio BDA contendo cultura pura do patógeno em crescimento com cinco dias de idade foi perfurado com ponteiros de micropipeta (200

$\mu\text{L}$ ) previamente esterilizada. A inoculação foi realizada mediante ao corte no pecíolo do primeiro trifólio emitido, tendo-se deixado aproximadamente 3 cm de pecíolo para inserção da ponteira (DEL RIO et al., 2001). O procedimento foi realizado em ambas as plantas contidas nos vasos de cultivo (Fig. 02).



**FIGURA 2.** Inoculação do fitopatógeno utilizando o método da ponteira. Nota: a) retirada pecíolo do primeiro trifólio emitido utilizando lâmina bisturi descartável; b) corte dos discos de micélio utilizando a base da ponteira sem filtro 200  $\mu\text{L}$ ; c) inoculação do patógeno; d) Plantas incubadas em câmara úmida após a inoculação.

Após a inserção da ponteira no fragmento de pecíolo remanescente, as plantas inoculadas foram cobertas com um saco plástico transparente (60 cm x 60 cm), preso ao vaso com um barbante, formando assim uma câmara úmida, sendo retirada 24 horas após a inoculação.

## 2. 6. VARIÁVEIS AVALIADAS

### 2. 6. 1. PATOMETRIA

Decorrido o período inicial de incubação, a partir dos sintomas evidentes de lesão formada pelo patógeno, o que ocorreu aos 3 DAI, iniciaram-se as avaliações da doença até o período de 7 dias após a inoculação. Assim, foram observados o tempo para formação da lesão (dias) e comprimento da lesão final formada (mm) com auxílio de um paquímetro digital.

De posse dos dados métricos da lesão, a severidade doença foi ajustada com base na escala diagramática adaptada de Venturoso (2012). A escala varia de 0 a 7, em que: 0= ausência de sintomas; 1= lesão com comprimento de até 0,5 mm; 2= lesão entre

0,5 e 2,0 mm; 3= lesão entre 2,1 e 5,0 mm; 4= lesão entre 5,1 a 10,0 mm; 5= lesão entre 10,1 e 20 mm; 6= lesão superior a 20,1 mm; 7= planta morta.

Com base nos valores de severidade, foi calculado o índice da doença, utilizando a equação descrita abaixo:

$$ID(\%) = \frac{\sum (\text{grau de escala} \times \text{frequência})}{n^{\circ} \text{ de unidades} \times \text{grau máximo de escala}} \times 100$$

Para a área abaixo da curva de progresso para o crescimento micelial (AACCM) essa foi calculada com base no proposto por Shaner e Finney (1977), a partir do comprimento médio micelial por meio da equação descrita abaixo:

$$AACCM = \sum_{i=1}^{n-1} n - 1 \left( \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) \times (T_{i+1} - T_i)$$

Onde,  $Y_i$ : valores de crescimento de colônia na época de avaliação  $i$  ( $i=1, n$ )  
 $Y_{i+1}$ : valores de crescimento de colônia  $i + 1$   $T_i$ : época da avaliação  $i$ , que considerou o intervalo entre as avaliações.  $T_{i+1}$ : época da avaliação  $i + 1$   $n$ : número de observações.

## 2. 6. 2. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Aos 3 e 5 dias após a inoculação (DAI) foram avaliadas as trocas gasosas, enquanto que aos 5 e aos 7 DAI avaliou-se a eficiência quântica potencial fotoquímica no fotossistema II e o índice de clorofila, respectivamente. As leituras foram realizadas no último trifólio completamente emitido, evitando a nervura central do folíolo, entre as 7 e 11 horas do período matutino.

Com auxílio do analisador de gás infravermelho (IRGA, LCIPro - SD ADC) foram avaliadas a taxa fotossintética ( $A$  -  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$  -  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$  -  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) e calculada a eficiência intrínseca de carboxilação da Rubisco ( $A/C_i$ ) e a eficiência no uso da água ( $A/E$ ). O índice de clorofila foi mensurado utilizando o clorofilômetro portátil Konica Minolta, SPAD-502.

A eficiência quântica potencial fotoquímica no fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) foi medida utilizando fluorímetro portátil OS-30p (Opti Sciences Chlorophyll Fluorometer, Hudson, USA). A leitura foi realizada no folíolo central do último trifólio completamente expandido sendo submetido previamente a um período de 30 minutos de adaptação ao escuro, utilizando papel alumínio, que de acordo com Maxwell e Johnson (2000) faz com

que os centros de reação do complexo antena sofram oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons

### **2. 6. 3. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

Após o fim das avaliações de patometria, o que ocorreu aos 7 DAI, as folhas e caules das plantas foram colhidas separadamente e congeladas em nitrogênio líquido. Assim, individualmente, uma quantidade de 1 g de cada amostra foi pesada e macerada em solução de 6 mL contendo 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVP) diluída em 100 mL de tampão fosfato de potássio (0,2 M). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi usado como um extrato enzimático para determinar a atividade da superóxido dismutase (SOD,  $\mu\text{g MF}^{-1}$ ) e da peroxidase (POD,  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ), de acordo com Broetto (2014). Para a quantificação de proteínas totais, adotou-se a metodologia proposta por Bradford (1976).

### **2. 7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial 2x7 (2 cultivares e 7 tratamentos), com cinco repetições, sendo que cada unidade experimental foi constituída de um vaso com duas plantas de soja.

Os dados fisiológicos obtidos aos 3 e 5 DAI foram analisados separadamente, não comparando estatisticamente os períodos de avaliação, sendo submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando constatado efeito significativo pelo teste F ( $p < 0,05$ ), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott e as cultivares pelo teste de t de Bonferroni, ambos  $p \leq 0,05$ , utilizando o *software* SISVAR (FERREIRA, 2019). Por fim, foi realizada análise de correlação linear de Pearson (r) ( $p < 0,05$ ) dos parâmetros avaliados em estudo utilizando o *software* PAST 3.21.

## **3. RESULTADOS**

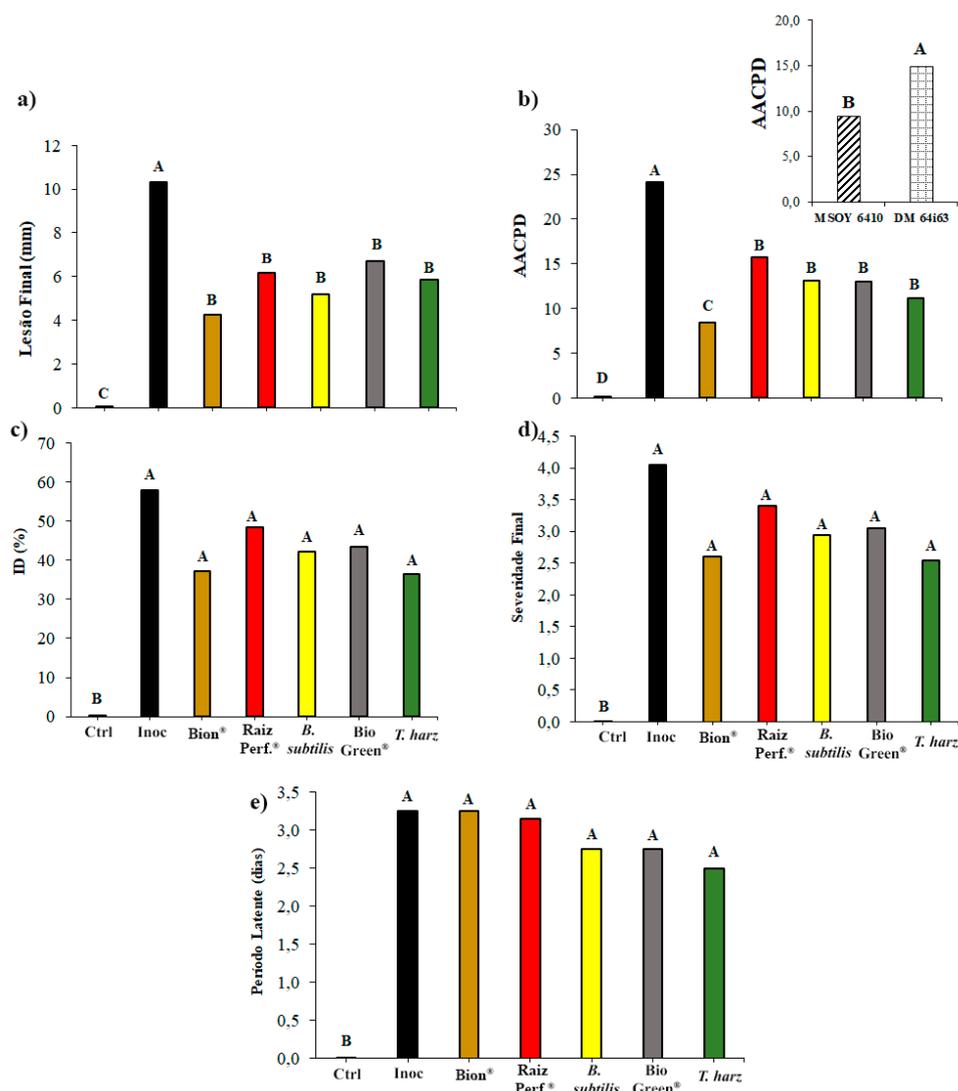
### **3. 1. POTENCIAL DE BIOCONTROLE DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS E ISOLADOS MICROBIOLÓGICOS CONTRA *S. sclerotiorum* EM DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA.**

No que se refere aos parâmetros associados à patometria, não foi constatada interação significativa entre formulações e/ou isolados nas cultivares em estudo. Contudo,

o efeito das formulações e/ou isolados microbianos foi significativo conforme o teste de F ( $p \leq 0,05$ ).

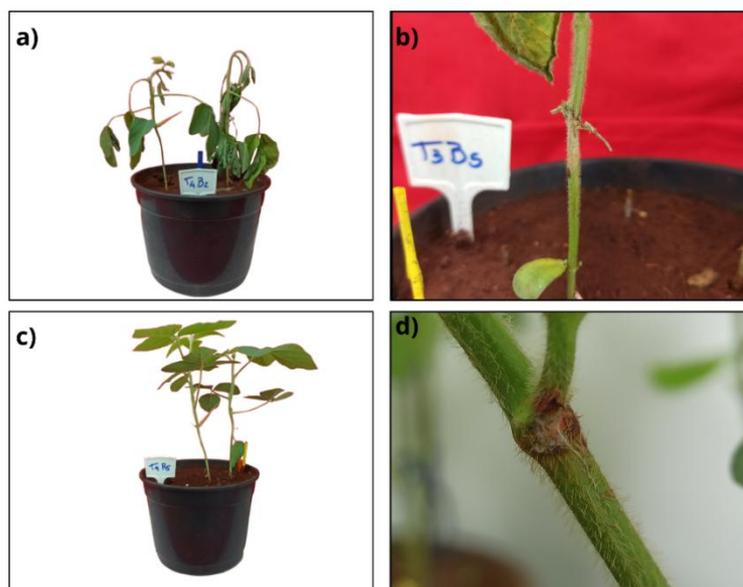
Quanto ao comprimento da lesão final (mm), os diferentes formulados comerciais ou isolados microbianos apresentaram o mesmo desempenho em reduzir o tamanho da lesão final, sendo significativamente semelhantes entre si. Em acréscimo, o maior tamanho médio de lesão foi observado nas plantas controle-inoculado (10,34 mm), enquanto que, o menor tamanho observado foi nas plantas tratadas com o indutor químico (4,26 mm) (Fig. 3-a), representando redução de 41,2% no tamanho final da lesão formada, embora sem diferir dos produtos biológicos para este parâmetro.

No que se refere a AACPD para o comprimento de lesão, a cultivar DM64i63 demonstrou maior suscetibilidade a doença em relação a MSOY6410 (Fig. 3-b). Além disso, todos os tratamentos foram eficientes em reduzir a área abaixo da curva, sendo que o tratamento com Bion<sup>®</sup> apresentou destaque, diferindo dos demais. Em contraponto, a aplicação dos diferentes tratamentos não foi eficiente em reduzir o índice da doença (%), severidade final e o período incubação, sendo assim, para os parâmetros citados, não foram observadas diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) (Fig. 3-cde).



**FIGURA 3.** Comprimento de lesão (mm) (a), área abaixo da curva de progresso relativo ao crescimento de lesão (AACPD) (b), índice da doença (ID (%)) (c), severidade final (d) e período de incubação (dias) (e) em plantas de soja infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com formulados microbiológicos e culturas puras de isolados antagônicos. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparam as médias pelo teste t de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

As plantas infectadas com *S. sclerotiorum* apresentaram sintomas típicos da infecção com murcha evidente aos 7 DAI, apresentando de lesões necróticas longitudinais no caule (Fig. 4-ab). No entanto, plantas tratadas não apresentaram sinais evidentes de murcha (Fig. 4-c), com comprimento de lesão necrótica foi significativamente menor em comparação às plantas infectadas não tratadas, havendo ainda, delimitação da lesão com alteração da coloração típica para arroxeadada (Fig. 4-d).

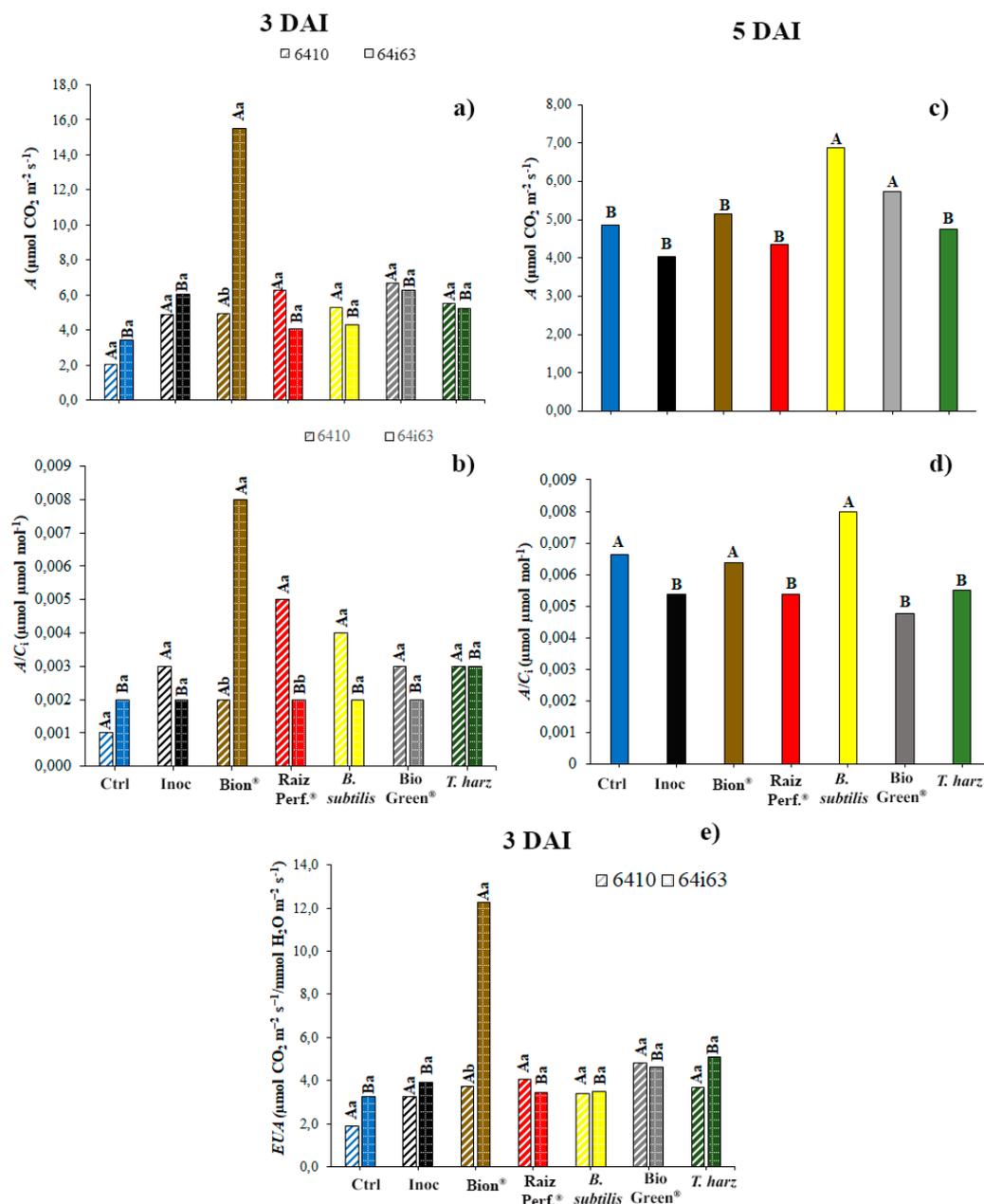


**FIGURA 4.** Efeito de tratamentos com formulados microbiológicos e culturas puras de isolados antagonísticos em plantas de soja infectadas com *S. sclerotiorum* aos 7 DAI. Nota: Aspecto visual e lesão formada em plantas de soja não tratadas e infectadas com *S. sclerotiorum* (a, b) e tratadas com Raiz Performance® (c, d).

### 3. 2. EFEITOS DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS E ISOLADOS MICROBIOLÓGICOS NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DE DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA APÓS INOCULAÇÃO COM *S. sclerotiorum*.

A taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*) foi influenciada pela interação entre as cultivares e os tratamentos aplicados aos 3 DAI e isoladamente pelos tratamentos aos 5 DAI ( $p \leq 0,05$ ) (Apêndice C). Aos 3 DAI, para a cultivar DM 64i63 foi observada um acréscimo significativo na *A* nas plantas tratadas com Bion® (15,49  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), diferindo dos demais tratamentos para essa cultivar. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas mediante a aplicação dos tratamentos na cultivar MSOY 6410 (Fig. 5-a).

Aos 5 DAI, observou-se efeito isolado dos tratamentos, no qual as plantas tratadas com *B. subtilis* e BioGreen® apresentaram maiores valores de *A* (6,87 e 5,72  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente), sendo semelhantes estatisticamente entre si, porém diferindo dos demais tratamentos (Fig. 5-c).



**FIGURA 5.** Taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  –  $A$  (a, c), eficiência intrínseca de carboxilação da Rubisco -  $A/C_i$  (b, d) aos 3 e 5 DAI, respectivamente, e eficiência instantânea do uso da água –  $EUA$  aos três dias após a inoculação em plantas de soja infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com formulados microbiológicos e culturas puras de isolados antagonísticos. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em uma mesma cultivar (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ) e letras minúsculas comparam as cultivares em cada tratamento (t de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

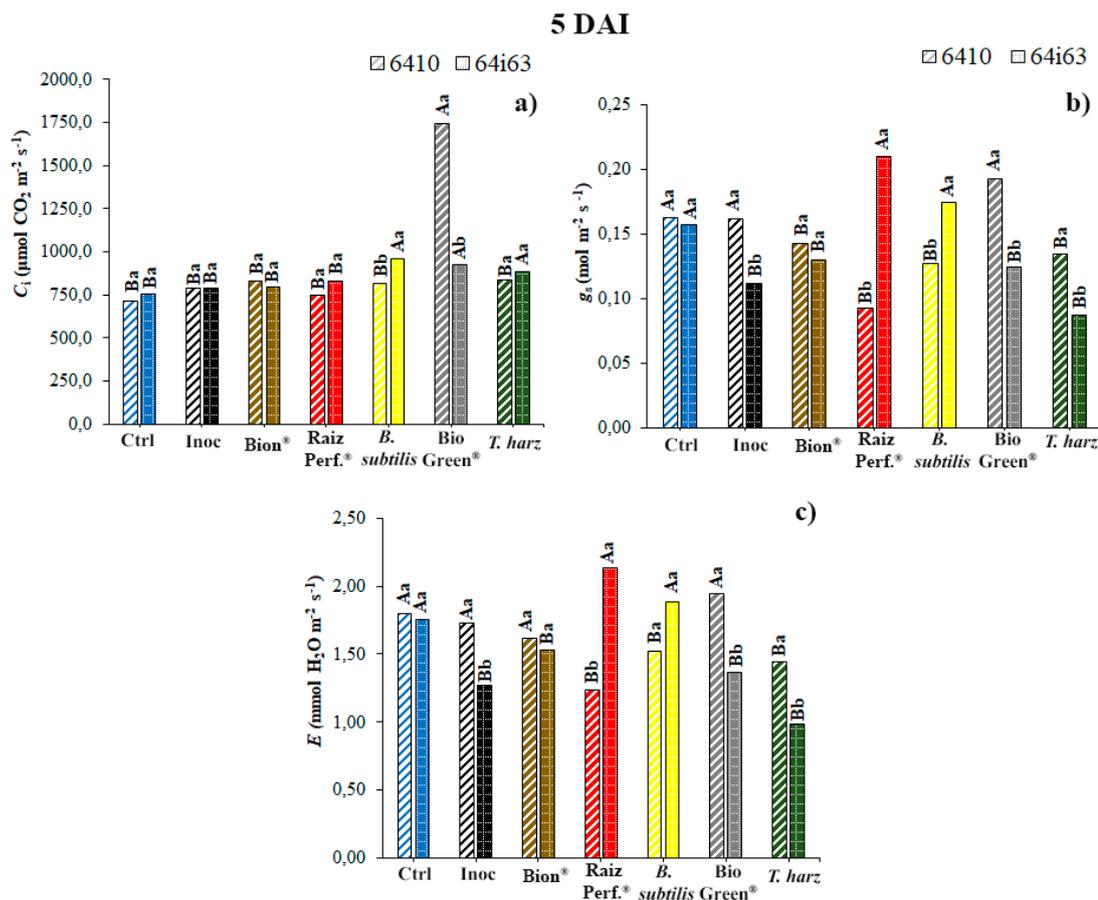
Corroborando ao observado em relação aos parâmetros anteriores, a eficiência intrínseca de carboxilação da Rubisco ( $A/C_i$ ) apresentou maior valor com a utilização do Bion<sup>®</sup>, aos 3 DAI, associado a cultivar DM 64i63, havendo consequentemente maior eficiência intrínseca de carboxilação da Rubisco ( $0,008 \mu\text{mol}$

$\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), diferindo significativamente dos demais tratamentos. Em adição, ao analisar o comportamento entre cultivares, observa-se uma maior eficiência de carboxilação na cultivar DM 64i63 em relação a MSOY 6410 mediante a utilização do Bion<sup>®</sup>. Por outro lado, a utilização do Raiz Performance<sup>®</sup> elevou a  $A/C_i$  na cultivar MSOY 6410 ( $0,005 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) em comparação a DM 64i63 ( $0,002 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Fig. 5-b).

Aos 5 DAI, a  $A/C_i$  foi afetada de maneira isolada pelos tratamentos, no qual Bion<sup>®</sup> e *B. subtilis* apresentaram comportamento similar ( $0,006$  e  $0,008 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente), não diferindo da testemunha não inoculada ( $0,007 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Fig. 5-d).

Quanto a eficiência no uso da água (*EUA*), somente foi observada significância aos 3 DAI com maior valor as plantas tratadas com Bion<sup>®</sup> em associação a cultivar DM 64i63 ( $12,26 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Em corroboração ao observado, o comportamento entre cultivares apenas apresentou diferença significativa ao utilizar o Bion<sup>®</sup>. A cultivar MSOY 6410 apresentou *EUA* média de  $3,72 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , uma redução de 30,3% em relação à anterior (Fig. 5-e).

Os valores da concentração interna de  $\text{CO}_2$  variaram em função da interação entre os fatores em estudo apenas aos 5 DAI. Com isso, as plantas de soja da cultivar MONSOY 6410 IPRO apresentaram maior  $C_i$  somente quando associado ao BioGreen<sup>®</sup> ( $1746,25 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), diferindo dos demais tratamentos. Por outro lado, o efeito dos tratamentos foi mais pronunciado na cultivar DM 64i63 IPRO, apresentando aumento na concentração interna em combinação ao uso de *B. subtilis*, BioGreen<sup>®</sup>, *T. harzianum* ( $955,50$ ;  $924,37$  e  $883,00 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente), na qual apresentaram similaridade estatística diferindo dos demais tratamentos (Fig. 6-a).



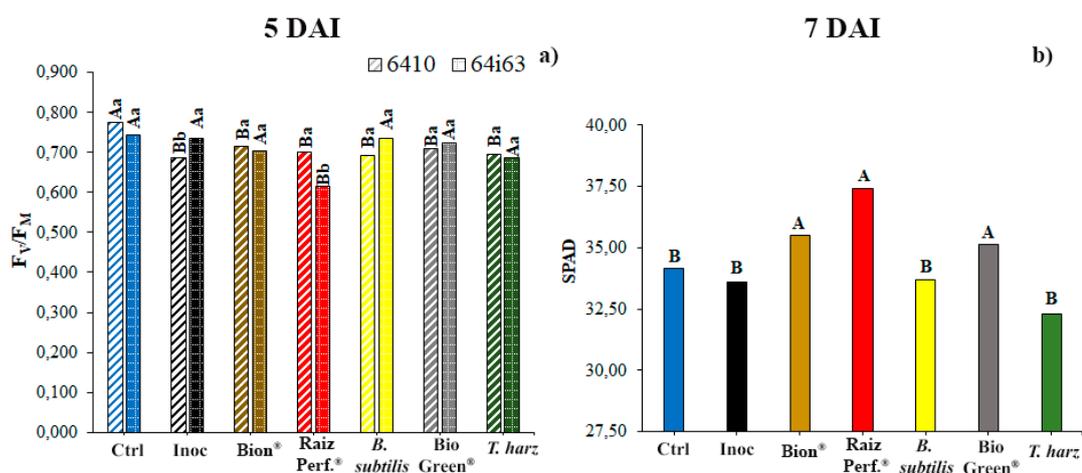
**FIGURA 6.** Concentração interna de  $\text{CO}_2$  -  $C_i$  (a), condutância estomática ( $g_s$ ) (b) e transpiração -  $E$  (c) aos 5 DAI em plantas de soja infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com formulados microbiológicos e culturas puras de isolados antagonísticos. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em uma mesma cultivar (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ) e letras minúsculas comparam as cultivares em cada tratamento (t de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

A condutância estomática ( $g_s$ ) foi influenciada pela interação significativa entre os fatores de estudo apenas aos 5 DAI. Assim, observa-se resposta variável em ambas as cultivares mediante a aplicação de formulados microbianos ou isolados antagonísticos. Em relação a cultivar MSOY 6410, foi verificado redução na  $g_s$  mediante a utilização de Bion<sup>®</sup>, Raiz Performance<sup>®</sup>, *B. subtilis* e *T. harzianum* (0,143; 0,093; 0,127 e 0,135 mol  $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente). Contudo, a mesma semelhança não foi observada na cultivar DM 64i63, onde Bion<sup>®</sup>, BioGreen<sup>®</sup>, *T. harzianum*<sup>®</sup> (0,130; 0,125 e 0,087 mol  $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente) apresentaram similaridade estatística em reduzir a  $g_s$  (Fig. 6-c), sendo semelhantes ao controle inoculado (0,112 mol  $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Analisando o comportamento entre cultivares, MSOY 6410 apresentou maior redução no  $g_s$  quando tratada com Raiz Performance<sup>®</sup> e *B. subtilis*<sup>®</sup>. De maneira contrária, DM 64i63

apresentou maior sensibilidade a inoculação com o patógeno e quando tratada com BioGreen® e *T. harzianum*, reduzindo o valor de  $g_s$  (Fig. 6-b).

Em relação a transpiração, somente foi verificada significância aos 5 DAI. Em complemento, nesse mesmo período, verificou-se interação significativa entre as diferentes cultivares e os tratamentos aplicados ( $p \leq 0,05$ ). A utilização de Raiz Performance®, *B. subtilis*, *T. harzianum* resultou em redução acentuada na transpiração (1,24; 1,52 e 1,44 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente) quando associados a MSOY 6410, diferindo da testemunha (1,80 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) mas não entre si. Por outro lado, foi observada na redução da transpiração na cultivar DM 64i63 mediante a utilização de Bion®, BioGreen®, *T. harzianum* (1,53; 1,37 e 0,99 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente). Contudo, a ação do patógeno associado a cultivar DM 64i63 também resultou em menor transpiração (1,27 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) diferenciando significativamente entre a testemunha (1,75 mmol H<sub>2</sub>O) (Fig. 6-c).

A eficiência quântica potencial do FSII ( $F_v/F_m$ ) foi influenciada pela interação entre os fatores de estudo aos 5 DAI ( $p \leq 0,05$ ). Assim, todos os tratamentos apresentaram valores significativamente inferiores ao observado na testemunha (0,774) para cultivar MSOY 6410. Por outro lado, apenas o tratamento com Raiz Performance® resultou em inferioridade na  $F_v/F_m$  na cultivar DM 64i63 (0,614). Comparando o desempenho entre cultivares, o controle inoculado resultou na menor  $F_v/F_m$  na cultivar MSOY 6410 (0,687). Por outro lado, a mesma cultivar respondeu positivamente a aplicação de Raiz Performance®, elevando o valor quântico para 0,700 (Fig. 7-a).



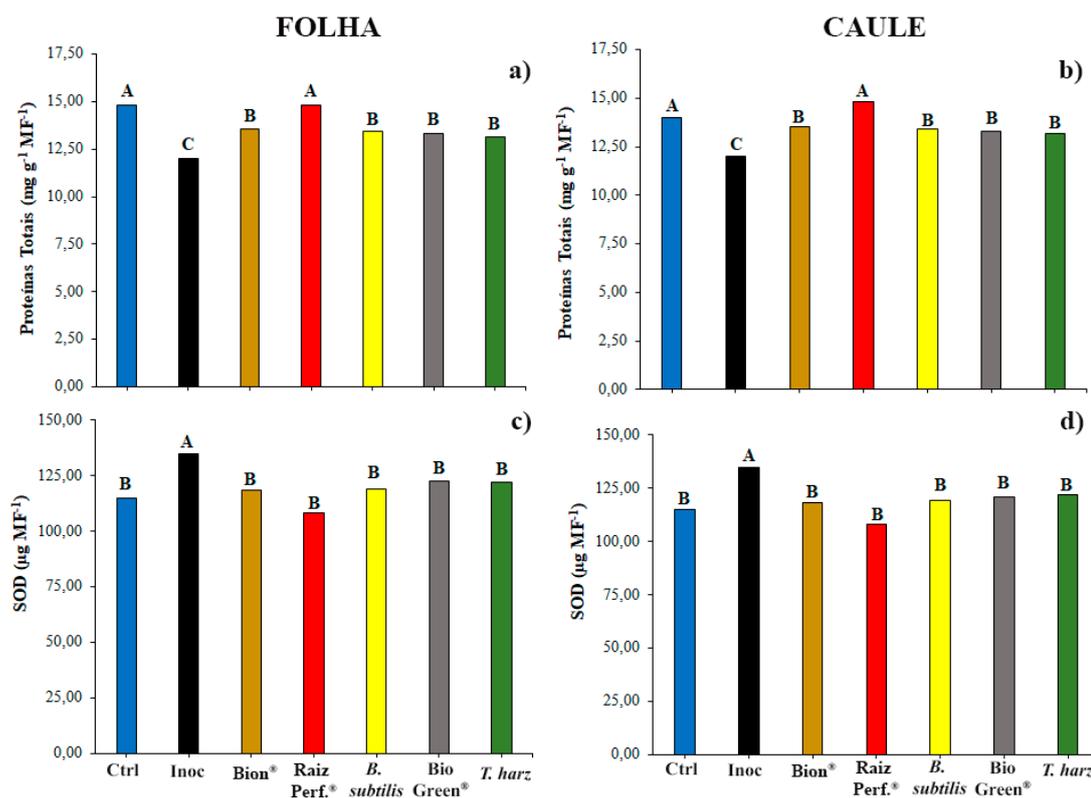
**FIGURA 7.** Eficiência quântica fotoquímica potencial do fotossistema II -  $F_v/F_m$  (a) aos 5 dias após a inoculação e índice de clorofila - SPAD (b) aos 7 dias após a inoculação em plantas de soja infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com formulados microbiológicos e culturas puras de isolados antagônicos. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em uma mesma cultivar (Scott-Knott,  $p <$

0,05) e letras minúsculas comparam as cultivares em cada tratamento (t de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

O índice de clorofila (SPAD) foi influenciado pelo efeito isolado dos tratamentos, com maiores valores (35,49; 37,40 e 35,12) nas plantas com Bion<sup>®</sup>, Raiz Performance<sup>®</sup> e BioGreen<sup>®</sup>, respectivamente, diferindo da testemunha não inoculada (34,15) mas não entre si (Fig. 7-b).

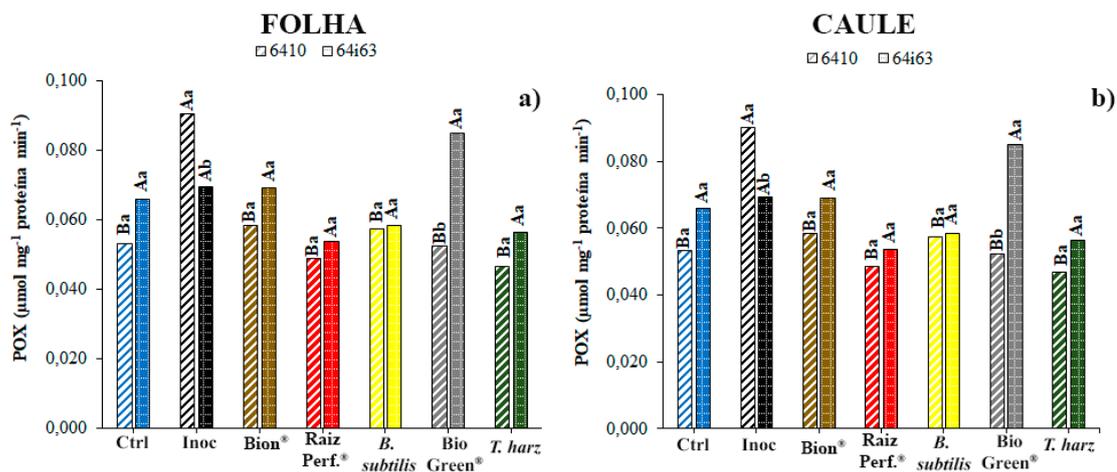
### **3. 3. EFEITOS DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS E ISOLADOS MICROBIOLÓGICOS NOS COMPONENTES ANTIOXIDANTES E PROTEICO DE DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA APÓS INOCULAÇÃO COM *S. sclerotiorum*.**

Em relação ao conteúdo de proteínas totais e superóxido dismutase, verificou-se efeito isolado dos tratamentos, tanto nas folhas quanto no caule das plantas de soja. Com isso, observou-se que a inoculação com o patógeno resultou na redução da alocação de proteína em ambas as partes dos órgãos vegetativos. Contudo, os diferentes tratamentos aplicados resultaram em aumento no conteúdo proteico, sendo que, plantas tratadas com Raiz Performance<sup>®</sup> apresentaram teores de proteínas semelhantes a testemunha não inoculada (Fig. 8-ab).



**FIGURA 8.** Proteínas totais nas folhas (a) e caules (b); atividade da superóxido dismutase (SOD) nas folhas (c) e caules (d) em plantas de soja infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com formulados microbiológicos e culturas puras de isolados antagônicos. Letras maiúsculas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ).

Verificou-se que a inoculação com o patógeno resultou na maior atividade da SOD nas folhas e caules, no entanto, quando foram realizados os tratamentos biológicos este aumento não foi detectado (Fig. 8-cd). Por fim, no que diz respeito a atividade da peroxidase (POX) verificou-se interação significativa entre as cultivares e os tratamentos aplicados. Para a cultivar MSOY 6410 observa-se aumento significativo na POX em ambas partes vegetativas das plantas inoculadas não tratadas, sendo que os tratamentos foram efetivos em reduzir a atividade da enzima, com similaridade a testemunha não inoculada. Contudo, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos na cultivar DM 64i63 (Fig. 9-ab).

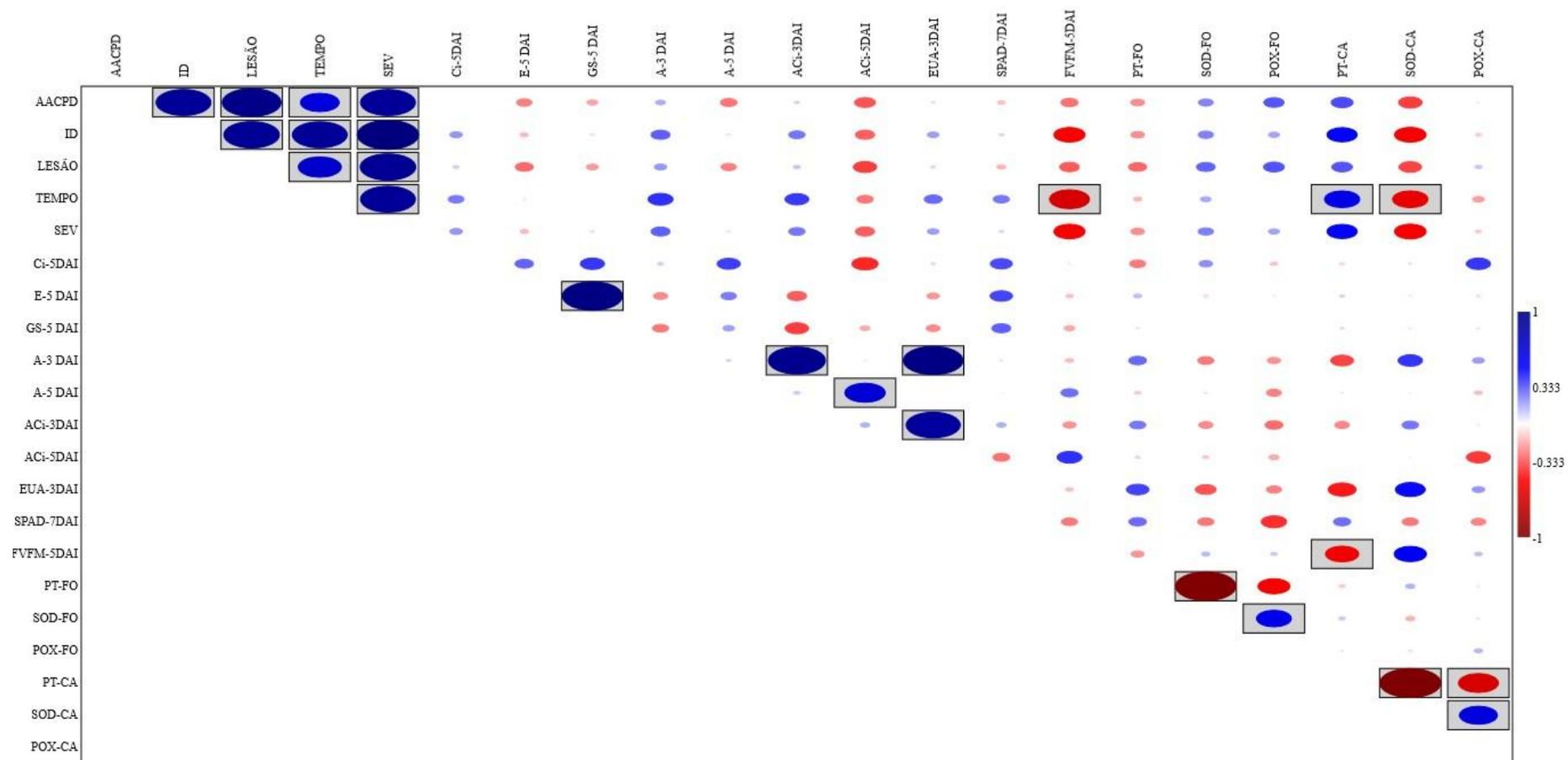


**FIGURA 9.** Atividade peroxidase (POX) nas folhas (a) e caules (b) em plantas de soja infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com formulados microbiológicos e culturas puras de isolados antagonísticos. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em uma mesma cultivar (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ) e letras minúsculas comparam as cultivares em cada tratamento (Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

Em adição, ao analisar o comportamento entre cultivares, observa-se que, na condição da inoculação isolada do patógeno, a cultivar MSOY 6410 demonstrou uma maior atividade da POX. Contudo, com a utilização do BioGreen®, a cultivar DM 64i63 expressou maior atividade da enzima.

Por fim, foi observado correlação entre as características relacionadas a patometria. Considerando os parâmetros fisiológicos, aos 3 DAI, foi observado correlação positiva entre  $A$  e  $A/Ci$  (0,93) e  $A$  e  $EUA$  (0,97). Por outro lado, aos 5 DAI, observou-se correlação positiva apenas entre  $gs$  e  $E$  (0,97).

Correlacionado os fatores fisiológicos com patométricos, o tempo para formação da lesão (TF) apresentou correlação negativa com  $F_vF_M$  (-0,65) aos 5 DAI e a atividade da SOD (-0,57) (Fig. 10). Por outro lado, o TF apresentou correlação positiva com o teor de proteínas no caule das plantas de soja (0,57).



**FIGURA 10.** Correlação linear de Pearson (r) de características avaliadas em plantas de soja infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com formulados microbiológicos e culturas puras de isolados antagônicos. NOTA: 3 e 5 representam os dias após a inoculação (DAI); FO – avaliação na atividade da porção folha; CA - avaliação na atividade da porção caule.

#### 4. DISCUSSÃO

Acreditava-se inicialmente que as formulações comerciais apresentariam maior eficácia no processo de indução de resistência devido à maior concentração de metabólitos prontamente disponíveis, contudo, observamos uma contradição parcial à hipótese, já que as diferenças apenas foram evidentes no estímulo à manutenção do aparato fotossintético e outros processos bioquímicos associados durante a infecção por *S. sclerotiorum*.

Embora seja conhecido que, através do biocontrole a atividade de fitopatógenos pode ser suprimida pela utilização de agentes microbianos ou pelos metabólitos produzidos pelos antagonistas (XU et al., 2025; SANTOSO et al., 2025; FENG et al., 2025; ZIANE et al., 2024), essas respostas são variáveis a depender do patossistema. Em nosso estudo, não foi possível verificar as diferenças entre as formas aplicáveis na progressão da doença, conferindo similaridade estatística.

Independente do genótipo utilizado, houve a formação de uma lesão pequena de coloração branco-acinzentada, a partir dos 3 DAI, a qual se expandiu longitudinalmente nas plantas infectadas com o patógeno (Fig. 4-b). Contudo, os isolados e formulados microbiológicos reduziram eficazmente o comprimento da lesão formada, resultado que pode ser atribuído à habilidade desses agentes antagônicos em competir por espaço e nutrientes, estabelecer relações microparasitárias ou produzir metabólitos com natureza antimicrobiana capazes ainda, de modular o metabolismo do hospedeiro, promovendo resistência sistêmica (EGAMBERDIEVA et al., 2023; YAO et al., 2023).

Diversos estudos atestam a eficácia do biocontrole utilizando cepas de *Bacillus* ou *Trichoderma*. Exemplificando, Heng-Xu et al. (2024) verificaram alterações metabólicas em plantas de pimenta tratadas com *T. gamsi*, resultando na redução do ID a um complexo de patógenos que ocasionam *damping-off* (*S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *R. solani*). Anteriormente, Jia et al. (2023), também observaram redução no ID da podridão do caule em amendoim (*S. rolfsii*) em razão do tratamento com *B. velezensis*. Contudo, vale ressaltar que em ambos os ensaios, os autores realizaram o tratamento com microrganismos antagônicos durante o tratamento de sementes. Assim, é possível que um maior período para associação com o hospedeiro, poderia levar a maiores distinções entre formulados comerciais e isolados microbiológicos no biocontrole.

Comportamento divergente foi observado entre as cultivares em relação à AACPD, o que já era esperado devido à resistência genética presente na cultivar

MSOY6410 (Fig. 3-b). Além disso, a maior redução na AACPD foi registrada com a utilização do Bion<sup>®</sup>. Esse efeito pode estar associado ao ingrediente ativo do produto, o acibenzolar-S-metil (ASM), que é conhecido por atuar como um análogo do ácido salicílico, pois induz a expressão de mecanismos de resistência em plantas, conferindo proteção contra um amplo espectro de fitopatógenos (ZEIER, 2021; GAO et al., 2021; SAKATA et al., 2020).

Durante o processo infeccioso, as folhas da planta hospedeira podem expressar sintomas secundários que, por sua vez, podem afetar processos metabólicos diretamente relacionados ao bem estar do órgão. Apesar disso, a infecção por *S. sclerotiorum* não influenciou a fotossíntese, visto o comportamento entre testemunha não inoculada com testemunha inoculada (Fig. 5).

A alta atividade fotossintética observada na cultivar DM 64i63 com Bion<sup>®</sup> aos 3 DAI deve-se à maior carboxilação da Rubisco (Fig. 5-ab), uma vez que a infecção patogênica não afetou significativamente a condutância estomática nem a disponibilidade de CO<sub>2</sub> no mesófilo foliar. A aplicação exógena do acibenzolar-S-metil pode induzir acúmulo de compostos osmólitos, protegendo e estimulando a atividade do aparato fotossintético, incrementando a atividade fisiológica da Rubisco e favorecendo a síntese de pigmentos fotossintetizantes (NAZAR et al., 2015; XU et al., 2023; ALAM et al., 2023).

Somado a isso, a elevada eficiência do uso da água (*EUA*) sob influência do ASM, sugere otimização do uso da água no metabolismo fotossintético do hospedeiro nos primeiros dias após a inoculação (Fig. 5-e). Alguns autores relacionam que essas alterações refletem na adaptação do hospedeiro em meio a uma perturbação externa (SOMMER, 2020; FUSCO e MINELLI, 2010).

Apesar do incremento na assimilação de CO<sub>2</sub>, é importante ressaltar que não houve perpetuação para o período posterior (Fig. 5-c). Assim, é provável que esse acréscimo momentâneo na assimilação de CO<sub>2</sub> é resultado de uma tentativa do hospedeiro em estimular outras vias metabólicas para induzir a resistência (FU e DONG, 2013; BEKTAS e EULGEM, 2014; GOZZO e FAORO, 2013). Similarmente, Zúñiga-Silvestre et al. (2020) observaram que a aplicação de ASM aumentou temporariamente a assimilação de CO<sub>2</sub> em milho infectado por *P. sorghi*, mas o efeito não persistiu durante o ciclo da cultura.

Aos 5 dias após a inoculação, observou-se que *B. subtilis* e BioGreen<sup>®</sup> promoveram um aumento na assimilação de CO<sub>2</sub>, apresentando valores superiores aos

das testemunhas inoculada e não inoculada. Esses resultados podem ser atribuídos à maior atividade da enzima Rubisco, à concentração interna de CO<sub>2</sub> no mesófilo foliar, bem como à condutância estomática e à taxa de transpiração, que se mantiveram em níveis similares aos observados na testemunha não inoculada (Fig. 6-abc).

O aumento da fotossíntese observado nas plantas tratadas com *B. subtilis* e BioGreen<sup>®</sup> pode estar relacionado à capacidade desses agentes em liberar compostos que melhoram a condutância estomática, possibilitando as trocas gasosas (CHUN et al., 2024), além de solubilizar nutrientes e produzir sideróforos, incrementando o estado nutricional da planta infectada, favorecendo a síntese de clorofila e de proteínas essenciais para o processo fotossintético (FONSECA et al., 2022).

Diversos autores relatam que, durante a colonização por *S. sclerotiorum*, o ácido oxálico secretado pelo patógeno promove o acúmulo de moléculas que alteram a regulação estomática, reduzindo a transpiração e, assim, a disponibilidade de substrato para o processo fotossintético (YANG et al., 2021; FAGUNDES-NACARATH et al., 2018a), o que reflete na perda de turgescência das plantas, a qual apresentou redução da *g<sub>s</sub>* e *E* aos 5DAI e perda de turgescência aos 7 DAI (Fig. 4-a)

Em resposta ao ataque patogênico, a planta ativa a regulação hormonal para proteger seu metabolismo contra o estresse biótico. O ácido abscísico, entre esses hormônios, induz o fechamento estomático, modulando as funções metabólicas, na tentativa de promover o ajuste osmótico. (BHARATH et al., 2021). Estudos anteriores mostraram que a redução da *A* em folhas de trigo suscetível ao *F. graminearum* é regulada por fatores estomáticos, enquanto em folhas de trigo resistente o *g<sub>s</sub>* se mantém sem diminuição significativa (YANG et al., 2016).

A F<sub>v</sub>F<sub>M</sub> na cultivar 6410 sob tratamento biológico não diferiu da testemunha inoculada, sendo menores que no controle não inoculado (Fig. 7-a). Isso sugere que a energia luminosa absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes não foi totalmente alocada para o processo fotoquímico. Por outro lado, a F<sub>v</sub>F<sub>M</sub> na cultivar DM 64i63 somente foi reduzida nas plantas tratadas com Raiz Performance<sup>®</sup>. Essa diminuição na estimativa da F<sub>v</sub>F<sub>M</sub>, pode estar relacionado com a ativação de recursos necessários à defesa, na qual, consomem energia por redirecionar recursos metabólicos que sustentariam a fotossíntese, limitando a quantidade de ATP e NADPH disponíveis para os processos fotossintéticos (YANG et al., 2014; FAGUNDES-NACARATH et al., 2018b).

A fotoinibição, causada pelo acúmulo de O<sub>2</sub><sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prejudica proteínas essenciais ao metabolismo do hospedeiro, sendo a subunidade D1 do PSII particularmente

vulnerável à ação desses componentes oxidativos afetando diretamente o processo fotossintético (DIDARAN et al., 2024; KILIÇ et al., 2023; NIES et al., 2024). Contudo, embora tenha ocorrido uma redução na eficiência da atividade no PSII, isso não se refletiu diretamente na assimilação de CO<sub>2</sub> nas plantas tratadas com *B. subtilis* e Bion<sup>®</sup> (Fig. 5-c).

As plantas podem superar a fotoinibição reparando danos oxidativos, o que exige maior síntese proteica para renovar os componentes afetados (MURATA e NISHIYAMA, 2018; ZAVAFER, 2021). As plantas sob tratamento biológico apresentaram maior incremento no teor de proteínas totais em comparação ao controle inoculado. Além disso, o teor proteico das plantas tratadas com Raiz Performance<sup>®</sup> foi similar a testemunha não inoculada. Essas diferenças podem estar relacionadas com a tentativa de estimular a síntese de proteínas funcionais para reparar os danos ao aparato fotossintético, conforme o observado na literatura (CROCE et al., 2024; SLAMA et al., 2023; JAVED et al., 2022).

Além disso, *B. subtilis*, BioGreen<sup>®</sup> e *T. harzianum* induziram o aumento no teor de proteínas totais, similarmente ao ASM. Esse comportamento, pode estar relacionado com o aumento na produção de proteínas relacionadas a patogênese, na tentativa de induzir a resistência à doença (SANTOS e FRANCO, 2023; LONGSAWARD e VIBOONJUN, 2024; ANISIMOVA et al., 2021).

Apesar de não verificado, a infecção por *Sclerotinia sclerotiorum* pode provocar clorose e reduzir o conteúdo de clorofila nas plantas em estágio infectivo avançado (VITORINO et al., 2020), prejudicando a fotossíntese. Contudo, a aplicação de Bion<sup>®</sup>, Raiz Performance<sup>®</sup> e BioGreen<sup>®</sup> aumentou os níveis de clorofila nas folhas de soja possibilitando incrementar a capacidade fotossintética da planta e a estimular seus mecanismos de defesa contra infecções, conforme sugerido por Chawade et al. (2024).

Os resultados obtidos confirmam que esses produtos alteram significativamente o teor de clorofila, o que pode estar associado à ação promotora de crescimento dos microrganismos presentes nesses produtos (MUN et al., 2024; RIGOBELLO et al., 2024). Além disso, o aumento do índice de clorofila com o uso do ASM pode estar ligado ao estímulo da síntese de ácido glutâmico, um precursor crucial da biossíntese da clorofila (JESPERSEN et al., 2017).

A atividade das enzimas SOD e POX foi analisada para verificar alterações antioxidantes após a inoculação com *S. sclerotiorum*. Curiosamente, observamos uma resposta antioxidante similar em diferentes partes da planta, sugerindo que a modulação

enzimática foi translocada do local de infecção para outras regiões, elevando a defesa antioxidante de maneira sistêmica.

Com isso, verificou-se que a inoculação do patógeno resultou no aumento significativo na atividade da enzima SOD, o que possivelmente indica elevação nos níveis das espécies reativas de oxigênio advindas do processo infectivo.

No caso dos genótipos não tratados, o aumento da atividade dos componentes antioxidantes pode estar relacionado à tentativa de conter o progresso da doença. Contudo, a ineficiência na detoxificação na testemunha inoculada e não tratada, resultou na progressão da lesão formada e aumento no valor da AACPD, o que por sua vez, levaria a morte da planta em períodos posteriores.

Já é reconhecido que, a SOD é o antioxidante enzimático primário nas linhas de defesa contra o estresse oxidativo celular causado por agressões fitopatogênicas (MIERZIAK e WOJTASIK, 2024; KAUR et al., 2022; ZHANG et al., 2021). Corroborando com nossos resultados, Kumar et al. (2024) também associaram que alterar o metabolismo antioxidante durante a infecção pode ser relacionado como uma resposta na indução de resistência do hospedeiro.

A atividade da POX foi mais intensa na cultivar MSOY 6410 inoculada, indicando que uma maior defesa genética do hospedeiro em sinalizar múltiplas vias antioxidantes para conter o avanço da doença. Diversos estudos sugerem que a resposta do hospedeiro ao biocontrole é influenciada pelo BCA empregado, considerando que os metabólitos antimicrobianos podem demonstrar maior eficácia em genótipos específicos, o que pode explicar as variações de comportamento observadas entre as cultivares associadas ao BioGreen® (AYAZ et al., 2023; COLLINGE et al., 2022; SWEANY et al., 2022).

Nossas descobertas indicaram uma correlação positiva para o acúmulo de proteína e negativa para  $F_vF_m$  e SOD com o período de incubação. Sendo assim, quanto maior esse período, houve aumento no teor de proteína e redução da atividade da SOD, enquanto o rendimento fotoquímico primário diminuiu.

Os resultados indicam ainda, que a atividade da SOD aumenta inicialmente após a infecção, com o objetivo de combater o estresse oxidativo causado pelo patógeno, refletindo na tentativa do hospedeiro em controlar os danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio e de regular o equilíbrio redox, como descrito na literatura (TAHERI et al., 2024). Em plantas resistentes, a atividade da enzima tende a diminuir após a contenção da doença pois, nesse estágio, o estresse oxidativo gerado pela infecção

fitopatogênica já foi controlado pela rápida ativação das vias antioxidantes. Assim, o controle rápido da infecção, como uma resposta de resistência, evita a produção contínua das espécies reativas de oxigênio, reduzindo a atividade enzimática elevada (NEHELA et al., 2024). Também foi observado um aumento no teor de proteína, provavelmente relacionado à produção de compostos que ajudam a combater o patógeno ou reparar os danos causados pela infecção.

Um fato intrigante observado foi o surgimento de coloração roxa no local da infecção em resposta à aplicação dos tratamentos com Bion<sup>®</sup>, Raiz Performance<sup>®</sup> e BioGreen<sup>®</sup> (Fig. 04-d). Assim, plantas tratadas apresentaram alterações na coloração típica da infecção, especialmente nas margens das lesões formadas, o que sugere a possibilidade de investigações futuras.

Anteriormente, Singh et al. (2022) relacionaram a pigmentação roxa com depósitos de antocianina, que, ao se acumularem em torno da infecção, restringem o progresso da doença. Outros autores também associaram essa pigmentação a uma resposta de resistência induzida por estresses bióticos e abióticos (DABRAVOLSKI e ISAYENKOV, 2023; SICILIA et al., 2021). Com isso, novos estudos podem ser elaborados para investigar o papel das antocianinas na indução de resistência de plantas a doenças.

Em perspectivas futuras, novos estudos podem ser realizados na tentativa de revalidação da hipótese, objetivando avaliar a modulação antioxidante ao longo do período infectivo, associando-se um maior número de avaliações ao longo do período infectivo.

## 5. CONCLUSÃO

O estudo mostrou que as culturas puras e produtos microbiológicos reduziram o comprimento da lesão e a área sob a curva de progresso da doença, mas essa eficácia não se aplicou a outros parâmetros de quantificação da doença.

Os isolados antagonicos e produtos comerciais mostraram eficácia variável na mitigação dos danos e estímulo ao aparato fotossintético das plantas infectadas. Onde, Raiz Performance<sup>®</sup>, *B. subtilis* e BioGreen<sup>®</sup> se destacaram ao aumentar o teor de clorofila e melhorar parâmetros de trocas gasosas em plantas afetadas pelo patógeno.

A inoculação com *S. sclerotiorum* aumentou significativamente a atividade da enzima SOD e POX em plantas não tratadas, sendo que os diferentes tratamentos reduziram a atividade das enzimas antioxidantes a níveis similares a testemunha não inoculada.

Portanto, por modularem o metabolismo antioxidante de maneira sistêmica e garantirem a sobrevivência do hospedeiro, produtos e isolados microbiológicos foram efetivos em induzir o processo de resistência.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, P.; BALAWI, T. A.; FAIZAN, M. Salicylic Acid's Impact on Growth, Photosynthesis, and Antioxidant Enzyme Activity of *Triticum aestivum* When Exposed to Salt. **Molecules**, v. 28, e100, 2023.

ANISIMOVA, O. K.; SHCHENNIKOVA, A. V.; KOCHIEVA, E. Z.; FILYUSHIN, M. A. Pathogenesis-Related Genes of PR1, PR2, PR4, and PR5 Families Are Involved in the Response to *Fusarium* Infection in Garlic (*Allium sativum* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, e6688, 2021

AYAZ, M.; ALI, Q.; ZHAO, W.; CHI, Y. K, ALI, F.; RASHID, K. A.; CAO, S.; HE, Y-Q.; BUKERO, A. A.; HUANG, W. K.; QI, R. D. Exploring plant growth promoting traits and biocontrol potential of new isolated *Bacillus subtilis* BS2301 strain in suppressing *Sclerotinia sclerotiorum* through various mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, e1444328, 2024.

AYAZ, M.; LI, C.-H.; ALI, Q.; ZHAO, W.; CHI, Y.-K.; SHAFIQ, M.; ALI, F.; YU, X.-Y.; YU, Q.; ZHAO, J.-T.; YU, J. -W.; QI, R. -D.; HUANG, W. -K. Bacterial and Fungal Biocontrol Agents for Plant Disease Protection: Journey from Lab to Field, Current Status, Challenges, and Global Perspectives. **Molecules**, v. 28, e6735, 2023.

BANDARA, A. Y.; WEERASOORIYA, D. K.; BRADLEY, C. A.; ALLEN, T. W.; ESKER, P. D. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. **PLoS One**, v. 15, n. 4, e0231141, 2020.

BARRO, J.; MEYER, M. C.; GODOY, C.; DIAS, A. R.; UTIAMADA, C.; JACCOUD-FLIHO, D. DE S.; WRUCK, D. S. M.; BORGES, E. P.; SIQUERI, F.; JULIATTI, F. C.; CAMPOS, H. D.; JUNIOR, J. J.; CARNEIRO, L. C.; DA SILVA, L. H. C. P.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; ZITO, R. K.; FURLAN, S. H.; VENANCIO, W. S.; DEL PONTE, E. M. Performance and profitability of fungicides for managing soybean white mold: a 10-year summary of cooperative trials. **Plant Disease**, v. 103, p. 2212-2220, 2019.

BEKTAS, Y.; EULGEM, T. Synthetic Plant Defense Elicitors. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, e804, 2014.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M. **Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: proposta metodológica. Comunicado Técnico 59.** Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/239978/1/Bettiol-Controle-qualidade-2022-2.pdf>>. Acesso em: 14 Abril 2023.

BHARATH, P.; GAHIR, S.; RAGHAVENDRA, A. S. Abscisic acid-induced stomatal closure: An important component of plant defense against abiotic and biotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021, 324.

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

BROETTO, F. **Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas.** [Recurso Eletrônico]/ Coordenador: Fernando Broetto – Botucatu: IBB, Cultura. Acadêmica, UNESP, São Paulo, 2014. 92p.

CHAWADE, A.; THURAGA, V.; SEPP, S. S.; GHOSH, S.; GHADAMGAHI, F.; ODILBEKOV, F.; MUTHUSAMY, S.; VETUKURI, R.; R.; ABREHA, K. B. Genomic loci for sclerotinia stem rot resistance and chlorophyll stability in *Brassica napus*: integrating GWAS with microbiome insights. **bioRxiv**, Pré-Prova, Manuscrito Aceito, e608782, 2024.

CHUN, L.; QINGPAN, Z.; YUZHU, H.; ZHOU, X.; HONGWEI, X. Effects of *Bacillus subtilis* on Cucumber Seedling Growth and Photosynthetic System under Different Potassium Ion Levels. **Biology**, v. 13, n. 5, e348, 2024.

COLLINGE, D. B.; JENSEN, D. F.; RABIEY, M.; SARROCCO, S.; SHAW, M. W.; SHAW, R. H. Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction?. **Plant Pathology**, v. 71, n. 5, p. 1024-1047, 2022.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 12, safra 2024/25, n. 1 primeiro levantamento, outubro 2024.

CROCE, R.; CARMO-SILVA, E.; CHO, Y. B.; ERMAKOVA, M.; HARBINSON, J.; LAWSON, T.; MCCORMICK, A. J.; ORT, D. R.; PATEL-TUPPER, D.; PESARESI, P.; RAINES, C.; WEBER, A. P. M.; ZHU, X. -G. Perspectives on improving photosynthesis to increase crop yield. **The Plant Cell**, v. 36, p. 3944-3973, 2024.

DABRAVOLSKI, S. A.; ISAYENKOV, S. V. The Role of Anthocyanins in Plant Tolerance to Drought and Salt Stresses. **Plants**, v. 12, e2558, 2023.

DANIEL, A. I.; BASSON, G.; KEYSTER, M.; KLEIN, A.; GOKUL, A. Molecular mechanism of oxalic acid synthesis as virulence factor of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 134, e102412, 2024.

DEL RIO, L. E., KURTZWEIL, N. C., AND GRAU, C. R. Petiole inoculation as a tool to screen soybean germ plasm for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. (Abstr.) **Phytopathology**, v. 91, e176, 2001.

DIDARAN, F.; KORDSOTAMI, M.; GHASEMI-SOLOKLUI, A. A.; PASHKOVSKIY, P.; KRESLAVSKI, V.; KUZNETSOV, V.; ALLAKHVERDIEV, S. I. The mechanisms of photoinhibition and repair in plants under high light conditions and interplay with abiotic stressors, **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 259, e113004, 2024.

DUO, H.; YIN, M.; WANG, R. Molecular mechanisms of resistance and future perspectives in plant breeding strategies against *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Crops**, v. 2, e100046, 2025.

EGAMBERDIEVA, D.; ESHBOEV, F.; SHUKUROV, O.; ALAYLAR, B.; ARORA, N. K. Bacterial Bioprotectants: Biocontrol Traits and Induced Resistance to Phytopathogens. **Microbiological Resistance**, v. 14, p. 689-703, 2023.

FAGUNDES-NACARATH, I. R. F.; DEBONA, D.; RODRIGUES, F. A. Oxalic acid-mediated biochemical and physiological changes in the common bean-*Sclerotinia sclerotiorum* interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 129, p. 109-121, 2018a.

FAGUNDES-NACARATH, I. R. F.; DEBONA, D.; OLIVEIRA, A. T. H.; HAWERROTH, C.; RODRIGUES, F. A. Biochemical responses of common bean to white mold potentiated by phosphites. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, p. 308-319, 2018b.

FENG, B.; DING, C.; LI, P.; FU, L. Combined application of the endophyte *Bacillus* K1 and sodium dehydroacetate alleviates postharvest gray mold in grapes. **Food Microbiology**, v. 125, e104637, 2025.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects Split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FIETZ, C. R.; FISCH, G. F.; COMUNELLO, E.; FLUMIGNAN, D. L. **O clima da região de Dourados, MS**. Dourados, Embrapa Agropecuária Oeste. 31p. (Série Documentos, 138), 2017.

FONSECA, M. DE C.; BOSSOLANI, J. W.; OLIVEIRA, S. L.; MORETTI, L. G.; PORTUGAL, J. R.; SCUDELETTI, D.; OLIVEIRA, E. F.; CRUSCIOL, C. A. C. *Bacillus subtilis* Inoculation Improves Nutrient Uptake and Physiological Activity in Sugarcane under Drought Stress. **Microrganisms**, v. 10, e809, 2022.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 839-863, 2013.

FUSCO, G.; MINELLI, A. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. **The Royal Society**, v. 365, p. 547-557, 2010.

GAO, H.; GUO, M.; SONG, J.; MA, Y.; XU, Z. Signals in systemic acquired resistance of plants against microbial pathogens. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 4, p. 3747-3759, 2021.

GÓMEZ-GODÍNEZ L. J.; AGUIRRE-NOYOLA, J. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ARTEAGA-GARIBAY, R. I.; IRETA-MORENO, J.; RUVALCABA-GÓMEZ, J. M. A Look at Plant-Growth-Promoting Bacteria. **Plants**, v. 12, n. 8, e1668, 2023.

GOZZO, F.; FAORO, F. Systemic Acquired Resistance (50 Years after Discovery): Moving from the Lab to the Field. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12473-12491, 2013.

HASAN, M.; HOSSAIN, M.; JIANG, D. New endophytic strains of *Trichoderma* promote growth and reduce clubroot severity of rapeseed (*Brassica napus*). **PLoS One**, v. 18, n. 10, e0287899, 2023.

HENG-XU, W.; HAO, H.; TIAN-YOU, Z.; ZHAO-QING, Z.; WEN-YING, Z. *Trichoderma gamsii* strain TC959 with comprehensive functions to effectively reduce seedling damping-off and promote growth of pepper by direct and indirect action mechanisms **Journal of Integrative Agriculture**, Pré-Prova, Manuscrito Aceito, 2024.

HOSSAIN, M. M.; SULTANA, F.; LI, W.; TRAN, L.-S. P.; MOSTOFA, M. G. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the Pathogenomic Features of a Global Pathogen. **Cells**, v. 12, e1063, 2023.

ISLAM, T.; TAMANNA, N. T.; MATIN, M. N.; BARAI, H. R.; HAQUE, M. A. Resistance Mechanisms of Plant Pathogenic Fungi to Fungicide, Environmental Impacts of Fungicides, and Sustainable Solutions. **Plants**, v. 13, n. 19, e2737, 2024.

JANGIR, M.; SHARMA, S.; SHARMA, S. Development of next-generation formulation against *Fusarium oxysporum* and unraveling bioactive antifungal metabolites of biocontrol agents. **Scientific Reports**, v. 11, e22895, 2021.

JAVED, A.; AHMAD, N.; AHMED, J.; HAMEED, A.; ASHRAF, M. A.; ZAFAR, S. A.; MAQBOOL, A.; AL-AMRAH, H.; ALATAWI, H. A.; AL-HARBI, M. S.; ALI, E. F. Grain yield, chlorophyll and protein contents of elite wheat genotypes under drought stress. **Journal of King Saud University**, v. 34, e102279, 2022.

JESPERSEN, D.; YU, J.; HUANG, B. Metabolic Effects of Acibenzolar-S-Methyl for Improving Heat or Drought Stress in Creeping Bentgrass. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, e01224, 2017.

JIA, S.; SONG, C.; DONG, H.; YANG, X.; LI, X.; JI, M.; CHU, J. Evaluation of efficacy and mechanism of *Bacillus velezensis* CB13 for controlling peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, e1111965, 2023.

KAPPEL, L.; YU, L.; ESCOBAR, C.; MARCIANÒ, D.; SRIVASTAVA, V.; BULONE, V.; GRUBER, S. A comparative cell wall analysis of *Trichoderma* spp. confirms a conserved polysaccharide scaffold and suggests an important role for chitosan in mycoparasitism. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 8, e0349523, 2024.

KAUR, S.; SAMOTA, M. K.; CHOUDHARY, M.; CHOUDHARY, M.; PANDEY, A. K.; SHARMA, A.; THAKUR, J. How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 28, n. 2, p. 485-504, 2022.

KILIÇ M.; KÄPYLÄ, V.; GOLLAN, P. J.; ARO, E. M., RINTAMÄKI E. PSI Photoinhibition and Changing CO<sub>2</sub> Levels Initiate Retrograde Signals to Modify Nuclear Gene Expression. **Antioxidants**, v. 12, n. 11, e1902, 2023.

KUMAR, S.; SHUKLA, V.; TRIPATHI, Y. N.; AAMIR, M.; DIVYANSHU, K.; YADAV, M.; UPADHYAY, R. S. Biochemical changes, antioxidative profile, and efficacy of the bio-stimulant in plant defense response against *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Heliyon**, v. 10, n. e23030, 2024.

LONGSAWARD, R.; VIBOONJUN, U. Genome-wide identification of rubber tree pathogenesis-related 10 (PR-10) proteins with biological relevance to plant defense. **Scientific Reports**, v. 14, e1072, 2024.

MARTINEZ, Y.; RIBERA, J.; SCHWARZE, F. W. M. R. DE FRANCE, K. Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, p. 5595–5612, 2023

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence—A practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MCDONALD, B. A.; STUKENBROCK, E. H. Rapid emergence of pathogens in agroecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 371, n. 1709, e371, 2016.

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; SATO, L. N.; CHAGAS, D. F.; SCHIPANSKI, C. A.; GALDINO, J. V.; SENGER, M.; BRUSTOLIN, R.; PIZOLOTTO, C. A.; DIAS, A. R.; NUNES JUNIOR, J.; LOBO JUNIOR, M.; TORMEN, N. R.; JULIATTI, F. C.; MARTINS, M. C.; SOUZA, T. P. de; OLIVEIRA, M. C. N. de. **Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2021/2022: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos**. Embrapa Soja. Circular técnica 189, 14 p. 2022.

MIERZIAK, J.; WOJTASIK, W. Epigenetic weapons of plants against fungal pathogens. **BMC Plant Biology**, v. 24, e175, 2024.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2024. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br>. Acesso em: 4 nov. 2024.

MUN, B. G.; HUSSAIN, A.; PARK, Y. G.; KANG, S. M.; LEE, I. J.; YUN, B. W. The PGPR *Bacillus aryabhatai* promotes soybean growth via nutrient and chlorophyll maintenance and the production of butanoic acid. **Frontiers in Plant Science**, v. 19, n. 15, e1341993, 2024.

MURATA, N.; NISHIYAMA, Y. ATP is a driving force in the repair of photosystem II during photoinhibition. **Plant, Cell & Environment**, v. 41, p. 285-299, 2018.

NAZAR, R.; UMAR, S.; KHAN, N. A.; SAREER, O. Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress. **South African Journal of Botany**, v. 98, p. 84-94, 2015.

NEHELA, Y.; MAZROU, Y. S. A.; EL-GAMMAL, N. A.; ATALLAH, O.; XUAN, T. D.; ELZAAWELY, A. A.; LZAHABY, H. M.; ABDEL RHIM, A. S.; BEHIRY, S. I.; HAFEZ, E. M. MAKHLOUF, A. H.; HUSSAIN, W. A. M. Non-proteinogenic amino acids mitigate oxidative stress and enhance the resistance of common bean plants against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, e1385785, 2024.

NIES, T.; MATSUBARA, S.; EBENHÖH, A. A mathematical model of photoinhibition: exploring the impact of quenching processes. **Silico Plants**, v. 6, n. 1, e001, 2024.

OLIVEIRA, B. T. M.; DOURADO, T. M. H.; SANTOS, P. W. S.; BITENCOURT, T. A.; TIRAPELLI, C. R.; COLOMBO, A. L.; ALMEIDA, F. Extracellular Vesicles from *Candida haemulonii* var. vulnera Modulate Macrophage Oxidative Burst. **Journal of Fungi**, v. 9, e562, 2023.

PHILIP, B.; BEHIRY, S. I.; SALEM, M. Z. M.; AMER, M. A.; EL-SAMRA, I. A.; ABDELKHALEK, A.; HEFLISH, A. *Trichoderma afroharzianum* TRI07 metabolites

inhibit *Alternaria alternata* growth and induce tomato defense-related enzymes. **Scientific Reports**, v. 14, e1874, 2024.

RAMLAL, A.; MEHTA, S.; NAUTIYAL, A.; BAWEJA, P.; SHARMA, D.; LAL, S.K.; VIJAYAN, R.; RAJU, D.; SUBRAMANIAM, S.; RAJENDRAN, A. Androgenesis in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): a critical revisit. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 60, p. 1–15, 2024.

RAMLAL, A.; NAUTIYAL, A.; BAWEJA, P.; KUMAR, V.; MEHTA, S.; MAHTO, R. K.; TRIPATHI, S.; SHANMUGAM, A.; MALLIKARUJUNA, B. P.; RAMAN, P.; LAL, S. K.; RAJU, D.; RAJENDRAN, A. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides and isoflavonoids from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Frontiers in Nutrition**, v. 9, e1068388, 2022.

RIGOBELLO, E.C.; DE CARVALHO, L. A. L.; SANTOS, C. H. B.; FREZARIN, E. T.; PINHEIRO, D. G.; NICODEMO, D.; BABALOLA, O. O.; DESOIGNIES, N. Growth promotion and modulation of the soybean microbiome INTACTA RR PRO with the application of the fungi *Trichoderma harzianum* and *Purpureocillium lilacinum*. **Scientific Reports**, v. 14, e21004, 2024.

RISEH, R. S.; VAZVANI, M. G. Unveiling Methods to Stimulate Plant Resistance against Pathogens. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 29, n. 5, e188, 2024.

ROSSI, M.; BORROMEO, I.; CAPO, C.; GLICK, B.R.; DEL GALLO, M.; PIETRINI, F.; FORNI, C. PGPB Improve Photosynthetic Activity and Tolerance to Oxidative Stress in *Brassica napus* Grown on Salinized Soils. **Applied Sciences**, v. 11, e11442, 2021.

SAKATA, N.; ISHIGA, T.; TANIGUCHI, S.; ISHIGA, Y. Acibenzolar-S-Methyl Activates Stomatal-Based Defense Systemically in Japanese Radish. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, e565745, 2020.

SANTOS, C. DOS; FRANCO, O. L. Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. **Plants**, v. 12, e2226, 2023.

SANTOSO, I.; FADHILAH, Q. G.; MARYANTO, A. E.; YUNIATI, R.; PUTRI, A. S.; TAMRELA, H.; SUGIYANATO, A.; SIGAR, I. M. *Stenotrophomonas maltophilia* G17: Potential antifungal agent isolated from the gut of black soldier fly larvae against *Ganoderma boninense*. **Kuwait Journal of Science**, v. 52, N. 1, e100309, 2025.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SICILIA, A.; CATARA, V.; SCIALÒ, E.; LO PIERO, A. R. Fungal Infection Induces Anthocyanin Biosynthesis and Changes in DNA Methylation Configuration of Blood Orange [*Citrus sinensis* L. (Osbeck)]. **Plants**, v. 10, n. 244, 2021.

SINGH, M.; AVTAR, R.; LAKRA, N.; PAL, A.; SINGH, V. K.; PUNIA, R.; KUMAR, N.; BISHNOI, M.; KUMARI, N.; KHEDWAL, R. S.; CHOUDHARY, R. R. Early oxidative burst and anthocyanin-mediated antioxidant defense mechanism impart resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in Indian mustard. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 120, e101847, 2022.

SLAMA, V.; CUPELLINI, L.; MASCOLI, V.; LIGUORI, N.; CROCE, R.; MENNUCCI, B. Origin of low-lying red states in the Lhca4 light-harvesting complex of photosystem I. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 37, p. 8345-8352, 2023.

SOMMER, R. J. Phenotypic Plasticity: From Theory and Genetics to Current and Future Challenges. **Genetics**, v. 125, n. 1, p. 1-13, 2020.

SWEANY, R. R.; DEROBERTIS, C. D.; KALLER, M. D.; DAMANN K. E. JR. Intraspecific Growth and Aflatoxin Inhibition Responses to Atoxigenic *Aspergillus flavus*: Evidence of Secreted, Inhibitory Substances in Biocontrol. **Phytopathology**, v. 112, n. 10, p. 2084-2094, 2022.

TAHERI, P.; HOSSEINI-ZAHANI, F.; TARIGHI, S. Binucleate *Rhizoctonia* induced tomato resistance Against *Rhizoctonia solani* via affecting antioxidants and cell wall reinforcement. **Heliyon**, v. 10, e27881, 2024.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Production, Supply and Distribution (PSD) on line.** Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em: 18 out. 2024

VENTUROSOSO, L. R. **Implicações da inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em culturas bioenergéticas.** 2012. 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

VITORINO, L. C.; SILVA, F. O. de.; CRUVINEL, B. G.; BESSA, L. A.; ROSA, M.; SOUCHIE, E. L.; SILVA, F. G. Biocontrol Potential of *Sclerotinia sclerotiorum* and Physiological Changes in Soybean in Response to *Butia archeri* Palm Rhizobacteria. **Plants**, v.9 n. 1, e64, 2020.

WILLBUR, J. F.; MITCHELL, P. D.; FALL, M. L.; BRYNE, A. M.; CHAPMAN, S. A.; FLOYD, C. M.; BRADLEY, C. A.; AMES, K. A.; CHILVES, M. I.; KLECZEWSKI, N. M.; MALVICK, D. K.; MUELLER, B. D.; MUELLER, D. S.; KABBAGE, M.; CONLEY, S. P.; SMITH, D. L. Meta-Analytic and Economic Approaches for Evaluation of Pesticide Impact on *Sclerotinia* Stem Rot Control and Soybean Yield in the North Central United States. **Phytopathology**, v. 107, n. 7, p. 1157-1170, 2019.

WU, P. H.; CHANG, H. X.; SHEN, Y. M. Effects of synthetic and environmentally friendly fungicides on powdery mildew management and the phyllosphere microbiome of cucumber. **PLoS One**, v. 18, n. 3, e0282809, 2023.

XU, J.; XU, Y.; WANG, Y.; LV, Z.; LIU, X.; SUN, W.; MANZOOR, M. A.; LIU, R.; WANG, S.; JIU, S.; ZHANG, C. Exogenous Salicylic Acid Improves Photosynthetic and Antioxidant Capacities and Alleviates Adverse Effects of Cherry Rootstocks Under Salt Stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 1428-1446, 2023.

XU, J.; ZHANG, Y.; REN, J.; KONG, Q. An atoxigenic *Aspergillus flavus* PA67 from Shandong province exhibits potential in biocontrol against toxigenic *Aspergillus flavus*, *Sclerotium rolfsii*, and *Fusarium proliferatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 426, n. 2, e110918, 2025.

YANG, C.; ZHANG, Z.; GAO, H.; LIU, M.; FAN, X. Mechanisms by which the infection of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary affects the photosynthetic performance in tobacco leaves. **BMC Plant Biology**, v. 14, e240, 2014.

YANG, H.; LUO, P. Changes in Photosynthesis Could Provide Important Insight into the Interaction between Wheat and Fungal Pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, e8865, 2021.

YANG, M.; ZHANG, W.; LV, Z.; SHI, L.; GE, B. Evaluation of the inhibitory effects of Wuyiencin, a secondary metabolite of *Streptomyces albulus* CK-15, against *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. **Plant Disease**, v. 106, p. 156–164, 2022.

YANG, S.; LI, X.; CHEN, W.; LIU, T.; ZHONG, S.; MA, L.; ZHANG, M.; ZHANG, H.; YU, D.; LUO, P. Wheat resistance to fusarium head blight is associated with changes in photosynthetic parameters. **Plant Disease**, v. 100, 847–852, 2016.

YAO, X.; GUO, H.; ZHANG, K.; ZHAO, M.; RUAN, J.; CHEN, J. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. **Frontiers on Microbiology**, v. 14, e1160551, 2023

ZAVAFER, A. A theoretical framework of the hybrid mechanism of photosystem II photodamage. **Photosynthesis Research**, v. 149, p. 107-120, 2021.

ZEIER, J. Metabolic regulation of systemic acquired resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 62, e102050, 2021.

ZHANG, J.; WU, X.; ZHANG, X.; PAN, H.; SHEARER, J. E. S.; ZHANG, H.; SUN, F. Zn<sup>2+</sup> dependent enhancement of Atrazine biodegradation by *Klebsiella variicola* FH-1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, e125112. 2021.

ZHU, Y.; WU, C.; DENG, Y.; YUAN, W.; ZHANG, T.; LU, J. Recent advances in virulence of a broad host range plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*: a mini-review. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, e1424130, 2024.

ZIANE, S. O.; IMEHLI, Z.; TALIBI, Z. EL A.; KORAICHI. S. I.; MEDDICH, A.; MODAFAR, C. EL. Biocontrol of tomato Verticillium wilt disease by plant growth-promoting bacteria encapsulated in alginate extracted from brown seaweed. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 276, n. 1, e133800, 2024.

ZÚÑINGA-SILVESTRE, C. A.; DE-LEÓN-GARCÍA-DE-ALBA, C.; AYALA-ESCOBAR, V.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, V. A. Induced resistance to common rust (*Puccinia sorghi*), in maize (*Zea mays*). **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 32, n. 1, p. 11-18, 2020.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho mostraram que a hipótese inicial, de que as formulações comerciais seriam mais eficazes no biocontrole *in vitro* e na indução de resistência, foi parcialmente confirmada. Ambas as formas aplicáveis se mostraram eficazes no controle de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro*, com destaque para Raiz Performance<sup>®</sup> e BioGreen<sup>®</sup>, que reduziram o crescimento micelial. No entanto, houve variações no biocontrole em relação aos isolados do fitopatógeno. Em último caso, os antagonistas fúngicos afetaram a esclerogênese, o que possibilita a utilização desses tratamentos com o objetivo de reduzir a carga de inoculo presente no solo dificultando o estabelecimento de novas epidemias.

Em se tratando da indução de resistência, apesar de efetivos no biocontrole, não foi possível distinguir diferenças entre isolados microbiológicos e formulações comerciais em reduzir a lesão e a AACPD. Contudo, o metabolismo fotossintético das plantas tratadas com *B. subtilis* e BioGreen<sup>®</sup> apresentou incremento ao final do período experimental. Portanto, esses tratamentos podem ser utilizados em protocolos de manejo integrado da doença em áreas afetadas pelo mofo branco, objetivando reduzir a severidade da infecção por *S. Sclerotiorum* e estimular o crescimento das plantas, principalmente, nas fases iniciais do ciclo de desenvolvimento da soja.

Por fim, produtos e isolados microbiológicos modularam o metabolismo antioxidante de forma sistêmica, restringindo o progresso da doença e, conseqüentemente, a atividade fitopatogênica, por induzir a resistência das plantas de soja ao mofo branco.

## 5. ANEXOS

**APÊNDICE A.** Resultados da ANOVA (*p*-valor) sob influência de compostos voláteis de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* ou produtos microbiológicos no controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Ensaio	Fontes de variação	Isolados fitopatogênicos			
		DC 18		PS 16	
		<i>p</i> -valor	CV (%)	<i>p</i> -valor	CV (%)
Volátil	12 HAI	0,03	7,78	0,004	6,18
	24 HAI	0,0428	7,73	0,0008	5,86
	36 HAI	0,0179	8,33	0,0002	8,66
	48 HAI	0,0074	7,34	0,0006	11,37
	60 HAI	0,0107	7,07	0,0001	11,41
	72 HAI	0,0538	4,83	<0,0001	9,75
	84 HAI	0,4362	2,28	-	-
	IVCM	0,0257	8,61	<0,0001	7,53
	AACCM	0,0081	9,81	0,0001	18,13
	Tempo para esclerogênese	0,3055	50,65	0,0882	117,57
	Quantidade formada	0,0002	27,73	0,0899	71,63
	Massa total	0,0356	53,3	0,174	143,15
Difusível	12 HAI	<0,0001	19,96	0,1478	8,96
	24 HAI	0,0003	18,28	0,1533	5,87
	36 HAI	0,0003	8,77	0,0095	5,32
	48 HAI	0,0012	6,07	0,0007	4,67
	60 HAI	0,0013	3,86	0,0002	5,09
	72 HAI	0,0031	3,99	0,0056	6,35
	84 HAI	<0,0001	2,27	-	-
	IVCM	0,0001	6,76	0,0022	4,28
	AACCM	0,0009	10,01	0,005	8,78
	Tempo para esclerogênese	0,0393	31,23	<0,0001	47,73
	Quantidade formada	<0,0001	14,83	0,0008	47,19
	Massa total	<0,0001	14,95	0,0012	65,58

HAI: horas após a incubação; IVCM: índice de velocidade de crescimento micelial; AACCM: área abaixo da curva para o crescimento micelial.

**APÊNDICE B.** Resultados da ANOVA (*p*-valor) dos efeitos isolados e de interação das cultivares e da aplicação de antagonistas em plantas de soja infectadas com mofo branco em relação a patometria.

Fontes de variação	Lesão	AACPD	Severidade	ID	Periodo de incubação
Cultivares	0,1437	0,0165	0,3290	0,4357	0,8722
Antagonistas	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002
<i>Cultivares x Antagonistas</i>	0,8152	0,6588	0,9260	0,8995	0,9919
CV (%)	31,26	75,49	50,22	42,92	27,74

AACPD: área abaixo da curva de progresso da doença; ID: índice da doença.

**APÊNDICE C.** Resultados da ANOVA (*p*-valor) dos efeitos isolados e de interação das cultivares e da aplicação de antagonistas em plantas de soja infectadas com mofo branco em relação aos parâmetros fisiológicos.

	Períodos de avaliação									
	3 dias			5 dias						7 dias
Fontes de variação	<i>A</i>	<i>A/Ci</i>	<i>EUA</i>	<i>A</i>	<i>A/Ci</i>	<i>Ci</i>	<i>gs</i>	<i>E</i>	<i>F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub></i>	<i>SPAD</i>
Volatil	0,0658	0,8292	0,0034	0,0841	0,2182	0,0002	0,7436	0,4767	0,6865	0,0317
Antagonistas	0,0002	0,0285	<0,0001	0,0123	0,0340	<0,0001	0,0537	0,0042	<0,0001	0,0220
<i>Cultivares x Antagonistas</i>	0,0005	0,0010	0,0004	0,4454	0,1579	0,0000	<0,0001	<0,0001	0,0045	0,2556
CV (%)	45,75	60,46	44,38	29,44	32,03	8,17	22,27	16,84	4,73	7,99

A: taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); A/Ci: eficiência intrínseca de carboxilação da Rubisco (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); EUA: eficiência instantânea do uso da água (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>/mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); Ci: concentração interna de CO<sub>2</sub> (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); gs: condutância estomática (mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); E: transpiração (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub>: eficiência quântica potencial; SPAD: índice de clorofila,

**APÊNDICE D.** Resultados da ANOVA (*p*-valor) dos efeitos isolados e de interação das cultivares e da aplicação de antagonistas em plantas de soja infectadas com mofo branco em relação a atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo proteico.

Fontes de variação	SOD (folha)	POX (folha)	Proteína (folha)	SOD (caule)	POX (caule)	Proteína (Caule)
Cultivares	0,0707	0,0558	0,0720	0,0707	0,0558	0,0720
Antagonistas	0,0017	0,0031	0,0009	0,0017	0,0031	0,0009
<i>Cultivares x Antagonistas</i>	0,2809	0,0312	0,3042	0,2809	0,0312	0,3042
CV (%)	7,41	18,97	6,63	7,41	18,97	6,63

SOD: superóxido dismutase; POX: peroxidase.