

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS – CAMPUS DE CURITIBANOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS
AGRÍCOLAS E NATURAIS

**FUNGOS DE SOLO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
FITOPATÓGENOS**

Curitibanos
2019

Pedro Henrique da Silva Medrado

**FUNGOS DE SOLO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
FITOPATÓGENOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais (PPGEAN) da Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Terumi Itako

Coorientador: Prof. Dr. João B. Tolentino Junior

Curitibanos
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Medrado, Pedro Henrique da Silva
Fungos de solo no controle biológico de
fitopatógenos / Pedro Henrique da Silva Medrado ;
orientadora, Adriana Terumi Itako, coorientador,
João Batista Tolentino Junior, 2019.
103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós
Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais,
Curitibanos, 2019.

Inclui referências.

1. Ecossistemas Agrícolas e Naturais. 2. Controle
biológico. 3. Ecologia de fungos. 4. Fitopatologia.
5. Microbiologia agrícola. I. Itako, Adriana Terumi.
II. Tolentino Junior, João Batista. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais.
IV. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS E NATURAIS - PPGEAN

Termo de aprovação

FUNGOS DE SOLO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

Por

PEDRO HENRIQUE DA SILVA MEDRADO

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração Ciências Agrárias, no Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina, pela Comissão formada pelos membros:

Adriana Terumi Itako

Dra. Adriana Terumi Itako – UFSC
Presidente e orientadora

Leosane Cristina Bosco

Dra. Leosane Cristina Bosco – UFSC

Katja Regina Freitas Schwan Estrada

Dra. Katia Regina Freitas Schwan Estrada – UEM
(Participação por videoconferência)

Curitibanos, 19 de fevereiro de 2019.

Este trabalho é dedicado à
minha mãe, Maria.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria das Graças e José Alexandre, pelo incentivo, sabedoria e exemplo dados a mim na busca por uma educação de qualidade e transformadora, me ensinando sempre sobre a coragem de seguir em frente e a beleza dos resultados alcançados.

À minha avó Josemira Medrado, pelo amor, carinho e suporte dados durante todo o percurso; e às minhas irmãs Tatiana Medrado e Tassilvana Medrado, por compartilharem comigo toda a alegria e a certeza de que somos fortes quando temos uns aos outros.

Às minhas sobrinhas Vitória e Nicolle, por me darem esperança de que uma geração forte, determinada e destemida fará a diferença no futuro.

Às minhas amigas Isaura Castro, Solange Dourado e Júnia Tercilia, com quem compartilho uma vida de acontecimentos incríveis, com muito amor, cuidado e empatia.

Aos colegas que se tornaram amigos, André Graf, Fauzer Panissa, Rodrigo Nicolao, Liandra Kulika, Alexandre França e Fernanda Benedet pelos momentos de aprendizado compartilhados dentro e fora da universidade.

À minha querida orientadora Adriana Itako, pelo conhecimento e incentivo dados durante toda a pesquisa, sempre com um sorriso no rosto, me mostrando que nos momentos mais difíceis a alegria é a melhor forma de distração; e ao meu coorientador João Tolentino por ter me guiado no processo de investigação estatística e metodológica para a realização do trabalho.

Aos queridos membros da banca avaliadora, Professora Dr^a. Katia Estrada e Professora Dr^a. Leosane Bosco, por toda a paciência, dedicação e auxílio dados a mim durante a defesa.

Aos educadores que tive na minha jornada, Ana Mapeli, Florisvalda Santos, Júlia Niemeyer e todo o corpo docente do PPGEAN-UFSC, que mesmo sem saber, são responsáveis por grande parte da minha vontade de me tornar um Professor e despertar a curiosidade das pessoas através da investigação do conhecimento.

A todos os funcionários da UFSC-Curitiba e terceirizados por permitir um ambiente de trabalho saudável e alegre.

Por fim, agradeço à CAPES e FAPESC pelo auxílio financeiro dado em forma de bolsa para que a pesquisa pudesse ser desenvolvida.

“Vida e terra evoluem conjuntamente.”
Leon Croizat, 1894-1982.

RESUMO

Os Fungos são microrganismos responsáveis por desempenharem uma variedade de processos ecossistêmicos importantes como decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, além de atuarem como mantenedores basais das funções dos ecossistemas em conjunto com outros microrganismos e macro-invertebrados do solo. Possuem uma complexa habilidade de adaptação ao ambiente e contam com mecanismos bioquímicos e morfológicos que norteiam suas interações ecológicas, das quais podem ser destacadas a necessidade por compostos inorgânicos para o seu completo desenvolvimento e a manutenção, a níveis mínimos, dos fitopatógenos do solo em um ecossistema natural, em virtude do grande potencial como controladores biológicos de outros microrganismos. Dessa forma, o presente trabalho visa avaliar a influência de aspectos físico-químicos do solo de três diferentes ecossistemas na comunidade de fungos, e verificar a capacidade de atuarem como controladores biológicos dos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfii* e *Sclerotium cepivorum*. Para isso, foram realizadas coletas de 17 amostras de solo no município de Brunópolis, SC, englobando solos sob plantio de soja, pastagem e mata nativa. Além das análises físico-químicas, as amostras também foram utilizadas para o preparo da diluição seriada utilizada para quantificação do número de unidades formadoras de colônias fúngicas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 17 tratamentos e 4 repetições para dois meios de cultura distintos, BDA e V8. Para o plaqueamento foram utilizadas alíquotas de 0,25 mL de solução de solo na diluição 10^{-2} , com antibiótico. As placas foram armazenadas em estufa BOD a 25°C e 12 h de fotoperíodo por quatro dias antes de serem realizadas as contagem dos números de colônias fúngicas. As mesmas placas foram utilizadas como fonte de obtenção dos inóculos que seriam isolados para o teste de controle biológico. A comparação da composição química do solo e a quantidade de UFCs entre os três ecossistemas foi realizada através da análise de variância e as variáveis significativas submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância. De todos os isolados fúngicos obtidos, 150 tiveram sua eficiência qualitativa e quantitativa avaliados quanto ao potencial como controladores biológicos dos fitopatógenos. Para cada fungo fitopatogênico foram separados grupos de acordo com o tipo de controle biológico exercido e as avaliações diárias do crescimento micelial foi utilizada para a geração dos índices de velocidade do crescimento micelial e da área abaixo da curva de crescimento micelial,

posteriormente transformados em percentuais de inibição. Foram realizadas as análises de variância para todos os índices e os PIC da velocidade e da área foram agrupados pelo teste de média Scott-Knott a 5% de significância. Os resultados indicaram baixos valores de correlação entre as características físico-químicas do solo com a densidade de fungos para as três áreas. Entretanto, os testes de controle biológico mostraram que de todos os fungos avaliados, 95% foram considerados controladores de *S. cepivorum*, 86% controladores de *S. sclerotiorum* e cerca de 30% deles efetivos no controle de *S. rolfsii*.

Palavras-chave: Biocontrole. Ecologia de Fungos. *Sclerotinia sclerotiorum*.

ABSTRACT

Fungi are microorganisms responsible for developing a variety of important ecosystem processes, such as decomposing organic matter, and nutrient cycle, as well as being the primary maintainers of ecosystem functions altogether with other microorganisms and invertebrates from soil. They possess a complex ability to adapt to the environment and have morphological and biochemical mechanisms responsible to lead their ecological interactions, which include the needs for inorganic compounds to their growth and the maintenance, to lower levels, of the soil borne diseases towards their potential to act as a biological control of other microorganisms. Therefore, the purpose of this research was to evaluate the influence of physicochemical characteristics of three different ecosystems on the soil fungi community, as well as the capacity to act as a biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotium cepivorum*. In order to achieve that, we collected 17 samples of soil in Brunópolis – SC, that encompass three different systems of land use, soybean plantation, pasture and native forest. In addition to the physicochemical analyses, samples were also used to prepare the serial dilution to quantify the number of fungi colony forming unities. Experiments were run in a completely randomized design with 17 treatments and four repetitions to two different culture media, PDA and V8. An aliquot of 0.25ml of soil solution in the 10^{-2} concentration, with antibiotics, was placed in the Petry dishes. The dishes were then, left in a BOD sprouting camera with 25°C and 12h of photoperiod for four days prior to the evaluation of the number of fungi colony forming units. Furthermore, the same dishes were used to obtain the inoculum that was isolated to further uses on the biocontrol tests. Comparison between the chemical composition of the soil and the amount of CFUs amongst the three ecosystems were done by a variance analysis and for those that revealed statistical differences we ran a Tukey median test with 5% of significance. Of all strains isolated, 150 had their qualitative and quantitative efficiency tested with regards to their biocontrol potential against the plant pathogens. For each phytopathogenic fungus, two groups were separated according to the type of biocontrol applied, and the daily measurements of the micelial growth were applied to the micelial growth and area under the curve of micelial growth equations, and later than, transformed into the inhibition percentages. Variance analyses were run for all index and the percentages of micelial growth, with the latter being posteriorly submitted to the grouping method of the

Scott-Knott median test with 5% of significance. Our results showed low values of a correlation between the physicochemical characteristics of the soil with its fungi CFUs for neither of the areas. However, regarding the tests of biocontrol, we found out that from all fungi tested against the three plant pathogenic fungi, 95% were considered efficient against *S. cepivorum*, 86% to *S. sclerotiorum*, and 30% of them had negatively influenced the development of *S. rolfsii*.

Keywords: Biocontrol. Fungal ecology. *Sclerotinia sclerotiorum*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa de localização da área de estudo, indicando os pontos de coleta de solo no município de Brunópolis, SC. Os números 1 e 17 indicam o início e final, em ordem crescente, dos pontos no mapa. 30
- Figura 2 - Metodologia de pareamento de culturas *in vitro* utilizada para avaliação do crescimento micelial dos fitopatógenos. (A) Arranjo dos isolados no método de pareamento em placa de petri. Em A-I há a indicação da localização do disco micelial do fitopatógeno enquanto em A-II está sendo indicado o local onde foram inoculados os discos miceliais dos isolados de solo; (B) visualização da metodologia de coleta de dados do crescimento micelial através de duas retas com intersecção no centro do disco do fitopatógeno. Ambas as placas são registros do desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareados com o isolado SC1223..... 34
- Figura 3 - Representação das três características qualitativas (tipos de controle biológico) avaliadas. (A) antibiose – caracterizado quando se verificou a presença de halo de inibição entre o fitopatógeno e o isolado do solo; (B) competidor – determinado aos isolados de solo que limitaram o crescimento do fitopatógeno sem que houvesse formação de halo de inibição; e (C) não efetivo (n.e.) - demonstrando que os isolados do solo não apresentaram qualquer influência negativa no desenvolvimento do fitopatógeno. 35
- Figura 4 - Densidade de propágulos de fungos por grama de solo entre os três diferentes ecossistemas (plântio de soja, pastagem e mata nativa). As letras dentro das barras indicam as diferenças entre as áreas, pelo teste de tukey a 5% de significância..... 38
- Figura 5 - Aspecto da diversidade de fungos de solo, cultiváveis em meio de cultura, para os 17 pontos de coleta. A prancha indica a diversidade específica de fungos de solo que se desenvolveram a partir do plaqueamento de 25 µl de uma solução de solo na diluição de 1:100. As linhas A-D de placas se referem às repetições para o meio de cultura batata-dextrose-ágar (bda) dos 17 pontos de coleta indicados

nas colunas. As linhas E-H de placas estão relacionadas com o plaqueamento em meio de cultura V8[®] preparado a partir de um suco nutritivo contendo tomate, cenoura, aipo, beterraba, salsa, agrião e espinafre.....40

- Figura 6 - Parâmetros abióticos do solo que apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os diferentes tipos de uso do solo. Os gráficos de caixa indicam os valores das medianas (linha grossa) entre os quartis; os limites superiores e inferiores correspondem a $1,5 \times$ o intervalo interquartil e os pontos fora das caixas representam os valores extremos para cada variável. N, P e S representam respectivamente as áreas de mata nativa, pastagem e plantio de soja.42
- Figura 7 - Correlação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias por grama de solo com as características abióticas que foram estatisticamente diferentes (análise de variância com $p < 0,05$ e teste de tukey a 5% de significância), para as três áreas. A coloração é indicativo de correlação negativa (tons de vermelho) ou positiva (tons de azul).43
- Figura 8 - Proporção dos tipos de controle biológico observados para os três fitopatógenos. A legenda na imagem indica as três características utilizadas para a avaliação qualitativa nos experimentos: não efetivo (n.e.), competidor e antibiose....45
- Figura 9 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.53
- Figura 10 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo antibiose. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.55

- Figura 11 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotium rolfii* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância. 56
- Figura 12 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 57
- Figura 13 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo antibiose. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância. .. 58
- Figura 14 - Inibição da área de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância. 60
- Figura 15 - Inibição da área de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo antibiose. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância. 61
- Figura 16 - Inibição da área de crescimento micelial de *Sclerotium rolfii* quando pareado com diferentes fungos de solo

qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.....62

Figura 17 - Inibição da área de crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.....64

Figura 18 - Inibição da área de crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo antibiose. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de controle, competidor, antibiose e não efetivo (n.e.), exercidos por cada fungo de solo sobre os fitopatógenos <i>S. sclerotiorum</i> , <i>S. rolfsii</i> e <i>S. cepivorum</i>	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACCM	Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BOD	Biochemistry Oxygen Demand
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IVCM	Índice de Velocidade do Crescimento Micelial
MCCR/SC	Micoteca do Centro de Ciências Rurais
NCBI	National Center For Biotechnology Information
PIC	Percentual de Inibição do Crescimento
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
1.1.	OBJETIVOS	19
1.1.1.	Objetivo Geral.....	19
1.1.2.	Objetivos específicos	19
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1.	OS FUNGOS.....	20
2.2.	O SOLO COMO NORTEADOR DO DESENVOLVIMENTO FÚNGICO	22
2.2.1.	Fitopatógenos associados ao solo	24
2.2.1.1.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	25
2.2.1.2.	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	25
2.2.1.3.	<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk.	26
2.3.	CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS.....	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1.	ÁREA DE COLETA.....	30
3.2.	ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO	31
3.3.	DILUIÇÃO SERIADA E PLAQUEAMENTO	31
3.4.	DENSIDADE DE FUNGOS NO SOLO E ISOLAMENTO	32
3.5.	PAREAMENTO DE CULTURAS <i>IN VITRO</i>	33
3.6.	CONTROLE BIOLÓGICO: ASPECTOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS	35
3.6.1.	Tipos de controle	35
3.6.2.	Índice de Velocidade do Crescimento Micelial, Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial e Percentual de Inibição do Crescimento	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1.	DENSIDADE DE FUNGOS.....	38
4.2.	PARÂMETROS ABIÓTICOS E SUA CORRELAÇÃO COM A DENSIDADE DE FUNGOS DO SOLO.....	41
4.3.	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DOS CONTROLADORES BIOLÓGICOS	44

4.4.	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL	52
5.	CONCLUSÃO	69
6.	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICES	82

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos com uma complexa habilidade de adaptação, permitindo sua viabilidade em condições abióticas variáveis e em quase todos os ecossistemas terrestres e aquáticos, sendo que a maior diversidade desses organismos esteja localizada em regiões tropicais (BLACKWELL, 2011).

As estimativas baseadas em análises moleculares têm mostrado que o número de espécies fúngicas ultrapassa os 3 milhões (O'BRIEN *et al.*, 2005). Entretanto, a hipótese de que o número estimado de espécies é de aproximadamente 1,5 milhão continua prevalecendo, apesar da necessidade de uma análise mais intensa e de longa duração que consiga reavaliar a riqueza de espécies (HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997; HAWKSWORTH, 2001; BLACKWELL, 2011).

No que diz respeito aos fungos de solo, ainda que haja muitas pesquisas voltadas aos aspectos ecológicos, os estudos que envolvem a identificação desses organismos são escassos, assim como a maior parte dos fungos mitospóricos, o que pode estar relacionado aos processos inerentes a eles (MCLAUGHLIN *et al.*, 2009), como a dificuldade de cultivo de espécies seletivas, a competição interespecífica que inibe o desenvolvimento de uns em relação a outros na fase de isolamento e a perda de inóculos durante o processo metodológico. De todo modo, é reconhecida a importância da comunidade de fungos de solo em processos ecossistêmicos relacionados à ciclagem de nutrientes, decomposição de matéria orgânica e como estes fatores podem estar diretamente relacionados à auto-regulação dos ecossistemas terrestres (TAYLOR *et al.*, 2010).

Entender os aspectos complexos que envolvem os fungos de solo, bem como suas relações intra e interespecíficas é essencial, tendo em vista sua capacidade, junto com outros microrganismos e macro invertebrados do solo, como mantenedores basais das funções dos ecossistemas. Entretanto existem outras características que podem estar diretamente relacionadas com o desenvolvimento da comunidade de fungos do solo, principalmente aquelas responsáveis pela composição química do solo. É compreensível que se faça uma associação mais direta entre a comunidade de fungos com os aspectos bióticos, descrevendo sempre as funções ecossistêmicas nas quais eles estão envolvidos. Não se deve descartar, portanto, as possibilidades de correlação entre estes organismos e a presença de elementos químicos no solo, como P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, e outros macro e micronutrientes

que desempenham funções biológicas importantes a nível celular.

Através da análise dessas propriedades e buscando alternativas ao controle tradicional de doenças agrícolas, foram iniciadas buscas por microrganismos capazes de suprimir o desenvolvimento de fitopatógenos, método este, menos agressivo aos ecossistemas. Um dos produtos fitossanitários biológicos utilizado em larga escala contra fungos causadores de doenças em produções agrícolas, que visam a redução de impactos ambientais, são oriundos de isolados de *Trichoderma* spp. (MACHADO *et al.*, 2012), um gênero de fungos que apresenta reconhecida atividade controladora de *Sclerotinia sclerotiorum*, fitopatógeno que causa grandes danos à produção, principalmente na cultura de soja no Brasil.

Na busca de informações a respeito do comportamento da comunidade de fungos de solo e a diferença existente entre ecossistemas agrícolas e naturais, o presente trabalho visou a obtenção de dados de diversidade de fungos filamentosos que possam apresentar determinado potencial como agentes de controle biológico contra os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotium cepivorum*.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Analisar a influência de aspectos físico-químicos do solo de três diferentes ecossistemas do município de Brunópolis, SC, na comunidade de fungos e o potencial dessa comunidade para utilização como controladores biológicos dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotium cepivorum*.

1.1.2. Objetivos específicos

- Verificar a correlação entre as características químicas do solo com a densidade de fungos para os três diferentes ecossistemas;
- Avaliar a densidade de fungos de solo para os três diferentes ecossistemas (plantio de soja, pastagem e mata nativa), através da quantificação de unidades formadoras de colônias;
- Testar o efeito biocontrolador dos fungos de solo obtidos contra os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotium cepivorum*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. OS FUNGOS

Os fungos estão entre os agentes mais importantes no processo de degradação da matéria orgânica e são diretamente influenciados pela quantidade de biomassa produzida em um ecossistema florestal (LEITE; ESPOSITO, 2004), podendo também atuar em intemperismos e associações importantes com outros organismos (MONCALVO, 1997). Por serem quimioheterotróficos, eles produzem substâncias capazes de degradar macromoléculas insolúveis em unidades monoméricas solúveis para poderem absorvê-las (PUTZKE; PUTZKE, 2002).

Os fungos conidiais são conhecidos por apresentarem reprodução assexuada, por divisões mitóticas ou brotamento, característica também associada à fase anamórfica de Ascomycota e Basidiomycota (GRANDI, 1999). Pertencentes a esse grupo de microrganismos, os hifomicetos (ex.: *Beltrania rhombica*) e coelomicetos (ex.: *Chaetomella raphigera*) se destacam por apresentarem estruturas mais complexas para a produção dos conídios e se diferenciam pelo tipo de arranjo formado pelos conidióforos, ainda que não represente uma característica filogenética (SEIFERT *et al.*, 2011).

Apesar da discordância entre alguns pesquisadores com relação ao número total de espécies de fungos, incluindo os ainda não descritos, a estimativa de 3 milhões de espécies proposta por O'Brien *et al.* (2005) pode estar relacionada com os avanços nas pesquisas em análises moleculares, que tem permitido a identificação de fungos não cultiváveis em meios de cultura. Dados de 1993 a 2011 apontam que a descrição do número de fungos não cultiváveis ultrapassou o de espécies cultiváveis, representando mais de 66% do total de espécies depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (MOREIRA; CAMPOS, 2013).

Os fungos podem ser encontrados nos mais diversos ambientes e ainda que os ecossistemas aquáticos apresentem uma grande quantidade destes microrganismos desempenhando funções importantes como a mineralização de matéria orgânica (GROSSART; ROJAS-JIMENEZ, 2016), o solo é considerado o seu principal habitat, seja diretamente nas camadas do solo, ou em associação com outros organismos de superfície (MOORE *et al.*, 2014).

Os fungos de solo são considerados um dos principais grupos de organismos funcionais da microbiota do solo, responsáveis por uma

variedade de funções ecossistêmicas atuando como fitopatógenos, decompositores e cicladores de nutrientes, além de interagirem com vários outros microrganismos e pequenos invertebrados (PFENNING, 2013).

A dinâmica da comunidade de fungos de solo pode estar associada a diversos fatores que norteiam seu comportamento, como pH, umidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Entretanto, há um determinado grau de complexidade na tentativa de relacionar todos os fatores bióticos e abióticos que afetam diretamente a diversidade desses organismos, uma vez que há evidências de que as espécies não só respondem em conjunto às variações ambientais como também de forma diferente entre elas (TAYLOR *et al.*, 2010).

Entre os aspectos ecológicos que são desempenhados pelos fungos destacam-se as associações simbióticas, seja aumentando a área de absorção radicular de plantas e fornecendo nutrientes como os fungos micorrízicos (FM), seja fornecendo proteção e nutrientes a algas em uma relação mutualística - líquens, ou colonizando tecido celular ou lignificado de plantas, no caso dos fitopatogênicos.

A colonização de raízes por FM desempenha um papel importante não só na nutrição das plantas mas também auxiliando na tolerância ao stress e na estrutura do solo (CASAZZA *et al.*, 2017). Ainda que não se possa afirmar se as associações micorrízicas determinam funções ecossistêmicas de forma direta ou se elas são uma resposta da comunidade de plantas submetidas a diferentes gradientes climáticos, elas continuam sendo consideradas um exemplo de sistemas adaptativos complexos que apontam a emergência de padrões macroscópicos a partir das interações locais entre os diferentes componentes de um ecossistema (WURZBURGER *et al.*, 2017).

No caso dos fitopatógenos, essa interação fungo-planta é desenvolvida através de uma variedade de fatores inerentes ao patógeno, o qual desenvolve uma série de processos bioquímicos, acarretando em modificações morfológicas que os permite colonizar o tecido do hospedeiro quando as condições ambientais são favoráveis (AMORIM, 2011).

Em vista disso, os fungos fitopatogênicos são responsáveis por grandes perdas econômicas pois ocasionam doenças em plantas cultivadas. O principal problema desse aspecto é que a crescente demanda na produção agrícola gera aumento no uso de agrotóxicos para conter o avanço das doenças nas plantações. Para o controle de doenças fúngicas os principais ingredientes ativos utilizados são o oxiclureto de cobre, tiofanato-metílico, mancozebe, carbedazin e tebuconazol e o uso

indiscriminado desses fungicidas pode acarretar problemas ecológicos graves, principalmente para a micro, meso e macrofauna edáfica. Dados do IBAMA (2016) apontam que em 2014 mais de 27 mil toneladas de fungicidas foram utilizados, um aumento de mais de 4 mil toneladas, comparado ao ano de 2013. Atualmente esse valor pode ser muito maior tendo em vista que anualmente a produção agrícola apresenta expansão das áreas de plantio.

Uma das culturas que mais afeta o ambiente pela aplicação em larga escala de agrotóxicos é a soja (MENDONÇA, 2006). Ela está sujeita a uma das doenças mais severas causadas por fungos, o mofo-branco-da-soja, que tem como agente etiológico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Essa patologia se caracteriza pela necrose e tombamento da planta, uma vez que o microrganismo coloniza a haste da espécie vegetal, além de sobreviver no solo através da produção de estruturas de resistência (escleródios), caracterizando-a como uma doença de difícil controle através de métodos químicos (GÖRGEN *et al.*, 2009). Esses mesmos autores mencionam ainda, sobre as recomendações de manejo do mofo-branco e consideram o controle biológico através de antagonistas naturais como uma possibilidade de redução dos prejuízos ambientais e econômicos causados pelo fungo.

Apesar dos grandes impactos ambientais causados pelo cultivo de grãos através do método mecanizado de produção agrícola, esse sistema se caracteriza como um importante fator de desenvolvimento econômico. É preciso ponderar, dentro da realidade, os dois aspectos, norteadores e antagonísticos, encarados pela agricultura mecanizada, a fim de propor alternativas que continuem favorecendo o crescimento econômico, mas que diminuam os impactos causados por ela.

2.2. O SOLO COMO NORTEADOR DO DESENVOLVIMENTO FÚNGICO

O solo é um ecossistema formado por uma variedade de fatores bióticos e abióticos atuando de forma simultânea. A alteração de qualquer um desses fatores pode ocasionar um desequilíbrio ecológico (MOREIRA *et al.*, 2013) e entender essa característica do solo é essencial, uma vez que as modificações geradas pelo seu uso irregular ou de forma irresponsável pode interferir diretamente em processos biológicos importantes para a manutenção da vida na terra.

Segundo Moreira *et al.* (2013), esses processos biológicos envolvem a decomposição de matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes, controle biológico de patógenos, formação de

agregados, produção de metabólitos, que envolvem os antibióticos, ácidos orgânicos, hormônios, compostos alelopáticos, dentre outros, além de serem os maiores responsáveis pela manutenção da sociedade através da produção de alimentos.

Em relação aos fatores abióticos e como eles influenciam a saúde do solo para manutenção da comunidade biológica tanto abaixo quanto acima dele, estão diretamente ligados à sua composição química primária, ou seja, os minerais primários essenciais e os componentes químicos associados a eles que possam ser utilizados pela comunidade biológica.

Dessa forma, o entendimento das propriedades químicas e mineralógicas do solo é de importante, contribuindo para a compreensão de como eles se apresentam no solo (disponíveis ou em formas estruturais) e como podem ser utilizados pelas plantas, diminuindo custos com a produção agrícola devido ao menor *input* de fertilizantes (MELO *et al.*, 2009). Ainda de acordo com esses autores, é na fração de areia e silte do solo que são encontrados os principais minerais primários capazes de fornecer nutrientes para as plantas e é através de processos de intemperismo que macro e micronutrientes, fundamentais para o desenvolvimento das funções ecossistêmicas no solo, são disponibilizados.

Esses nutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas, também são essenciais para a manutenção de funções básicas nos fungos. A concentração de fósforo, por exemplo, possui um papel crucial no metabolismo fúngico, sendo responsável pela biossíntese de ácidos nucleicos, fosfolípidios, ATP e glicofosfatos, e por ser considerado um fator limitante para o crescimento, os fungos acabam utilizando os vacúolos como local de reserva para o fósforo na forma de polifosfatos (WALKER; WHITE, 2005).

Outros elementos essenciais para o crescimento dos fungos incluem K, Mg, Mn, Ca, Fe, Zn, Cu, Ni, Co e Mo. Dos macroelementos, tanto o potássio quanto o magnésio estão relacionados com atividade enzimática, entretanto enquanto o primeiro atua também nos processos de osmorregulação, o segundo atua de forma mais direta no crescimento fúngico, pois está associado com processos de divisão celular (WALKER; WHITE, 2005).

Os microelementos possuem funções variadas, estando relacionados com funções celulares atuando como cofatores enzimáticos, atividade enzimática e estrutura de proteínas, envolvidos no metabolismo do nitrato e na atividade da urease, bem como na produção de vitaminas B₁₂ (WALKER; WHITE, 2005).

Todos esses aspectos acima citados, talvez sejam o que faz do solo um dos principais ecossistemas colonizados por microrganismos com os fungos podendo apresentar até 25 km de hifas de fungos filamentosos em apenas um grama de solo, e com uma alta diversidade genética (MOREIRA; CAMPOS, 2013).

Por se tratar de um ambiente em constante modificação, os fungos do solo foram capazes de desenvolver diversas características adaptativas, permitindo a utilização de diferentes formas de energia e sobrevivência mesmo quando submetidos a diferentes condições ambientais (NEVES, 1992). Esse processo de adaptação no solo, de acordo com Neves (1992), pode ter sido a principal causa para que atualmente sejam encontradas espécies de microrganismos com uma alta plasticidade nutricional, sendo capazes de alterar vias metabólicas, para a produção de diferentes conjuntos de enzimas, possibilitando-os sobreviver em diferentes condições ambientais e explorando até mesmo diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

2.2.1. Fitopatógenos associados ao solo

Entre todos os organismos que possuem o solo como habitat primordial, é preciso mencionar e destacar os microrganismos como o principal grupo, justamente pela importância das atividades que eles desempenham e que são imprescindíveis para a sustentabilidade dos ecossistemas, sendo fundamentais para a manutenção e sobrevivências das comunidades vegetais e animais (MOREIRA; CAMPOS, 2013).

Assim como os microrganismos estão associados com diversos serviços ecossistêmicos benéficos algumas associações desempenhadas por eles acabam causando grandes problemas econômicos. De acordo com Katan (2017), os fungos fitopatogênicos de solo compartilham algumas características básicas como capacidade de sobrevivência e modo de ação no solo, pelo menos durante uma parte do seu ciclo reprodutivo, o que faz com que eles sejam extremamente influenciados pelas características bióticas e abióticas do solo, além de algumas práticas agrícolas como irrigação, aeração do solo, adubação e aplicação de fertilizantes.

Por se tratar de um ecossistema complexo e com uma alta diversidade de organismos, no solo se encontra um grande grupo de fungos responsáveis por ocasionar doenças em plantas, com uma perda global atingindo aproximadamente 26% da produção agrícola (KHAN *et al.*, 2009), com perda de bilhões de dólares por ano ocasionados por

patógenos que incluem os gêneros *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, e *Macrophomina* (SHAFIQUE *et al.*, 2016).

Dentre outros patógenos associados ao solo podemos citar *Pythium ultimum* responsável pela podridão radicular em diversas culturas (LÖBMANN *et al.*, 2016), *Fusarium solani* (PASTRANA *et al.*, 2016), *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* e *Colletotrichum coccodes* responsáveis pela podridão e morte precoce de plantas de batata (HULEIHEL *et al.*, 2018), *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia trifoliorum* (KANDULA *et al.*, 2015), além dos fungos produtores de estrutura de resistência chamados de escleródios como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotium cepivorum*.

2.2.1.1. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é uma espécie de fungo pertencente à família Sclerotinaceae, da ordem Helotiales, do Filo Ascomycota (MYCOBANK, 2019)^a. Esta espécie de fungo possui ciclo de vida anamorfo e teleomorfo bem conhecido. São responsáveis por causar doenças em uma ampla gama de hospedeiros, sendo conhecido principalmente como causador do mofo branco. Os sintomas atrelados à este fungo estão relacionados com o crescimento micelial acelerado que aos poucos se aglomeram até que haja a formação de estruturas compactas e enegrecidas chamadas de escleródios, estruturas assexuadas de resistência que podem variar em tamanho de 2 a 10 mm de diâmetro (ainda que seja mais achatado e alongado do que esférico) (AGRIOS, 2005).

Na fase sexuada de *S. sclerotiorum*, ocorre a formação de apotécio (corpo de frutificação com receptáculo discoide e côncavo no topo da estipe), produção de esporos sexuais em ascos com cerca de 8 ascósporos por asco (SMOLÍNSKA; KOWALSKA, 2018) e dispersão principalmente através da água.

2.2.1.2. *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Sclerotium rolfsii Sacc. é uma espécie de fungo pertencente à família Typhulaceae, da ordem Agaricales, dentro do filo Basidiomycota (MYCOBANK, 2019)^c. Este é um outro fungo pertencente a um grupo de fungos que causam severas lesões em diversas espécies vegetais, abrangendo espécies ornamentais, leguminosas, cereais e sementes. Normalmente as lesões ocasionadas por esse fungo se iniciam logo abaixo da linha do solo, com colonização do tecido vegetal,

desenvolvendo um aspecto marrom escuro na lesão e em seguida, o amarelecimento das folhas e perda das mesmas, isso quando não houver o tombamento da plântula infectada (AGRIOS, 2005).

Ainda que sua fase assexuada seja amplamente conhecida, a caracterização sexuada ainda apresenta certa dificuldade, entretanto, Agrios (2005) descreve que a produção sexuada pode ocorrer normalmente através da formação de basidiósporos nas margens das lesões quando em condição de alta umidade. Ainda de acordo com Agrios (2005), sua fase teleomórfica é conhecida como *Aethalium rolfsii*.

2.2.1.3. *Sclerotium cepivorum* Berk.

Sclerotium cepivorum Berk. é outra espécie de fungo classificado dentro do filo Basidiomycota, família Typhulaceae e ordem Agaricales (MYCOBANK, 2019)^b. Assim como *S. rolfsii*, em sua fase anamórfica ocorre a produção de escleródios, diferindo em tamanho, já que os escleródios de *S. cepivorum* podem ser considerados como microescleródios. Este fungo é um dos principais responsáveis pelos problemas econômicos envolvendo os plantios de alho e cebola, tendo em vista que ele é conhecido como o causador do mofo branco dessas duas culturas (AGRIOS, 2005).

A severidade da doença ocasionada por este fungo, está relacionada ao fato de além de colonizar diretamente o tecido do hospedeiro, o micélio secreta ácido oxálico como um dos exsudatos, juntamente com enzimas pectinolíticas, celulolíticas e outras enzimas que desintegram o tecido vegetal antes mesmo que ocorra a penetração das hifas no hospedeiro (AGRIOS, 2005).

2.3. CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

“O controle biológico é considerado um fenômeno natural que consiste na regulação de pragas, doenças e plantas daninhas por inimigos naturais.” (PARRA, 2000). A sua observação teve início em meados de 2700 a.C., quando Chineses e Egípcios realizaram uma das primeiras descrições de doenças entomopatogênicas no bicho-da-seda e em abelhas, entretanto somente no ano de 1664 foi realizado o primeiro experimento que abriria margem para o estabelecimento do controle biológico no mundo, quando John Evelyn tentou utilizar um macerado feito de lagartas para o controle de pragas florestais (ALVES, 1998).

Somente a partir do crescimento da percepção sobre as interações ecológicas que envolvem todos os organismos e o entendimento de que há um equilíbrio dinâmico nos ecossistemas naturais, foi possível ampliar o espectro de ação do controle biológico para estudos que envolvessem a utilização de microrganismos também para o controle de doenças, ampliando a característica do controle biológico, que se iniciou atrelado quase que de forma exclusiva, ao tratamento de insetos-praga.

Uma dessas características ecológicas diz respeito às plantas. Muitas delas possuem mecanismos de defesa, que quando ativados, influenciam a produção de substâncias de proteção contra o ataque de predadores. Partindo dessa premissa, os metabólitos secundários, produzidos naturalmente por algumas plantas podem possuir atividade antifúngica, o que de acordo com Garcia *et al.* (2012), serve como justificativa para testes que utilizem extratos de plantas como alternativa no controle biológico.

Esses metabólitos secundários encontrados nas plantas, ainda que não sejam os mesmos, também estão presentes nos fungos e participam de importantes processos ecológicos. Esses compostos, chamados de micotoxinas, podem atuar nas interações entre diferentes espécies de fungos que competem por espaço e nutrientes, se caracterizando dessa forma como potencial agente de controle biológico (BHATTACHARYYA *et al.*, 2016).

Quando se realiza análise sobre métodos de ação que ocorrem no processo de controle biológico de fungos fitopatogênicos, pode-se separar quatro classes principais: competidores, produtores de compostos antibióticos, micoparasitas e indutores de resistência em plantas (AGRIOS, 2005).

O grupo de fungos classificados como competidores, atuam dificultando o desenvolvimento de outros microrganismos, seja através da competição por espaço ou nutrientes. Uma característica fundamental compartilhada entre este grupo é a alta velocidade de crescimento micelial e taxa reprodutiva, facilitando o processo de competição contra outros organismos de solo (OWLEY; WINDHAM, 2010).

No que diz respeito ao método de ação dos controladores biológicos caracterizados como antibióticos, encontram-se as espécies de fungos que produzem compostos tanto voláteis quanto não voláteis, apresentando efeito inibitório no desenvolvimento de outras espécies. Ainda que não apresentem um desenvolvimento rápido, como no caso dos competidores, esse grupo de fungos produzem micotoxinas como forma de defesa, garantindo espaço suficiente para a sua manutenção

dentro dos ecossistemas (OWLEY; WINDHAM, 2010). Além de algumas bactérias como *Agrobacteria radiobacter* e *Pseudomonas fluorescens* esses mesmos autores indicam que dois grupos de fungos atuantes no controle biológico através do processo de antibiose compreendem os gêneros *Gliocladium* e *Trichoderma*.

Os micoparasitas estão relacionados com um grupo de microrganismos que produzem substâncias capazes de degradar a parede celular de outros microrganismos, colonizando o tecido e extraindo sua fonte de nutrientes, acarretando a morte do hospedeiro (MOORE *et al.*, 2014). Um exemplo de micoparasitismo, responsável por indicar potencial controle contra um dos fitopatógenos mais importantes na agricultura a nível mundial, está relacionado com a colonização de escleródios de *S. sclerotiorum* pelo fungo *Paraconiothyrium minitans*, além de ocasionar o mesmo efeito em outras espécies de *Sclerotinia*, gerando perda de material citoplasmático nas hifas dos fitopatógenos (SMITH *et al.*, 2008) e inviabilizando suas estruturas de resistência.

Uma outra classe considerada dentro do controle biológico é a indução de resistência. Nela estão inseridos todos os microrganismos patogênicos ou não que colonizam o tecido vegetal, e desencadeiam um processo bioquímico na planta, induzindo a produção de compostos capazes de impedir a continuidade da colonização microbiana. Outra forma de indução de resistência, ainda que dentro dos mesmos princípios supracitados, se refere às espécies que ao serem atacadas liberam compostos radiculares que são recebidos como sinais de indução de resistências para as plantas vizinhas, acionando uma cadeia de eventos de proteção vegetal contra ataques de doenças e pragas (AGRIOS, 2005).

A grande problemática envolvendo a agricultura, seja ela mecanizada ou não, é a quantidade de agrotóxicos utilizados no combate de doenças. Esses produtos apresentam altos níveis de toxicidade e causam danos ambientais graves. De acordo com Messing e Brodeur (2018), o somatório de problemas gerados por pragas, doenças e plantas invasoras ocasiona uma perda de produção anual de 40% e ainda que sejam utilizados mais de 3 bilhões de toneladas de agrotóxicos na tentativa de minimizar esses problemas, a perda na produção continua aumentando. A busca por alternativas de controle de fitopatógenos começa então a ser intensificada, a partir da junção da necessidade de minimizar os impactos do uso indiscriminado desses produtos e avanços em estudos na área de controle biológico.

Nesse sentido, vários fungos tem sido amplamente estudados para avaliar seu potencial como controladores biológicos de doenças em

plantas, principalmente aquelas que possuem fungos como agente etiológico. Um grupo de fungos amplamente estudado e com resultados positivos no que diz respeito à diminuição da incidência de fitopatógenos pertence ao gênero *Trichoderma*, que pode ser encontrado em diversos tipos de solo (MARKOVICH; KONONOVA, 2015; SARAVANAKUMAR *et al.*, 2016).

Trichoderma é um fungo assexuado, com sua fase teleomórfica pertencente ao gênero *Hypocrea*, que pode ser facilmente encontrado em solos de regiões temperadas e tropicais com mais de 100 propágulos para cada grama de solo (RAJESH *et al.*, 2016). Conhecido como um grupo de fungo cosmopolita, pode ser encontrado em uma ampla variedade de substratos (CHAVERRI *et al.*, 2015) e são considerados como oportunistas, simbiontes não patogênicos de plantas e parasitas de fungos fitopatogênicos (HARMAN *et al.*, 2004; VINALE *et al.*, 2008).

Diversas espécies de *Trichoderma* tem sido utilizadas no âmbito das pesquisas científicas que visam formas alternativas de controle de fitopatógenos que pode ocorrer por competição, antibiose ou micoparasitismo (RAJESH *et al.*, 2016). Resultados positivos tem sido encontrados na utilização desse gênero de fungo como antagonista, atuando contra *Rhizoctonia solani*, agente causador do tombamento da soja (ROESE *et al.*, 2017), *S. sclerotiorum* do feijão (MESQUITA *et al.*, 2012) e *Curvularia* sp. (BUENO-PALLERO *et al.*, 2016).

Alguns produtos comerciais à base de *Trichoderma* já podem ser encontrados em virtude da sua eficiência como antagonista de fitopatógenos, dentre eles destacam-se o Bio-Tam[®], Rootshield[®] e Tenet[®] (SUNDARI *et al.*, 2016).

Ainda que os produtos à base de fungos sejam eficientes no controle de fitopatógenos, é importante destacar que os microrganismos vivem em habitats que possuem diferentes características bióticas e abióticas. Sendo assim é fundamental que seja realizada uma prospecção a respeito dos possíveis grupos de fungos antagonistas em escala local, possibilitando uma fonte de controle biológico adaptada às condições ambientais sem que haja a necessidade de introdução de espécies ou variedades exóticas.

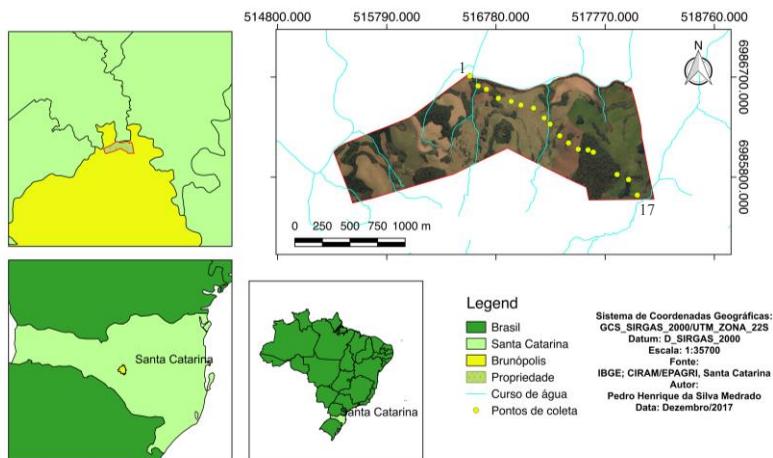
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE COLETA

De acordo com o zoneamento agroecológico e socioambiental do estado de Santa Catarina, a região de Brunópolis está inserida na zona agroecológica 3A – Vale do Rio do Peixe e Planalto Central, caracterizado segundo a classificação de Köppen como sendo do tipo Cfb, temperado constantemente úmido, com temperaturas médias anuais entre 15,8°C e 17,9°C, e precipitação total anual de 1.460 a 1.820 mm, com ocorrência de geadas (CIRAM; EPAGRI, 2017).

A área de coleta possui um mosaico composto por diferentes ecossistemas. O transecto utilizado para marcação dos pontos de coleta de 2 km foi suficiente para atravessar áreas de plantio de soja, mata nativa e pastagem. Para cada ponto de coleta foi realizada uma composição do solo, representada por uma coleta central e quatro coletas adjacentes, ou sub-amostras, com 25 m de distância entre elas. Ao todo, foram coletadas 17 amostras de solo dentro do transecto (Figura 1).

Figura 1 - Mapa de localização da área de estudo, indicando os pontos de coleta de solo no município de Brunópolis, SC. Os números 1 e 17 indicam o início e final, em ordem crescente, dos pontos no mapa.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Para a extração do solo, foram feitas perfurações com 30 cm de profundidade para a retirada de aproximadamente 200 g de solo em

cada um dos pontos, utilizando um trado que foi lavado e higienizado com álcool 70% antes e após cada perfuração. Após a homogeneização do solo em balde, aproximadamente 500 g foram armazenados em sacos plásticos e o restante foi utilizado para completar dois frascos coletores estéreis de 50 mL. O material foi vedado, identificado e transportado ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos, onde os frascos coletores com solo foram armazenados em geladeira a 4°C e os sacos de 500 g foram encaminhados para um laboratório de análises químicas de solo.

Após a coleta as amostras foram agrupadas de acordo com o tipo de uso do solo, separados em mata nativa (pontos 9, 12, 13, 14 e 15), plantio de soja (pontos 1, 2, 3, 11, 16 e 17) e área de pastagem (pontos 4, 5, 6, 7, 8 e 10).

3.2. ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO

As amostras do solo coletadas em campo foram encaminhadas para um laboratório de análises de solo, no qual foram determinadas as características químicas que poderiam influenciar algum aspecto do desenvolvimento dos fungos, como capacidade de troca de cátions, pH, carbono (C), conteúdo de fósforo (P) e cátions trocáveis (Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn e Al) (MORRIËN *et al.*, 2017). Foram analisados ainda a acidez potencial, teor de argila, relação Cálcio/Magnésio, Cálcio/Potássio, Magnésio/Potássio, Cobre, teor de matéria orgânica, saturação de bases, saturação por alumínio, soma de bases, Zinco, umidade e altitude.

O resultado obtido em cada amostra foi utilizado como repetição dentro dos três sistemas de uso do solo, descrito no item 3.1. As características químicas consideradas diferentes entre as áreas, de acordo com a análise de variância realizada no software R e RStudio, foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância. Todas as variáveis significativas foram então utilizadas para verificação do grau de correlação com a densidade de fungos avaliada para cada ecossistema.

3.3. DILUIÇÃO SERIADA E PLAQUEAMENTO

Para a diluição seriada foram realizadas duas metodologias, uma em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e outra em meio V8 (suco V8® à base de 8 vegetais, tomate, cenoura, aipo, beterraba,

salsa, alface, agrião e espinafre) a fim de ampliar a quantidade de fungos obtidos que poderiam ser perdidos pela sua exigência nutricional.

O método de diluição foi realizado a partir do preparo de uma solução de 1:1 do solo coletado no frascos coletores. Para esse teste, 10 g de solo pesados em balança semi-analítica foram adicionados a 10 mL de água destilada autoclavada e homogeneizados com bastão de vidro. Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada autoclavada, obtendo-se assim a diluição de 1:10 (ALFENAS *et al.*, 2007).

A partir da solução de 1:10, foi transferido 1 mL para outro tubo de ensaio esterilizado contendo 9 mL de água destilada autoclavada para a obtenção da diluição que foi utilizada na montagem do bioensaio, de 1:100. O processo foi realizado para o preparo de 10 mL de solução, na diluição 1:100, para todas as 17 amostras de solo, para a realização do plaqueamento em câmara de fluxo laminar.

Com as soluções de solo preparadas na diluição 1:100, quatro placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA e quatro com meio V8, adicionados de antibiótico Penicilina $5.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ + Estreptomicina $5.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (na proporção de 0,5 mL de antibiótico para cada 100 mL de meio de cultura), foram utilizadas como repetição dentro de cada tratamento. Uma alíquota de 0,25 mL de solução foi adicionada, com auxílio de micropipeta de volume variável, às placas de Petri e plaqueadas com alça de Drigalski. As placas foram então vedadas e identificadas. O armazenamento ocorreu em incubadora do tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD, do inglês "*Biochemistry Oxygen Demand*"), com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25°C para o crescimento dos fungos. No total foram preparadas 68 placas de Petri, sendo quatro repetições para cada um dos 17 tratamentos nos dois meios de cultura.

3.4. DENSIDADE DE FUNGOS NO SOLO E ISOLAMENTO

Após quatro dias de incubação, as placas foram utilizadas para contagem da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFCs) em cada repetição, parâmetro utilizado para determinação da densidade de propágulos fúngicos por grama de solo. Os valores gerados a partir da contagem de UFCs obtidos nesse teste foram utilizados para a análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância.

Passados os 15 dias de avaliação das placas de Petri, as duas maiores colônias de fungos em cada repetição foram repicadas para placas de Petri com meio de cultura BDA e cultivadas sob as mesmas

condições mencionadas acima, em BOD a 25°C e 12 h de fotoperíodo. Dos 340 fungos isolados das amostras de solo, 150 foram selecionados de forma aleatória para o armazenamento, de acordo com o tempo de crescimento e viabilidade em placa, sendo herborizados através do método de manutenção de cultura em placa de Petri dispostas em BOD a 25°C e pelo método Castellani, que consistiu na adição de discos de micélio de 5 mm de diâmetro das colônias fúngicas em vidros transparentes esterilizados e vedados, contendo água destilada autoclavada.

Os isolados foram armazenados na micoteca do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos, sob os códigos de referência da micoteca seguido por números identificadores de quatro dígitos (MCCR/SC0000).

3.5. PAREAMENTO DE CULTURAS *IN VITRO*

Para os experimentos de controle biológico foram utilizados 150 fungos de solo visando o controle de três fungos fitopatogênicos: *S. sclerotiorum*, *S. rolfisii* e *S. cepivorum*. Todos os isolados utilizados estavam armazenados na Micoteca do Centro de Ciências Rurais (MCCR/SC) da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos. Os isolados estavam sob mesma condição de herborização e preservados através do método Castellani em frascos de vidro e temperatura ambiente, método considerado mais simples e de baixo custo para preservação da maioria dos fungos (CAPRILES *et al.*, 1989).

Os fitopatógenos utilizados também estavam armazenados em método Castellani. O *S. rolfisii* foi isolado em 13/05/2016 de plantas de tomate da região de Curitibanos; o *S. sclerotiorum* foi obtido através da coleta de escleródios de solo contaminado em área de plantio de soja no município de Brunópolis em 12/05/2017 e o *S. cepivorum*, utilizado no presente trabalho, foi isolado através de escleródios em placas de Petri doados pela Epagri, SC.

Os experimentos de pareamento de culturas *in vitro* utilizando os 150 isolados foram divididos em 15 bioensaios, em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 11 tratamentos (10 fungos mais uma testemunha) e 5 repetições, totalizando 55 placas de Petri para cada um dos fitopatógenos testados.

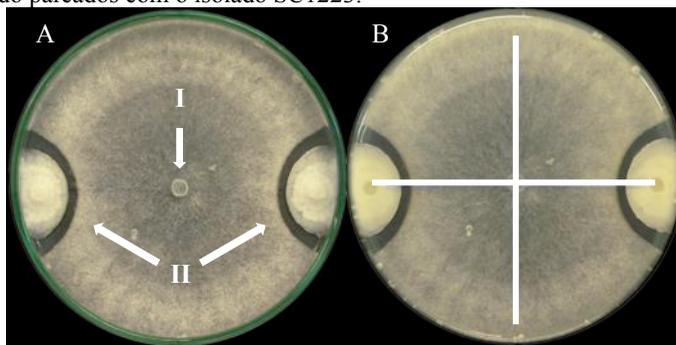
O meio de cultura utilizado foi BDA autoclavado e distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo antibiótico, para redução do crescimento de bactérias. No centro das placas foram adicionados discos de 0,5 cm contendo micélio fúngico dos fungos *S.*

sclerotiorum, *S. rolfsii* ou *S. cepivorum*, oriundos de colônias com sete dias de cultivo em estufa do tipo BOD a 25°C e 12 h de fotoperíodo.

Após 24 h mantidos nesta condição, foram adicionados dois discos de micélio dos potenciais antagonistas a serem testados nas extremidades opostas das placas de Petri e alinhados com o fitopatógeno, seguido pela coleta de dados do diâmetro da colônia (Figura 2A). Para isso, foram traçados no lado externo das placas de Petri, duas retas perpendiculares entre si com ponto de intersecção localizado no centro do disco micelial do fitopatógeno (Figura 2B).

Duas avaliações diárias foram realizadas até que pelo menos uma repetição de qualquer tratamento atingisse o valor máximo do diâmetro das placas de Petri (9 cm), sendo coletados os valores em centímetro das duas retas e os horários de início de cada avaliação, necessários para realização dos cálculos dos índices utilizados como parâmetros quantitativos do potencial inibitório de cada fungo de solo.

Figura 2 - Metodologia de pareamento de culturas *in vitro* utilizada para avaliação do crescimento micelial dos fitopatógenos. (A) Arranjo dos isolados no método de pareamento em placa de Petri. Em A-I há a indicação da localização do disco micelial do fitopatógeno enquanto em A-II está sendo indicado o local onde foram inoculados os discos miceliais dos isolados de solo; (B) visualização da metodologia de coleta de dados do crescimento micelial através de duas retas com intersecção no centro do disco do fitopatógeno. Ambas as placas são registros do desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareados com o isolado SC1223.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

A caracterização visual de cada isolado testado nesse experimento pode ser verificada através das fotografias, do anverso e verso, das placas de Petri contendo o cultivo de suas respectivas colônias no Apêndice D.

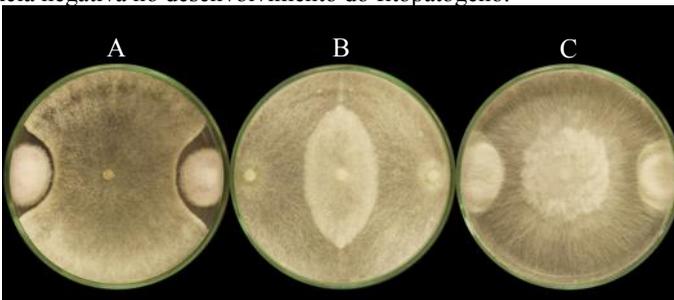
3.6. CONTROLE BIOLÓGICO: ASPECTOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS

3.6.1. Tipos de controle

Um dos parâmetros avaliados ao final de cada bioensaio foi a determinação da presença ou ausência de controle biológico exercido pelos fungos de solo. Para essa qualificação foi observado o comportamento dos fitopatógenos na presença dos potenciais antagonistas.

Todos os fungos de solo que não apresentaram barreira de crescimento, permitindo o desenvolvimento de micélio dos patógenos de planta sobre eles, foram considerados como não efetivos no controle biológico (Figura 3C); para aqueles que apresentaram uma barreira de crescimento, foram qualificadas duas classes distintas de controle: a presença de halo de inibição entre o fitopatógeno e o antagonista classifica o fungo de solo como controlador do tipo antibiose (Figura 3A), enquanto o antagonista que cria uma barreira de desenvolvimento no fitopatógeno confinando espacialmente o seu desenvolvimento foi classificado como controlador do tipo competidor (Figura 3B) (OWLEY; WINDHAM, 2010).

Figura 3 - Representação das três características qualitativas (tipos de controle biológico) avaliadas. (A) Antibiose – caracterizado quando se verificou a presença de halo de inibição entre o fitopatógeno e o isolado do solo; (B) Competidor – determinado aos isolados de solo que limitaram o crescimento do fitopatógeno sem que houvesse formação de halo de inibição; e (C) Não efetivo (N.E.) - demonstrando que os isolados do solo não apresentaram qualquer influência negativa no desenvolvimento do fitopatógeno.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Todos os dados qualitativos obtidos para os 150 fungos de solo foram utilizados para gerar gráfico do percentual de cada tipo de controle avaliado (incluindo os não efetivos) para os fungos *S. sclerotiorum*, *S. rolfisii* e *S. cepivorum*.

3.6.2. Índice de Velocidade do Crescimento Micelial, Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial e Percentual de Inibição do Crescimento

Ainda que todos os fungos tenham sido qualificados de acordo com o tipo de controle exercido nos fitopatógenos (OWLEY; WINDHAM, 2010), esse parâmetro necessita de informações adicionais para que sejam selecionados aqueles com melhores capacidades de controle e que apresentem alguma diferença entre eles. Dessa forma, todos os fungos tiveram sua influência quantificada e os dados gerados a partir dos testes de pareamento de culturas, em relação aos valores dos diâmetros das colônias dos fitopatógenos em um intervalo de tempo, foram utilizados para geração dos Índices de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) e Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM).

Enquanto o IVCM foi calculado de acordo a fórmula proposta por Maguire (1962) e adaptada por Oliveira (1992), a AACCM foi obtida através da aplicação da fórmula proposta por Campbell e Madden (1990), ambas representadas abaixo:

$$IVCM = \sum \left(\frac{y_{i+1} - y_i}{t_{i+1} - t_i} \right) \div (n - 1) \quad (1)$$

$$AACCM = \sum \left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) \quad (2)$$

onde:

y_{i+1} e y_i = valores médios dos diâmetros da colônia observados em duas avaliações consecutivas;

t_{i+1} e t_i = períodos das avaliações em horas;

n = número de avaliações.

A partir dos valores gerados em ambos os índices, para todos os tratamentos, em cada um dos 15 bioensaios montados, foi realizado o cálculo para obtenção dos valores dos percentuais de inibição da

velocidade do crescimento micelial e do percentual de inibição do crescimento a partir da aplicação da fórmula a seguir:

$$\text{PIC} = \left(\frac{\bar{x}_{\text{testemunha}} - \bar{x}_{\text{tratamento}}}{\bar{x}_{\text{testemunha}}} \right) \times 10 \quad (3)$$

onde:

\bar{x} = valores médios do IVCM (para o PI da velocidade) e AACCM (para o PI da área) referente aos tratamentos;

As testemunhas se referem aos fitopatógenos cultivados isolados em placa de Petri, sem a presença de qualquer antagonista.

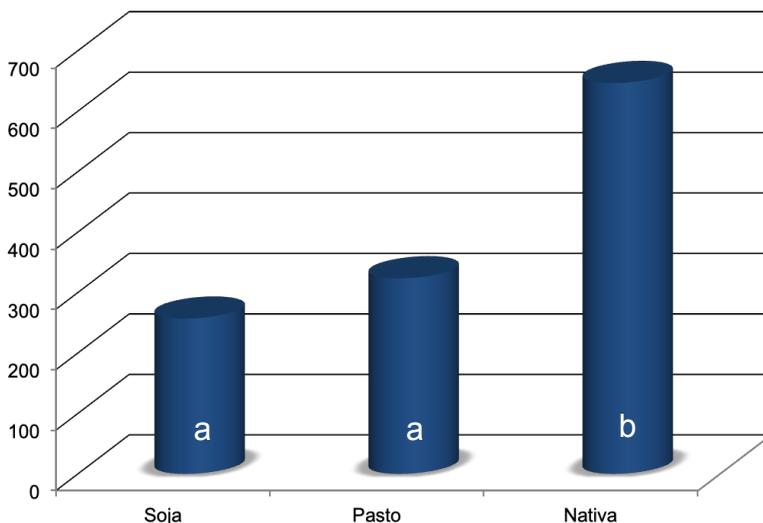
A análise de variância foi realizada no Software R e RStudio para avaliar se houve diferença entre os tratamentos para o IVCM, AACCM e PIC. Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram testados. No caso de diferenças significativas, foi realizado ainda o teste de Scott-Knott.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DENSIDADE DE FUNGOS

O número de unidades formadoras de colônias, utilizado para verificação da densidade de fungos nos três diferentes sistemas de uso do solo, indicou que há maior densidade de fungos em solo de mata nativa, quando comparado com o solo submetido ao plantio de soja e de pastagem (Figura 4).

Figura 4 - Densidade de propágulos de fungos por grama de solo entre os três diferentes ecossistemas (plantio de soja, pastagem e mata nativa). As letras dentro das barras indicam as diferenças entre as áreas, pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Quando se fala em diversidade, é possível realizar associação direta com o fato de que ela provavelmente será maior em ecossistemas que apresentem uma maior diversidade de plantas. Essa é uma relação encontrada por vários pesquisadores, como Gelorini *et al.* (2012) que verificaram redução na diversidade de fungos em áreas com produção agrícola quando comparada com vegetação nativa no nordeste da Uganda. A influência da riqueza de espécies de árvores na diversidade de fungos também foi observada na Noruega, com área de plantio de

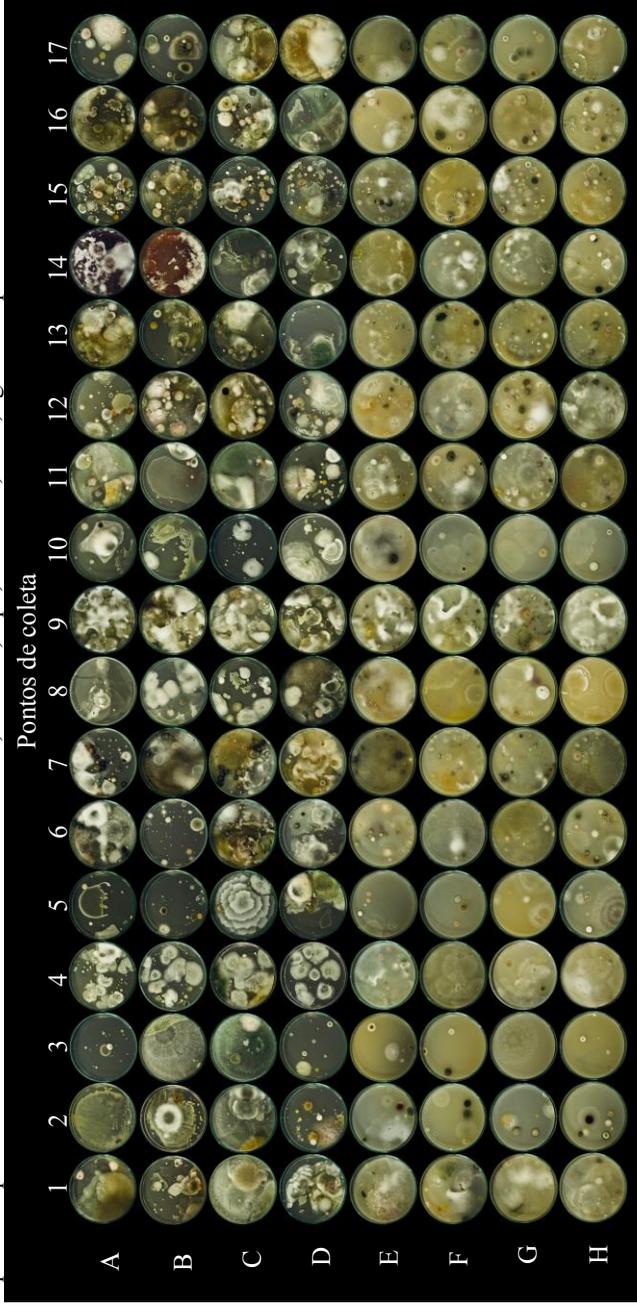
Pinus nigra apresentando menor diversidade de fungos em relação à área de floresta nativa (BUÉE *et al.*, 2011).

Uma representação da diversidade de fungos avaliada pode ser verificada na Figura 5. Nela estão demonstradas todas as repetições que foram utilizadas para quantificação do número de unidades formadoras de colônias presentes nas amostras do solo para os 17 pontos de coleta, antes de serem agrupados nos três sistemas ecológicos descritos neste trabalho.

Outro fator que deve ser destacado é que a alta densidade de propágulos fúngicos no solo da mata nativa pode ser uma resposta, também, ao constante *input* de matéria orgânica, que é mais elevado em um ecossistema natural do que um ecossistema agrícola. De acordo com Zak *et al.* (2011), a comunidade de fungos saprofitos e as plantas estão intrinsecamente ligados pela disponibilidade de recursos necessários ao seu crescimento. Por um lado as plantas disponibilizam a matéria orgânica e por outro os fungos responsáveis pela sua decomposição liberam o nitrogênio que é utilizado pelas plantas. Entretanto existe uma variedade de outros fatores que podem alterar o desenvolvimento da comunidade microbiana e portanto entender a correlação existente entre aspectos abióticos do solo e a comunidade de fungos é importante para o entendimento das relações de dependência entre eles.

O revolvimento do solo e aplicação de fungicidas nas áreas de monocultura, ainda que não tenham sido avaliadas, apresentam grandes consequências no desenvolvimento dos fungos do solo. A alteração da estrutura do solo pode influenciar vários processos importantes, como a capacidade de retenção e infiltração de água, trocas gasosas, disponibilidade de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, além de tornarem-se suscetíveis à erosão (RABOT *et al.*, 2018). A alteração na capacidade de retenção de água do solo, por exemplo, pode ocasionar uma baixa na concentração de sais inorgânicos, importantes para o desenvolvimento dos organismos, como o nitrogênio, potássio, enxofre, magnésio e cálcio (TSAI *et al.*, 1992). Bai *et al.* (2018) também verificaram que áreas em que não há revolvimento ou aeração do solo há uma tendência de aumento na estabilidade dos agregados e no conteúdo de matéria orgânica, facilitando o desenvolvimento de microrganismos, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho, que apontou uma maior densidade de fungos filamentosos de solo em um ecossistema natural quando comparado a um agrícola.

Figura 5 - Aspecto da diversidade de fungos de solo, cultiváveis em meio de cultura, para os 17 pontos de coleta. A prancha indica a diversidade específica de fungos de solo que se desenvolveram a partir do plaqueamento de 25 µl de uma solução de solo na diluição de 1:100. As linhas A-D de placas se referem às repetições para o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) dos 17 pontos de coleta indicados nas colunas. As linhas E-H de placas estão relacionadas com o plaqueamento em meio de cultura V8® preparado a partir de um suco nutritivo contendo tomate, cenoura, aipo, beterraba, salsa, agrião e espinafre.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

4.2. PARÂMETROS ABIÓTICOS E SUA CORRELAÇÃO COM A DENSIDADE DE FUNGOS DO SOLO

De todos os parâmetros do solo analisados, somente nove apresentaram diferenças entre as áreas pelo teste de Tukey a 5% de significância. O teor de alumínio no solo apresentou valores superiores na mata nativa, quando comparado com os outros dois ecossistemas, enquanto a concentração de cálcio, índice SMP, concentração de magnésio, pH, saturação de bases e soma de bases apresentaram uma relação contrária, com valores menores para a mata nativa em comparação com o plantio de soja e a área de pastagem (Figura 6).

O Latossolo, presente na região de Brunópolis, SC, é descrito como um solo com alto teor de alumínio, pH variando entre 4,0 e 5,2, além de serem fortemente dessaturados (EMBRAPA, 2004). Essa caracterização realizada pela Embrapa justifica os resultados encontrados na figura 6, no que tange aos valores de alumínio, pH, saturação de bases e soma de bases, indicando que em ambiente natural, essas características tendem a se manter, em comparação com ecossistemas agrícolas.

O teor de Alumínio no solo está diretamente associado com o valor do pH, tendo em vista que a presença desse íon no solo aumenta a acidez (ALFAIA; UGUEN, 2013). Ainda de acordo com esses autores, um dos principais problemas do alumínio do solo é a acidez que ele causa às espécies vegetais, já que o alumínio compromete o desenvolvimento das raízes, diminui a densidade de microrganismos e ainda bloqueia a absorção de nutrientes como o fósforo, cálcio e magnésio.

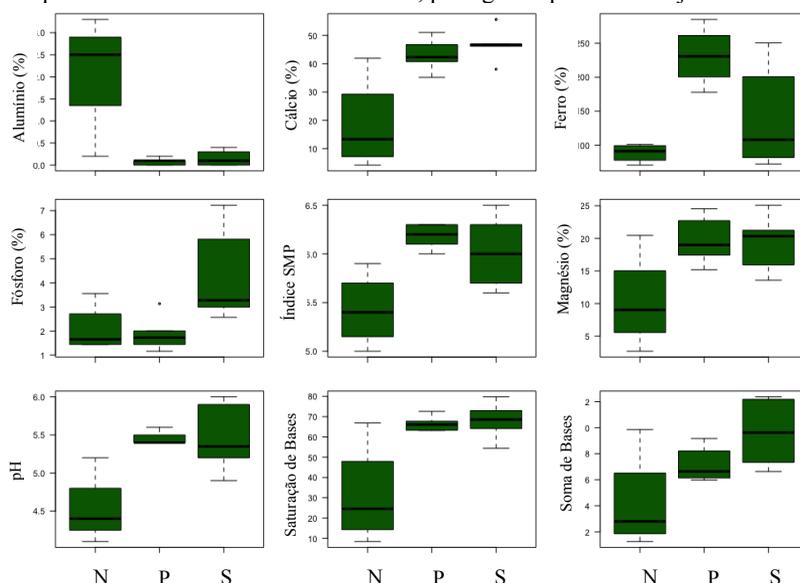
Por se tratar de uma região com alto índice pluviométrico, a deficiência de outros nutrientes como cálcio e magnésio também se tornam evidentes em solos com pouca cobertura vegetal, ou que tenham sido revolvidos, uma vez que são minerais facilmente lixiviados e sua regulação é normalmente associada à precipitação, cobertura vegetal e textura do solo (TSAI *et al.*, 1992).

Entretanto os maiores valores de cálcio e magnésio em área de plantio de soja em relação à mata nativa, pode ser devido ao uso de fertilizantes agrícolas e adição de calcário para correção do pH, diminuindo a acidez, o teor de alumínio e aumentando as concentrações de cálcio, fósforo, saturação e soma de bases na solução do solo.

A altitude, ainda que tenha apresentado valores maiores para a mata nativa do que a área de pastagem e plantio de soja, não representa uma característica relevante, tendo em vista que todos os seus pontos de

coleta apresentavam maiores altitudes em relação aos outros dois ecossistemas. O intervalo de aproximadamente 80 metros de altitude entre os pontos de coleta, atrelado a todos os outros aspectos abióticos também dificulta a extração de dados conclusivos para este parâmetro e por esse motivo foi excluída das análises.

Figura 6 - Parâmetros abióticos do solo que apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os diferentes tipos de uso do solo. Os gráficos de caixa indicam os valores das medianas (linha grossa) entre os quartis; os limites superiores e inferiores correspondem a $1,5\times$ o intervalo interquartil e os pontos fora das caixas representam os valores extremos para cada variável. N, P e S representam respectivamente as áreas de mata nativa, pastagem e plantio de soja.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

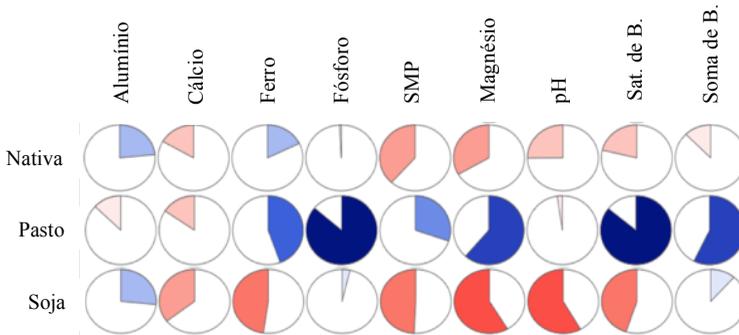
A acidez e a saturação por alumínio também não foram representadas graficamente, mesmo apresentando diferenças entre as áreas, uma vez que estão diretamente relacionados a outros parâmetros como o pH e teor de alumínio respectivamente.

A densidade de fungos de solo (número de UFCs) foi então utilizada para avaliar a correlação entre os aspectos abióticos do solo para cada área de estudo. Dessa forma foi possível verificar que somente o teor de fósforo e saturação de bases do solo apresentaram uma alta correlação positiva ($\rho > 0,75$) na área de pastagem, indicando que para

este ecossistema, ambos os fatores estão diretamente associados com a densidade de fungos do solo (Figura 7).

O fósforo é um mineral que exerce grande importância no solo, e é considerado um fator modulador da comunidade microbiana na rizosfera (SANTOYO *et al.*, 2017). Ele pode ser encontrado nos microrganismos sob a forma de fosfossacarídeos, ácidos nucleicos e nucleotídeos, e a obtenção desse mineral pela microbiota pode ocorrer tanto através da acidificação do meio ou pela produção de fosfatases no meio para a imobilização do fosfato solúvel (NEVES, 1992). Portanto, ao avaliar a importância do fosfato para o desenvolvimento de organismos biológicos, espera-se que ele apresente uma correlação positiva com a densidade de fungos do solo (Figura 7).

Figura 7 - Correlação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias por grama de solo com as características abióticas que foram estatisticamente diferentes (análise de variância com $p < 0,05$ e teste de Tukey a 5% de significância), para as três áreas. A coloração é indicativo de correlação negativa (tons de vermelho) ou positiva (tons de azul).



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

A alta saturação de bases no solo de pastagem, ainda que tenha apresentado correlação positiva com a densidade de fungos avaliada, engloba uma variedade de outras características químicas como por exemplo, a alta concentração de cálcio e magnésio e baixas concentrações de alumínio (Figura 6), entretanto não foi observado nenhum grau de correlação para esses minerais quando avaliados isoladamente (Figura 7). As demais correlações foram consideradas baixas ($\rho < 0,75$) entre as características químicas do solo e as três áreas de estudo.

Para a área de plantio de soja, os fatores que indicam uma possível correlação positiva com a quantidade de unidades formadoras de colônias foram os teores de alumínio, fósforo e soma de bases, enquanto o percentual de cálcio, concentração de ferro, índice SMP e saturação de bases indicam uma possível correlação negativa. Os dois aspectos abióticos para esta área que apresentaram uma maior influência na densidade de fungos foram o percentual de magnésio e o pH do solo com um índice de correlação acima de 50% ($\rho > 0,50$).

4.3. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DOS CONTROLADORES BIOLÓGICOS

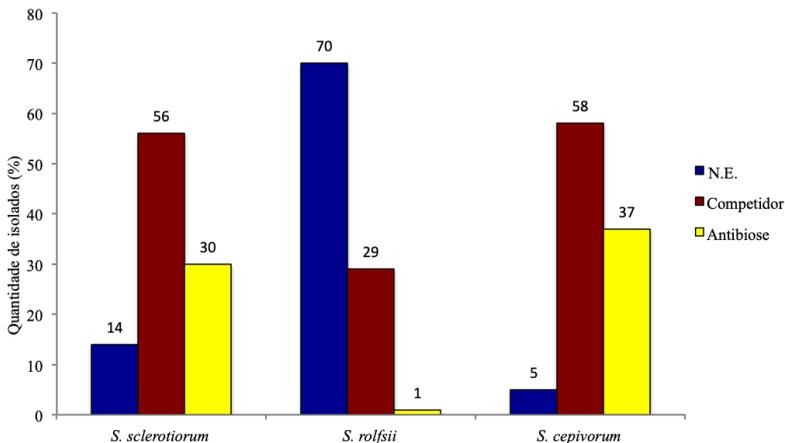
É fundamental o entendimento de que a real eficiência do controle biológico de fitopatógenos no campo está interligada à eficiência dos processos de caracterização dos isolados que possuam esse potencial. É necessário portanto, levar em consideração aspectos individuais dos organismos, realizando testes que sejam apropriados para cada grupo. Um desses métodos, o *in vitro*, envolve o menor número possível de componentes, apresentando um baixo nível de complexidade, mas que auxiliam na determinação de aspectos importantes na varredura de potenciais agentes de controle biológico, que são os mecanismos de ação ou tipos de controle exercido (PLIEGO *et al.*, 2011).

Ao analisar o potencial controlador dos fungos de solo em *S. sclerotiorum*, *S. rolfii* e *S. cepivorum* foi verificado que há uma grande percentagem de fungos que atuam como antagonistas naturais para esses fitopatógenos. Para *S. cepivorum*, 95% dos fungos testados foram qualificados como controladores, dos quais 54% foram do tipo competição, enquanto os outros 37% apresentaram halo de inibição, classificando-os como produtores de substâncias antifúngicas (antibiose) (Figura 8).

Ainda na Figura 8 é possível verificar que para *S. sclerotiorum* também houve um alto percentual de fungos atuando como antagonistas naturais do tipo competidor e antibiose para esse fitopatógeno com 56% e 30% respectivamente. Entretanto, quando avaliamos os fungos que não apresentaram potencial como controladores biológicos de *S. cepivorum* e *S. sclerotiorum*, houve um aumento de 9% do primeiro em relação ao segundo, um percentual muito baixo em relação aos que não apresentaram efeito contra *S. rolfii*, que foi 56% maior que os não efetivos contra *S. sclerotiorum* e 65% maior que os fungos de solo classificados como não efetivos contra *S. cepivorum*.

Quando analisamos os dados qualitativos para *S. rolfsii*, fica claro que o controle biológico apresenta uma dificuldade maior de ação nesse fitopatógeno para os 150 fungos de solo que foram testados, com 70% destes sendo classificados como não efetivos, permitindo que o patógeno continuasse seu desenvolvimento através do crescimento de hifas sobre a colônia dos fungos de solo testados. Mesmo com número elevado de fungos não efetivos, ainda foram encontrados 30% de fungos que poderiam ser utilizados como controladores biológicos desse fitopatógeno, com 29% atuando como competidores e 1% sendo caracterizado como controlador do tipo antibiose (Figura 8).

Figura 8 - Proporção dos tipos de controle biológico observados para os três fitopatógenos. A legenda na imagem indica as três características utilizadas para a avaliação qualitativa nos experimentos: Não efetivo (N.E.), Competidor e Antibiose



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

É importante ressaltar que todos esses dados foram gerados a partir de parâmetros visuais, e esses valores percentuais não permitem determinar se eles foram eficientes ou não na redução do crescimento dos fitopatógenos testados. Por essa razão, todos os isolados testados tiveram sua influência quantificada através do IVCN, AACCM e PI. Todas as informações referentes aos tipos de controle exercidos por cada isolado testado contra os três fitopatógenos, objetos deste estudo, podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Tipos de controle, competidor, antibiose e não efetivo (n.e.), exercidos por cada fungo de solo sobre os fitopatógenos *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* e *S. cepivorum*.

Isolados	Tipo de controle		
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>S. cepivorum</i>
MCCR/SC1150	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1151	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1152	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1153	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1154	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1155	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1156	n.e.	n.e.	n.e.
MCCR/SC1157	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1158	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1159	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1160	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1161	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1162	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1163	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1164	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1165	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1166	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1167	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1168	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1169	competidor	n.e.	antibiose
MCCR/SC1170	antibiose	antibiose	antibiose
MCCR/SC1171	n.e.	n.e.	antibiose
MCCR/SC1172	n.e.	n.e.	competidor
MCCR/SC1173	antibiose	n.e.	competidor
MCCR/SC1174	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1175	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1176	competidor	competidor	antibiose
MCCR/SC1177	antibiose	n.e.	antibiose

Isolados	Tipo de controle		
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>S. cepivorum</i>
MCCR/SC1178	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1179	competidor	n.e.	antibiose
MCCR/SC1180	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1181	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1182	competidor	n.e.	n.e.
MCCR/SC1183	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1184	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1185	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1186	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1187	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1188	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1189	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1190	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1191	competidor	n.e.	antibiose
MCCR/SC1192	competidor	n.e.	antibiose
MCCR/SC1193	n.e.	n.e.	n.e.
MCCR/SC1194	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1195	n.e.	n.e.	antibiose
MCCR/SC1196	antibiose	competidor	antibiose
MCCR/SC1197	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1198	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1199	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1200	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1201	n.e.	n.e.	n.e.
MCCR/SC1202	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1203	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1204	n.e.	n.e.	competidor
MCCR/SC1205	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1206	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1207	n.e.	n.e.	antibiose

Isolados	Tipo de controle		
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>S. cepivorum</i>
MCCR/SC1208	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1209	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1210	competidor	n.e.	antibiose
MCCR/SC1211	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1212	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1213	n.e.	n.e.	competidor
MCCR/SC1214	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1215	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1216	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1217	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1218	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1219	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1220	n.e.	competidor	competidor
MCCR/SC1221	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1222	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1223	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1224	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1225	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1226	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1227	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1228	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1229	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1230	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1231	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1232	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1233	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1234	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1235	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1236	n.e.	n.e.	n.e.
MCCR/SC1237	competidor	n.e.	competidor

Isolados	Tipo de controle		
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>S. cepivorum</i>
MCCR/SC1238	competidor	n.e.	antibiose
MCCR/SC1239	n.e.	n.e.	antibiose
MCCR/SC1240	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1241	n.e.	n.e.	antibiose
MCCR/SC1242	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1243	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1244	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1245	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1246	n.e.	n.e.	competidor
MCCR/SC1247	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1248	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1249	n.e.	n.e.	competidor
MCCR/SC1250	competidor	n.e.	antibiose
MCCR/SC1251	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1252	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1253	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1254	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1255	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1256	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1257	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1258	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1259	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1260	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1261	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1262	antibiose	competidor	competidor
MCCR/SC1263	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1264	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1265	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1266	antibiose	n.e.	competidor
MCCR/SC1267	competidor	n.e.	competidor

Isolados	Tipo de controle		
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>S. cepivorum</i>
MCCR/SC1268	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1269	n.e.	n.e.	n.e.
MCCR/SC1270	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1271	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1272	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1273	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1274	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1275	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1276	n.e.	n.e.	competidor
MCCR/SC1277	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1278	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1279	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1280	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1281	n.e.	n.e.	competidor
MCCR/SC1282	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1283	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1284	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1285	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1286	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1287	antibiose	n.e.	competidor
MCCR/SC1288	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1289	antibiose	antibiose	antibiose
MCCR/SC1290	n.e.	n.e.	competidor
MCCR/SC1291	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1292	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1293	competidor	n.e.	competidor
MCCR/SC1294	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1295	antibiose	n.e.	antibiose
MCCR/SC1296	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1297	competidor	competidor	competidor

Isolados	Tipo de controle		
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>S. cepivorum</i>
MCCR/SC1298	competidor	competidor	competidor
MCCR/SC1299	antibiose	n.e.	antibiose

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2018).

Legenda: Todos os isolados listados foram utilizados nos teste de controle biológico. Os códigos foram determinados de acordo com os códigos da Micoteca do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos. Todos os fungos possuem registro fotográfico das colônias, e podem ser verificados no Apêndice C deste capítulo.

No que diz respeito à determinação do modo de ação de diferentes isolados do solo no controle biológico de fungos fitopatogênicos, nota-se uma deficiência de estudos com essa característica comparativa, entretanto alguns exemplos podem ser encontrados para os três fitopatógenos estudados.

Para *S. sclerotiorum* alguns fungos atuam como competidores, micoparasitas ou produtores de compostos antibióticos, como é o caso dos fungos *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride* e *T. longibrachiatum* (MATROUDI *et al.*, 2009), *T. asperelloides* (SUMIDA *et al.*, 2018) e *Coniothyrium minitans* (MUTHUMEENAKSHI *et al.*, 2007; ZENG *et al.*, 2014). Algumas bactérias também são amplamente estudadas para o controle de *S. sclerotiorum* principalmente pela formação de halo de inibição, como por exemplo *Enterobacter ludwigii*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Kasokonia cowardii*, *Variovorax* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp. e *Pantoea vagans*, *Serratia marcescens* (LOPES *et al.*, 2018).

Para *S. rolfsii* um dos principais métodos de ação dos microrganismos antagonistas envolve a produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular do fitopatógeno, suprimindo o seu desenvolvimento através do micoparasitismo que se desenvolve nas estruturas de resistência e nas hifas (CAVALCANTI *et al.*, 2018). Alguns exemplos de fungos competidores ou micoparasitas de *S. rolfsii* são *T. virens*, *T. viride*, *T. harzianum* (MUKHERJEE *et al.*, 2004; EL-SHARKAWY *et al.*, 2018; KUSHWAHA *et al.*, 2018), *T. koningii* (HIRPARA *et al.*, 2017), *T. gamsii* e *Aspergillus pseudocaelatus* (ZOHAIR *et al.*, 2018). Há ainda alguns exemplos de bactérias desempenhando função antagônica neste fitopatógeno, como *Sterptomyces* sp. (JACOB *et al.*, 2018), *Bacillus* sp. (SETHI; MUKHERJEE, 2018) e *Rhizobium* sp. (VOLPIANO *et al.*, 2018).

No ano de 1991, Jackson *et al.* realizaram no Reino Unido, um levantamento de microrganismos do solo com potencial para o controle do mofo branco do alho, causado por *S. cepivorum*, dos quais 140 eram fungos e 58 foram identificados como sendo bactérias. Estes autores verificaram que 100% dos fungos testados apresentaram algum tipo de efeito controlador entretanto 10% deles foram considerados controladores fracos dentro da metodologia de avaliação utilizada, dados estes que corroboram com os resultados encontrados no solo de Brunópolis para o controle desse fitopatógeno.

Outras espécies de fungos que foram descritas como efetivas no controle de *S. cepivorum* foram *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamatum* (HUSSAIN *et al.*, 2017), *C. minitans* (WHIPPS; GERLAGH, 1992), *T. pseudokoningii* (JACKSON *et al.*, 1991), *T. asperellum* e *Talaromyces flavus* (MAHDIZADEHNARAGHI *et al.*, 2015).

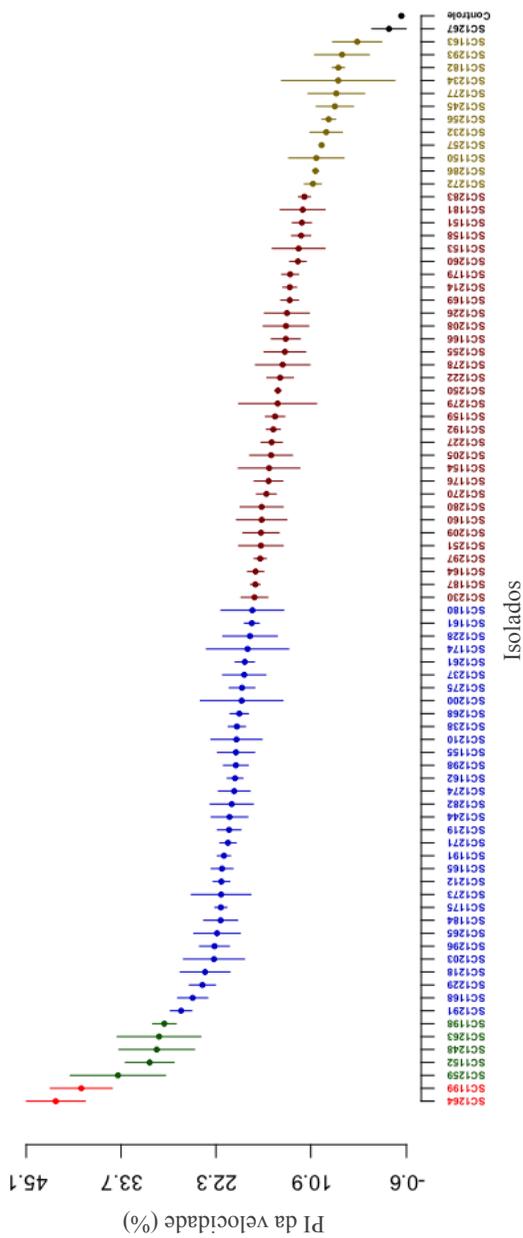
Em se tratando de experimentos na área de controle biológico de fitopatógenos, não é difícil nos depararmos com grande quantidade de trabalhos, principalmente quando se avalia a influência *in vitro* de alguns microrganismos sobre outros, gerando conseqüentemente, uma vasta quantidade de informação envolvendo essa temática. Nos últimos anos tem se aumentado o entendimento da importância dos controladores biológicos, do modo de ação exercido por eles e algumas técnicas de aplicação, entretanto a comercialização ainda enfrenta problemas, principalmente devido à diferença na performance dos controladores no campo (HEYDARI; PESSARAKLI, 2010).

4.4. PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

A avaliação do percentual de inibição (PI) da velocidade do crescimento micelial, para os fungos de solo testados no pareamento em placa contra *S. sclerotiorum*, indicou eficiência dos isolados qualificados tanto como competidores quanto como produtores de antibióticos. Dos 84 fungos qualificados como competidores, 83 foram considerados efetivos estatisticamente, separados em cinco grupos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância ($p < 0,05$) (Figura 9).

Dos dois grupos que apresentaram maior redução no PI da velocidade, destacam-se os isolados SC1264 e SC1199, que apontaram redução de 41% e 38% respectivamente, quando comparados ao tratamento controle. Para o segundo grupo (coloração verde), o percentual de inibição na velocidade do crescimento de *S. sclerotiorum* variou entre 28% e 34%.

Figura 9 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

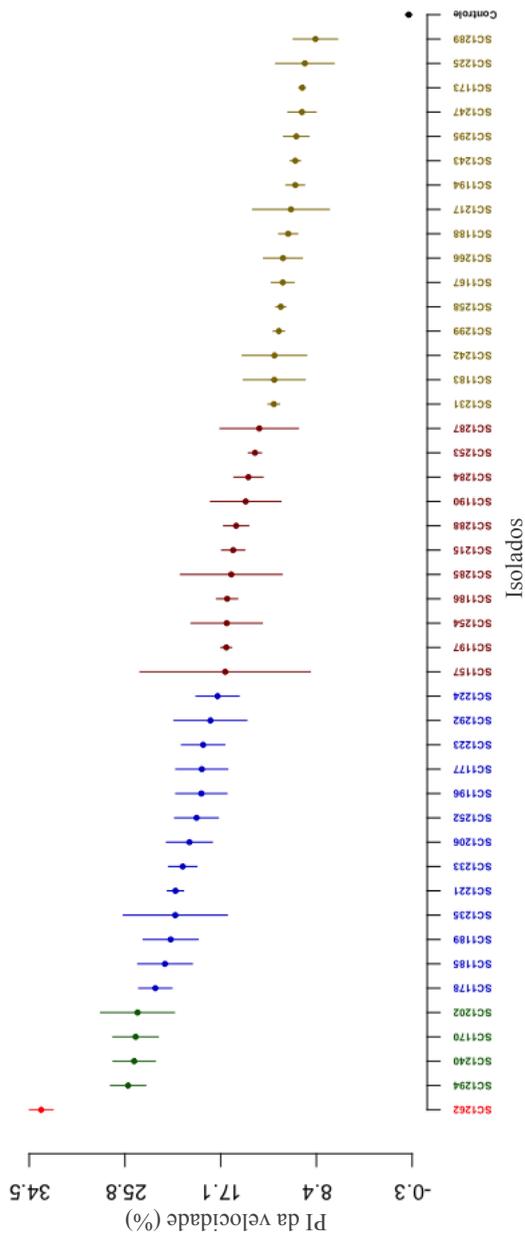
Para os fungos considerados competidores contra esse fitopatógeno, apenas o isolado SC1267 não diferiu do tratamento controle de acordo com a análise estatística realizada (Figura 9).

No segundo grupo de controladores biológicos, classificados como sendo do tipo antibiose contra *S. sclerotiorum*, todos os isolados foram considerados eficientes na redução do PI da velocidade ($p < 0,05$), com o menor valor (8%) sendo atribuído ao fungo SC1289 (Figura 10). As diferentes cores nos gráficos indicam as diferentes classes que foram separadas de acordo com o Scott-Knott 5%. Dentre essas classes, a azul corresponde aos isolados que apresentaram redução no PI da velocidade de 17% a 23%, enquanto a classe verde possui um intervalo de variação de 24% a 25%. O isolado que apresentou a maior redução foi o SC1262, que reduziu a velocidade do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em 33% quando comparado ao tratamento controle (Figura 10).

Para *S. rolfsii*, o gráfico de setores que indica o percentual de controladores biológicos, mostra uma redução significativa no número de fungos que podem atuar como controladores deste fitopatógeno, quando comparado aos valores obtidos para os fungos *S. sclerotiorum* e *S. cepivorum*. Ainda assim, dos 44 fungos que foram classificados como competidores contra *S. rolfsii*, apenas um isolado não diferiu do tratamento controle ($p < 0,05$). Em contrapartida, todos os outros apresentaram uma redução no PI da velocidade para este fungo acima de 10% e foram separados em seis diferentes classes (Scott-Knott 5%) (Figura 11). Ainda, é possível observar que o grupo laranja engloba os dois isolados considerados mais eficientes na redução do IVCm de *S. rolfsii*, que são o SC1152 (46%) e o SC1155 (42%). A partir do grupo azul, todos os isolados considerados competidores apresentaram redução da velocidade do crescimento micelial do fitopatógeno acima de 30%. O único isolado considerado como controlador do tipo antibiose contra *S. rolfsii* não apontou diferença estatística quando comparado ao controle e por esse motivo não foi demonstrado graficamente.

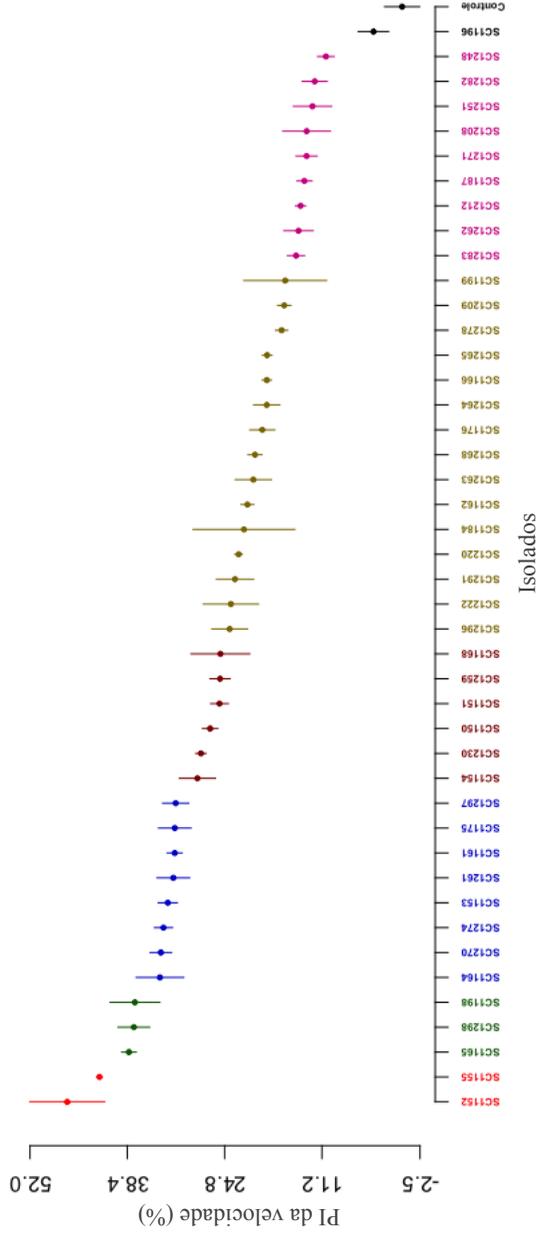
Quando avaliado o PI da velocidade de *S. cepivorum*, praticamente todos os fungos considerados competidores e antibióticos foram eficientes, com apenas um isolado (SC1172) na classe dos competidores não diferindo estatisticamente do tratamento controle ($p < 0,05$) (Figura 12). Os outros 87 isolados foram separados em 8 classes pelo teste Scott-Knott 5%. A partir do fungo SC1214 (classe vermelha), todos os isolados obtiveram um percentual de redução na velocidade do crescimento micelial de *S. cepivorum* acima de 30%, destacando-se os SC1165, SC1155, SC1152 e SC1261, com reduções de 67%, 64%, 62% e 59% respectivamente, quando comparados ao controle.

Figura 10 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo antibiose. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.



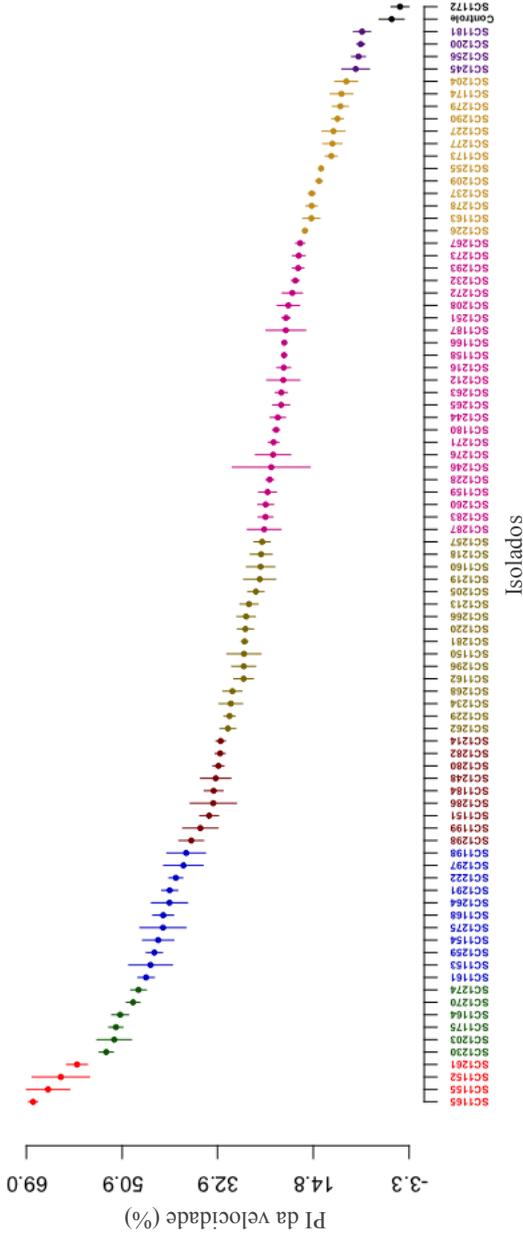
Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 11 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.



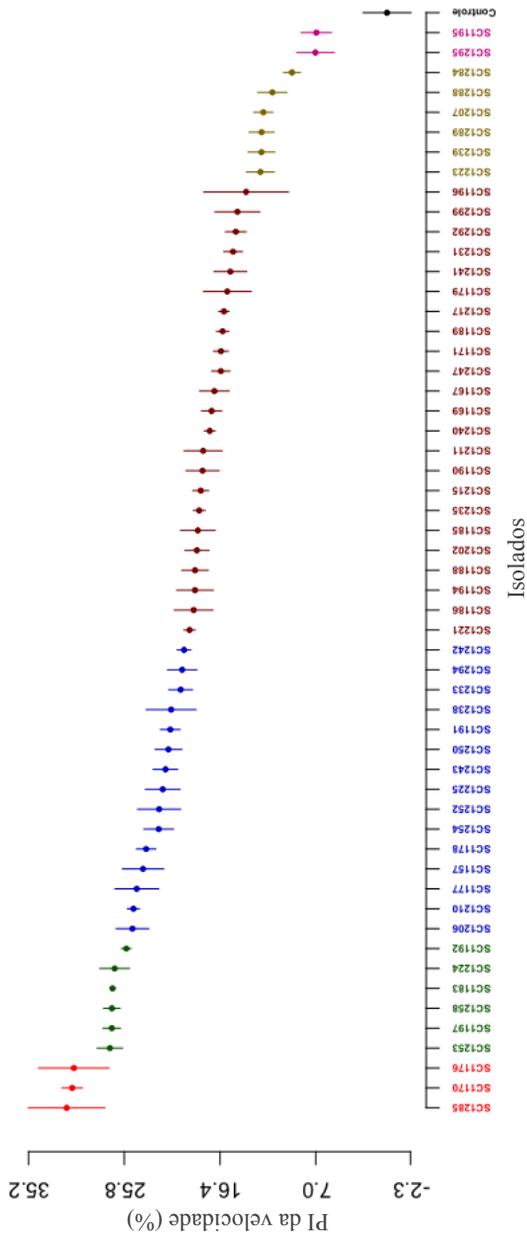
Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 12 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 13 - Inibição da velocidade do crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo antibiose. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

A análise dos fungos antibióticos contra *S. cepivorum*, todos os 55 isolados foram diferentes do controle, se mostrando eficientes a partir de um percentual de 6% (SC1195) e 7% (SC1295) ($p < 0,001$) de redução (Figura 13). As três principais classes de isolados, separados pelo teste Scott-Knott 5%, possuem intervalos de PI da velocidade que variam de 19% a 31,5%, valores atrelados aos isolados SC1242 (classe azul) e SC1285 (classe laranja), respectivamente.

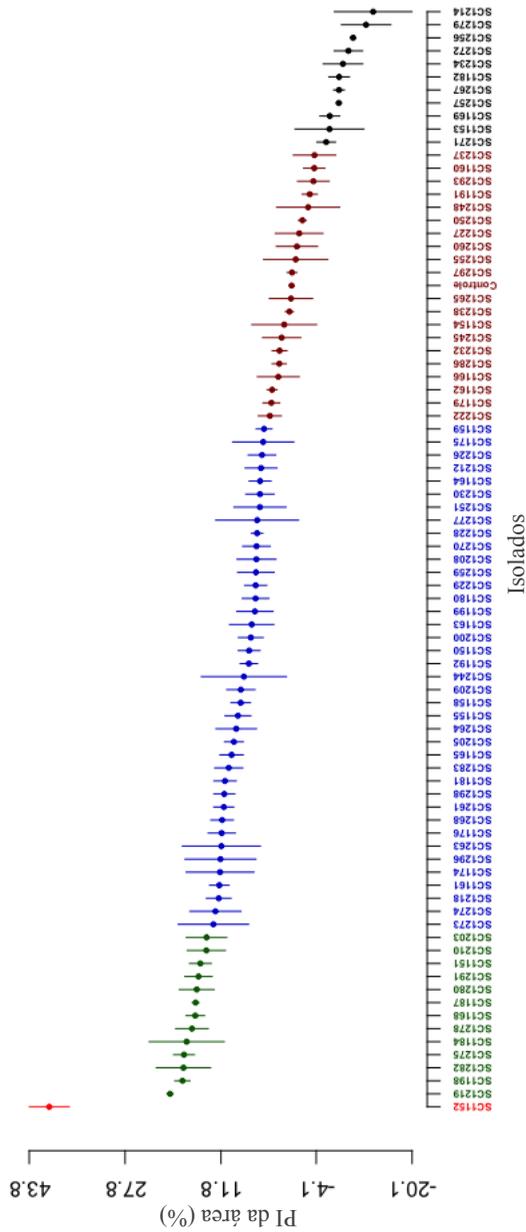
Os dados de IVCM utilizados para geração do PI da velocidade dos três fitopatógenos podem ser visualizados nos gráficos de caixas dos Apêndices A-I a A-III.

A AACCM foi considerada o parâmetro mais importante para determinação dos isolados de solo que são de fato controladores dos fitopatógenos, tendo em vista que ela é um índice que avalia a área total de crescimento do fungo a partir do somatório das médias de crescimento diário em função do tempo entre as avaliações. Dessa forma, a partir desse índice, utilizado para o cálculo e geração dos gráficos do percentual de inibição da área de crescimento dos fitopatógenos, foi possível verificar que houve uma diferença em relação não só à análise qualitativa dos isolados, como também em relação aos percentuais de inibição da velocidade dos fitopatógenos para cada fungo de solo testado.

Para *S. sclerotiorum*, dos fungos considerados competidores, 53 dos 84 isolados foram capazes de reduzir a área de crescimento para o patógeno de planta acima citado (Scott-Knott 5%). O percentual mínimo de redução que fez com que houvesse diferenciação estatística entre os grupos efetivos e não efetivos para este índice foi de 4% de inibição de área (SC1159) (Figura 14). O valor máximo de inibição entre os isolados pertencentes ao grupo dos competidores foi de 40% (SC1152), quando comparado ao tratamento controle.

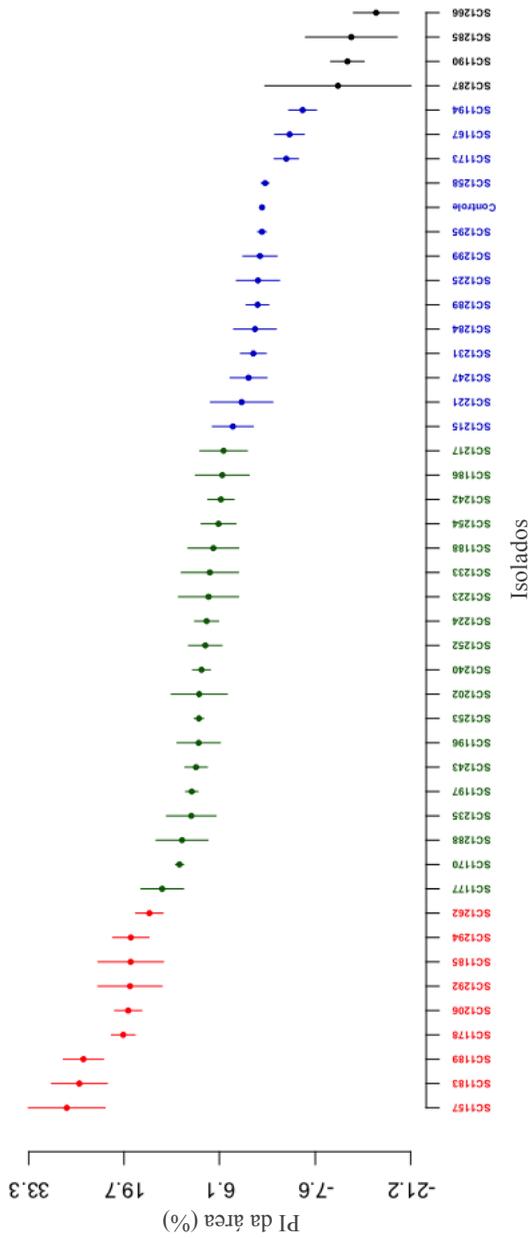
No que diz respeito ao grupo de isolados qualificados como antibióticos para este mesmo fitopatógeno, pouco mais da metade (28 dos 45 avaliados) se diferenciaram ou apresentaram valores de redução de área maiores do que o tratamento controle (Figura 15). Destes, duas classes apenas foram separadas como efetivas, a primeira (classe verde) agrupou os isolados que representaram um percentual de inibição acima de 5% (SC1247) até 14% (SC1262), enquanto a segunda classe (laranja), que corresponde aos isolados com maior capacidade de redução de área de *S. sclerotiorum*, possui um intervalo de PI entre 16% e 27%.

Figura 14 - Inibição da área de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.



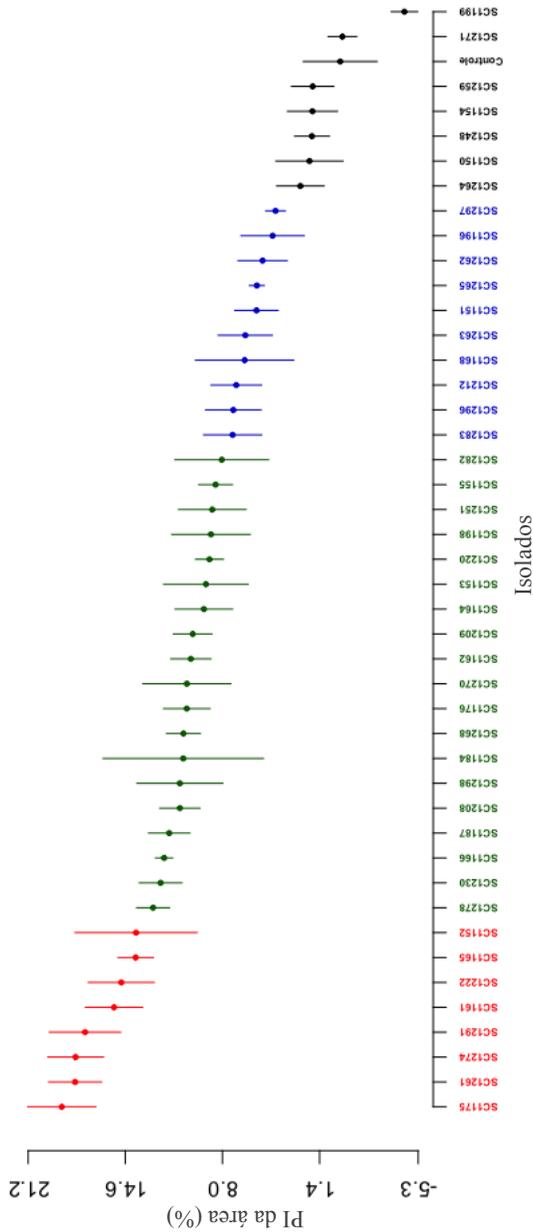
Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 15 - Inibição da área de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo antibiose. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 16 - Inibição da área de crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo competição. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

No caso do fungo *S. rolfsii*, que apresentou menor número de controladores biológicos dentro dos isolados que foram testados, apenas sete dos 44 fungos não poderiam ser utilizados em testes posteriores para determinação da sua eficiência como controladores biológicos, tendo em vista que eles não diferiram estatisticamente do tratamento controle, com dois isolados (SC1271 e SC1199) apresentando valores de área até maiores que o fitopatógeno (Figura 16).

Os outros 37 isolados desse mesmo tratamento foram separados em três classes pelo teste de Scott-Knott 5%. Todos os isolados com percentual de redução de área variando entre 4% e 7% (grupo azul) foram considerados os competidores mais fracos no teste *in vitro*. Os intermediários, representados no gráfico pela cor verde, foram todos os isolados que apresentaram PI de área entre 8% e 12% e os fungos com maior potencial no controle de *S. rolfsii* apresentaram um valor máximo de PI de 18% (SC1175) (grupo laranja) (Figura 16).

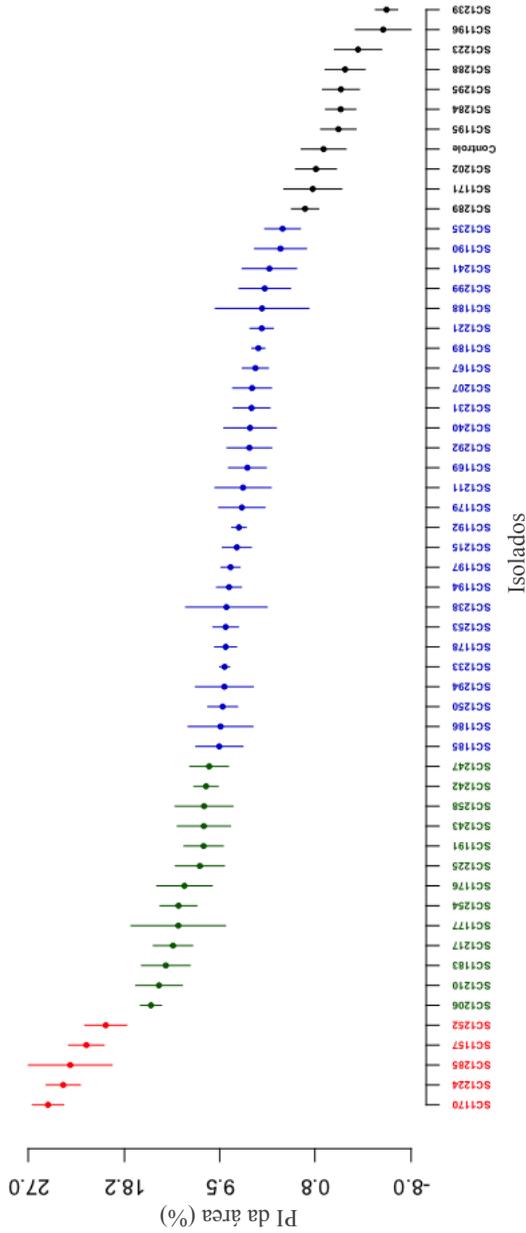
O percentual de inibição da área de crescimento de *S. cepivorum*, visualizado na figura 17, foi diferenciado em 8 grupos pelo teste de Scott-Knott para os isolados qualificados como competidores, dos quais seis apresentaram valores de PI superiores ao grupo em que se encontra o tratamento controle (grupo amarelo) (Figura 17). Dos 88 isolados testados nessa categoria, 66 foram considerados efetivos na redução do desenvolvimento da área do patógeno, sendo o menor valor (6%) atribuído ao isolado SC1271. Os três grupos mais eficientes (laranja, verde e azul) apresentaram redução da área do fungo fitopatogênico supracitado acima de 30%.

Os maiores valores, no entanto, estão associados aos isolados SC1165 (37%), SC1261 (38%) e SC1155 como o maior controlador nos testes *in vitro* do fungo *S. cepivorum*, com 47% de inibição da área de crescimento do patógeno (Figura 17).

Ainda relacionado a este mesmo patógeno, dos 55 isolados que foram classificados como biocontroladores do tipo antibiose, 45 foram efetivos, mesmo que o mínimo de redução tenha sido de 3% (SC1235), o menor valor entre os fungos dentro do grupo contendo o tratamento controle (Figura 18).

Dos três grupos efetivos (laranja, verde e azul) na figura 18, os valores médios de PI da área gerados a partir da AACCM variam de 3% a 9% para a classe menos eficiente, de 10% a 15% para a classe intermediária e de 20% a 25% para o grupo mais eficiente. Os isolados SC1289, SC1171, SC1202, SC1195, SC1284, SC1295, SC1288, SC1223, SC1196 e SC1239 foram os fungos que permaneceram na

Figura 18 - Inibição da área de crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* quando pareado com diferentes fungos de solo qualificados como controladores do tipo antibiose. O gráfico aponta em ordem decrescente os valores obtidos. As diferentes colorações indicam as diferentes classes, agrupadas de acordo com o intervalo percentual obtido com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

classe do tratamento controle, não diferindo estatisticamente dele (Figura 18).

A partir disso, as avaliações realizadas com dados de percentuais de inibição de crescimento da área dos fitopatógenos nos indicou que dos 129 isolados com efeito natural no PI da área de *S. sclerotiorum*, 81 teriam o potencial para avançar nas pesquisas biotecnológicas enquanto, para *S. cepivorum*, o número caiu de 143 para 108 e, dos 45 para *S. rolfsii*, apenas 37 estariam aptos nesse processo.

Dos dois grupos de controladores testados (competidores e antibióticos) os que apresentaram valores máximos de redução de área por competição foram o SC1155, que reduziu em 47% o desenvolvimento de *S. cepivorum* e o SC1152 que atingiu PI da área de crescimento de 40% contra *S. sclerotiorum*. Os isolados classificados como competidores do tipo antibiose apontaram fungos que são capaz de reduzir o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* em 27% (SC1157) e de *S. cepivorum* em 25% (SC1170). Para *S. rolfsii* o máximo de redução obtido foi de 18% para o competidor SC1175.

Os dados da AACCM utilizados para geração do PI da área dos três fitopatógenos pode ser visualizado nos gráficos de caixas dos Apêndices B-I a B-III.

Nos últimos anos tem havido uma crescente demanda por microrganismos capazes de controlar fitopatógenos, entretanto há uma grande divergência nas metodologias propostas para essa finalidade. Em seu artigo de revisão, Pliego *et al.* (2011) observaram que há a necessidade de metodologias com abordagens mais eficientes na prospecção de potenciais biocontroladores. De acordo com o trabalho apresentado por esses mesmos autores, todas as metodologias apresentam falhas, e foram poucas as pesquisas capazes de uma abordagem mais complexa para avaliar essa relação existente entre microrganismos, levando em consideração uma maior quantidade de fatores associados ao seu desenvolvimento.

Até que possam ser utilizados em escala comercial, existe uma grande quantidade de passos que devem ser seguidos, como identificação do patógeno no cultivo de interesse, prospecção de microrganismos que possuam relação ecológica com o patógeno e isolamento dos mesmos, análise do desenvolvimento dos isolados, identificação, testes de controle *in vitro*, *in vivo* e *in situ*, produção em larga escala, dentre outras (KÖHL *et al.*, 2011).

É importante salientar que, por menor que sejam os aspectos avaliados nessa perspectiva, todos são relevantes. A prospecção de fungos do solo por exemplo, nos permite verificar a quantidade de

potenciais controladores biológicos para determinados microrganismos fitopatogênicos, mesmo que se apresente apenas como um critério informativo da relação patógeno-antagonista em ambiente controlado. Essa é uma característica que tem sido abordada por vários autores, e é através dela que é possível, de certa forma, a seleção dos considerados mais eficientes para a aplicação em processos biotecnológicos subsequentes. A utilização de métodos de pareamento de culturas *in vitro*, tem sido a mais utilizada por pesquisadores e ainda que apresentem algumas diferenças metodológicas, os resultados são na maioria das vezes expressos em percentual de inibição, calculado a partir da avaliação do diâmetro das colônias dos fitopatógenos (EL-KATATNY *et al.*, 2006; FERRAZ *et al.*, 2016; LANDUM *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2017; KUSHWAHA *et al.*, 2018; ZHAIR *et al.*, 2018).

Outros pesquisadores, apresentam abordagens diferentes para a avaliação qualitativa e quantitativa. Para a seleção de antagonistas contra o desenvolvimento de escleródios de *S. cepivorum*, Harrison e Stewart (1988), utilizaram o pareamento de culturas apenas como critério qualitativo para a seleção de isolados de *Trichoderma* sp. para o controle do mofo branco na cebola, através de 5 classes distintas. Entretanto, You *et al.* (2016), utilizaram a metodologia de pareamento de culturas para a seleção de biocontroladores com uma abordagem de múltiplos critérios, também através do uso de classes, mas levando em consideração três características relevantes, o potencial de micoparasitismo, o potencial como antifúngico e o potencial pra germinação de sementes. Portanto, a ausência de trabalhos que possam corroborar com os resultados apresentados nesta pesquisa está atrelada a vários fatores, principalmente a aplicação das metodologias, que deve ser ajustada às necessidades dos fungos testados e ao objetivo das pesquisas.

Uma das principais características que permite a avaliação do desenvolvimento dos fungos e as relações ecológicas nas quais estão envolvidos é a caracterização bioquímica e metabólica desses organismos. As interações recorrentes nos processos de controle biológico, por exemplo, tem início com o reconhecimento de espécies alvo pelo antagonista, desencadeando uma sequência de reações metabólicas que podem controlar ou destruir os patógenos (DAGUERRE *et al.*, 2014). Esses mesmos autores mencionam ainda que em algumas espécies de fungos, as proteínas-G, os receptores associados a elas e a enzima adenilato ciclase desempenham um papel crítico na secreção de metabólitos antibióticos e produção de enzimas

degradadoras de parede celular. Experimentos com *T. atroviride*, comprovaram que o silenciamento de um gene de proteínas-G (Gpr1), fez com que o fungo perdesse sua virulência contra o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, além de ocasionar uma regulação negativa nos genes codificadores de quitinases (nag1 e ech42) e de protease (prb1), genes com ação reconhecida no processo de micoparasitismo (OMANN *et al.*, 2012).

Para os isolados considerados competidores, a diferença existente entre eles no que se refere à virulência contra os fitopatógenos em questão pode estar relacionado à concentração de enzimas específicas, como quitinases, proteases e glucanases. Sharma *et al.* (2017) verificaram que o fungo de solo *T. harzianum* apresentava um alto potencial como controlador dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *Colletotrichum truncatum* e *C. capsici*, e a análise da taxa de expressão gênica, para enzimas envolvidas no processo de competição/micoparasitismo realizada por eles para cada fitopatógeno, indicaram maiores regulações gênicas para quitinases, proteases e glucanases, respectivamente.

Outros estudos também apontaram para o fato de que os isolados de *Trichoderma* sp. que apresentaram maiores taxas de regulação gênica para quitinases, proteases e glucanases seriam mais eficientes para o controle de fitopatógenos como *S. sclerotiorum* (STEINDORFF *et al.*, 2014) e *F. oxysporum* (LÓPEZ-MONDÉJAR *et al.*, 2011).

Quando se adiciona às características supracitadas, a existência de compostos voláteis produzidos por fungos do solo (MORATH *et al.*, 2012), a produção de metabólitos secundários agindo como antibiose, a produção de enzimas detoxificadoras que fornecem proteção aos fungos contra substâncias produzidas por patógenos (DAGUERRE *et al.*, 2014), além de um conjunto de outros fatores bióticos e abióticos, é esperado que os resultados encontrados em laboratório, para os 150 isolados testados, possam apresentar alguma divergência nas etapas seguintes do processo de obtenção de um biocontrolador efetivo, o que de certa forma, adiciona um peso ainda maior à importância da prospecção de fungos biocontroladores de doenças de plantas.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, não é possível realizar qualquer afirmação de como a comunidade de fungos se comporta em relação à composição química do solo nos diferentes ecossistemas. Entretanto, a realização de estudos mais precisos nessa área pode gerar informações importantes sobre a influência de determinados macro e micronutrientes no desenvolvimento da micobiota.

Com os testes de controle biológico contra os fungos *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* e *S. cepivorum* foi possível verificar, através dos parâmetros qualitativos e quantitativos, identificar como a comunidade edáfica de fungos se comporta em relação aos processos ecossistêmicos que norteiam a manutenção da mesma. Essa relação se caracteriza pela manutenção do equilíbrio dinâmico que permite o desenvolvimento, em níveis reduzidos de fitopatógenos, através da presença de grupos de fungos que atuam como controladores naturais.

A caracterização qualitativa, ainda que auxilie em respostas mais pontuais no que diz respeito à avaliação das comunidades de fungos quanto ao tipo de biocontrole exercido em cada fitopatógeno, não consegue fornecer parâmetros suficientes para a separação entre organismos mais ou menos eficientes, sendo então necessário que se apresente resultados quantitativos capazes de indicar aqueles considerados mais aptos para os avanços nos estudos de geração de processos e produtos biotecnológicos.

Dessa forma, podemos concluir que há um grande potencial na comunidade de fungos de solo para a utilização como controladores biológicos de fungos fitopatogênicos. A prospecção realizada neste trabalho nos fornece resultados, no mínimo reveladores quanto ao alto percentual de organismos provenientes de uma única localidade que poderiam ser utilizados em estudos que visem a produção e comercialização de produtos biológicos com essa finalidade.

O trabalho desenvolvido confirma ainda, que os fungos de solo não só possuem métodos de ação diferentes contra os fitopatógenos como também apresentam variação em eficiência. Alguns isolados foram considerados competidores contra *S. sclerotiorum*, produtores de substâncias inibitórias no desenvolvimento de *S. cepivorum* e sem qualquer efeito em *S. rolfsii*. Toda essa avaliação justifica não só a continuidade deste trabalho, testando os passos seguintes no processo de desenvolvimento de um produto biológico, para ser usado na agricultura, como também fornece resultados importantes para a continuidade da prospecção de microrganismos de solo para aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

ALFAIA, S. S.; UGUEN, K. 2013. Fertilidade e manejo do solo. p. 77-90. In: MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STÜRMER, S. L. (eds.). **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. UFLA, 2013.

ALFENAS, A. C.; FERREIRAS, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. 2007. Isolamento de fungos fitopatogênicos. p. 53-90. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (org.). **Métodos em fitopatologia**. Editora UFV, v. único.

ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. 1998. p. 21-26. In: ALVES, S. B. (org.). **Controle microbiano de insetos**. FEALQ, v. 4, Piracicaba – SP.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635p.

AMORIM, L. 2011. Infecção. p. 295-308. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (org.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Editora Agronômica Ceres Ltda, v. 1.

BAI, Z.; CASPARI, T.; GONZALEZ, M. R.; BATJES, N. H.; MÄDER, P.; BÜNEMANN, E. K.; GOEDE, R.; BRUSSAARD, L.; XU, M.; FERREIRA, C. S. S.; REINTAM, E.; FAN, H.; MIHELÍČ, R.; GLAVAN, M.; TÓTH, Z. Effects of agricultural management practices on soil quality: a review of long-term experiments for Europe and China. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 265, p. 1-7, 2018.

BHATTACHARYYA, P. N.; GOSWAMI, M. P.; BHATTACHARYYA, L. H. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: a review. **Journal of Phytology**, v. 8, p. 26-41, 2016.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BUÉE, M.; MAURICE, J. P.; ZELLER, B.; ANDRIANARISOA, S.; RANGER, J.; COURTECUISSÉ, R.; MARÇAIS, B.; LE TACON, F. Influence of tree species in richness and diversity of epigeous fungal communities in a French temperate forest stand. **Fungal Ecology**, v. 4, p. 22-31, 2011.

BUENO-PALLERO, F.; COELHO, L.; DUARTE, J.; REIS, M.; GUERRERO, C.; DIONÍSIO, L. Uso de fungos antagonistas no controlo de doenças de plantas. **Actas Portuguesas de Horticultura**, n. 25, p. 133–137, 2016.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. Introduction to Plant Disease Epidemiology. **John Wiley and Sons: New York**, 523p., 1990.

CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v. 106, p. 73-79, 1989.

CASAZZA, G.; LUMINI, E.; ERCOLE, E.; DOVANA, F.; GUERRINA, M.; AMULFO, A.; MINUTO, L.; FUSCONI, A.; MUCCIARELLI, M. The abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi are linked to the soil chemistry of screes and to slope in the Alpic paleo-endemic *Berardia subacaulis*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–18, 2017.

CAVALCANTI, V. P.; ARAÚJO, N. A. F.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASQUAL, M.; DÓRIA, J. *Athelia (Sclerotium) rolfsii* in *Allium sativum*: potencial biocontrol agents and their effects on plant metabolites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3949-3962, 2018.

CHAVERRI, P.; BRANCO-ROCHA, F.; JAKLITSCH, W.; GAZIS, R.; DEGENKOLB, T.; SAMUELS, G. J. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the reidentification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v. 107, p. 558–590, 2015.

CIRAM; EPAGRI. Zoneamento agroecológico e socioambiental do estado de Santa Catarina. Disponível em: <http://ciram.epagri.sc.gov.br/images/documentos/ZonAgroecoMapas.pdf>. Acesso em 08 de setembro de 2017.

DAGUERRE, Y.; SIEGEL, K.; EDEL-HERMANN, V.; STEINBERG, C. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. **Fungal Biology Reviews**, v. 28, p. 97-125, 2014.

EL-KATATNY, M. H.; ABDELZAHER, H. M. A.; SHOULKAMY, M. A. Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 39, n. 4, p. 289-301, 2006.

- EL-SHARKAWY, H. H. A.; RASHAD, Y. M.; IBRAHIM, S. A. Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 103, p. 84-91, 2018.
- EMBRAPA. Boletim de pesquisa e desenvolvimento: Solos do Estado de Santa Catarina. **EMBRAPA Solos**, n. 46, p. 1-745, 2004.
- FERRAZ, L. P.; CUNHA, T.; SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, v. 188-189, p. 72-79, 2016.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**. v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.
- GELORINI, V.; VERBEKEN, A.; LENS, L.; EGGERMONT, H.; ODGAARD, B. V.; VERSCHUREN, D. Effect of land use on the fungal spore richness in small crater-lake basins of western Uganda. **Fungal Diversity**, v. 55, p. 125-142, 2012.
- GÖRGEN, C. A.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN, V.; JUNIOR, M. L. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 44, n. 12, p. 1583-1590, 2009.
- GRANDI, R. A. P. 1999. Taxonomia de Deuteromicetos. p.141-165. In: BONONI, V. L. R. (org.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos, noções básicas e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica de São Paulo. v. único.
- GROSSART, H.; ROJAS-JIMENEZ, K. Aquatic fungi : targeting the forgotten in microbial ecology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, p. 140–145, 2016.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.
- HARRISON, Y. A.; STEWART, A. Selection of fungal antagonists for biological control of onion white rot in New Zealand. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v. 16, n. 3, p. 249-256, 1988.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422–1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 888–891, 1997.

HEYDARI, A.; PESSARAKLI, M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 273-290, 2010.

HIRPARA, D. G.; GAJERA, H. P.; HIRPARA, H. Z.; GOLAKIYA, B. A. Antipathy of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Sacc.: evaluation of cell wall-degrading enzymatic activities and molecular diversity analysis of antagonists. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 22-28, 2017.

HULEIHEL, M.; SHUFAN, E.; TSROR, L.; LAPIDOT, I.; MORDECHAI, S.; SALMAN, A. Differentiation of mixed soil-borne fungi in the genus level using infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 180, p. 155-165, 2018.

HUSSAIN, W. A.; ELZAAWELY, A. A.; EL SHEERY, N. I.; ISMAIL, A. A.; EL-ZAHABY, H. M. Biological control of onion white rot disease caused by *Sclerotium cepivorum*. **Environment, Biodiversity and Soil Security**, v. 1, p. 101-107, 2017.

IBAMA. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil. Boletins 2009-2014, Brasília, DF: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Diretoria de Qualidade Ambiental. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorio-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>. Acesso em abril de 2016.

JACKSON, A. M.; WHIPPS, J. M.; LYNCH, J. M. *In vitro* screening for the identification of potencial biocontrol agents of *Allium* white rot. **Mycological Research**, v. 95, n. 4, p. 430-434, 1991.

JACKSON, A. M.; WHIPPS, J. M.; LYNCH, J. M.; BAZIN, M. J. Effects of some carbon and nitrogen sources on spore germination, production of biomass and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* antagonistic to *Sclerotium cepivorum*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 1, p. 43-51, 1991.

JACOB, S.; SAJJALAGUDDAM, R. R.; SUDINI, H. K. *Streptomyces* sp. RP1A-12 mediated control of peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. **Journal of integrative Agriculture**, v. 17, n. 4, p. 892-900, 2018.

KATAN, J. Diseases caused by soilborne pathogens: biology, management and challenges. **Journal of plant pathology**. v. 99, n. 2, p. 305-315, 2017.

KANDULA, D. R. W.; JONES, E. E.; STEWART, A.; McLEAN, K. L.; HAMPTON, J. G. Trichoderma species for biocontrol of soil-borne plant pathogens of pasture species. **Biocontrol Science and Technology**, p. 1-25, 2015.

KHAN, M. R.; ALTAF, S.; MOHIDIN, F. A.; KHAN, U.; ANWER, A. 2009. Biological control of plant nematodes with phosphate-solubilizing microorganisms.

KÖHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P.; RUOCCO, M.; BLUM, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, v. 57, p. 1-12, 2011.

KUSHWAHA, S. K.; KUMAR, S.; CHAUDHARY, B. Efficacy of Trichoderma against *Sclerotium rolfsii* causing collar rot disease of lentil under *in vitro* conditions. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 10, n. 1, p. 307-312, 2018.

LANDUM, M. C.; FÉLIX, M. R.; ALHO, J.; GARCIA, R.; CABRITA, M. J.; REI, F.; VARANDA, C. M. R. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. **Microbiological Research**, v. 183, p. 100-108, 2016.

LEITE, C. L.; ESPOSITO, E. 2004. Fungos: estrutura e ultraestrutura. p. 9-10. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (org.). **Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. EDUCS. v. único.

LÖBMANN, M. T.; VETUKURI, R.R.; ZINGER, L.; ALSANIUS, B. W.; GRENVILLE-BRIGGS, L. J.; WALTER, A. J. The occurrence of pathogen suppressive soils in Sweden in relation to soil biota, soil properties, and farming practices. **Applied soil ecology**. v. 107, n. 1, p. 57-65, 2016.

- LOPES, K. B. A.; CARPENTIERI-PIPOLO, V.; FIRA, D.; BALATTI P. A.; LÓPEZ, S. M. Y.; ORO, T. H.; PAGLIOSA, E. S.; DEGRASSI, G. Screening of bacterial endophytes as potencial biocontrol agentes against soybean diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 1466-1481, 2018.
- LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ROS, M.; PASCUAL, J. A. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. **Biological Control**, v. 56, p. 59-66, 2011.
- MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. DA; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274–288, 2012.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MAHDIZADEHNARAGHI, R.; HEYDARI, A.; ZAMANIZADEH, H. R.; REZAEI, S.; NIKAN, J. Biological control of garlic (*Allium*) white rot disease using antagonistic fungi-based bioformulations. **Journal of Plant Protection Research**, v. 55, n. 2, p. 136-141, 2015.
- MARKOVICH, N. A; KONONOVA, G. L. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in protecting plants from fungal diseases. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 39, n. 4, p. 389–400, 2015.
- MATROUDI, S.; ZAMANI M. R.; MOTALLEBI, M. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. **Egyptian Journal of Biology**, v. 11, p. 37-44, 2009.
- MCLAUGHLIN, D. J.; HIBBETT, D. S.; LUTZONI, F.; SPATAFORA, J. W.; VILGALYS, R. The search for the fungal tree of life. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 488–497, 2009.
- MELO, V.F.; CASTILHO, R. M. V.; PINTO, L. F. S. 2009. Reserva miceral do solo. p. 252-332. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. (eds.). **Química e mineralogia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1.
- MENDONÇA, J. O. O potencial de crescimento da produção de grãos no Oeste da Bahia. **Bahia Agrícola**. v. 7, n. 2, p. 38-46, 2006.

MESQUITA, D. C. M.; FERREIRA, F. A.; MARTINS, I.; MELLO, S. C. M.; CARVALHO, D. D. C. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* do feijão comum. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 13, n. 1, p. 1–4, 2012.

MESSING, R.; BRODEUR, J. Current challenges to the implementation of classical biological control. **BioControl**, v. 63, p. 1-9, 2018.

MONCALVO, J. M. 1997. Evaluation of fungal biological diversity in the tropics: systematics perspectives. p. 1-27. In: JANARDHANAN, K. K.; RAJENDRAN, C.; NATARAJAN, K.; HAWKSWOTH, D. L. (eds.). **Tropical mycology**. Science Publisher, v. único.

MOORE, D.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J. **21st Century Guidebook to Fungi**. Cambridge University Press, v. único, p. 5, 2014.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 73-83, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; CAMPOS, C. R. A. 2013. Micro-organismos. p. 203-223. In: MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STÜRMER, S. L. (org.). **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. UFLA, v. único.

MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R. B.; STÜRMER, S. L. 2013. O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. p. 15-30. In: MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STÜRMER, S. L. (org.). **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. UFLA, v. único.

MORRIEN, E.; HANNULA, S. E.; SNOEK, L. B.; HELMSING, N. R.; ZWEERS, H.; HOLLANDER, M.; SOTO, R. L.; BOUFFAUD, M. L.; BUE´E, M.; DIMMERS, W.; DUYS, H.; GEISEN, S.; GIRLANDA, M.; GRIFFITHS, R. I.; JØRGENSEN, H. B.; JENSEN, J.; PLESSART, P.; REDECKER, D.; SCHMELZ, R. M.; SCHMIDT, O.; THOMSON, B. C.; TISSERANT, E.; UROZ, S.; WINDING, A.; BAILEY, M. J.; BONKOWSKI, M.; FABER, J. H.; MARTIN, F.; LEMANCEAU, P.; BOER, W. D.; VAN VEEN, J. A.; VAN DER PUTTEN, W. H. Soil networks become more connected and take up more carbon as nature restoration progresses. **Nature Communications**, v. 8, p. 1-10, 2017.

MUKHERJEE, P. K.; LATHA, J.; HADAR, R.; HORWITZ, B. A. Role of two G-Protein alpha subunits, TgaA and TgaB, in the Antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 542-549, 2004.

MUTHUMEENAKSHI, S.; SREENIVASAPRASAD, S.; ROGERS, C. W.; CHALLEN, M. P.; JOHN M. WHIPPS, J. M. Analysis of cDNA transcripts from *Coniothyrium minitans* reveals a diverse array of genes involved in key processes during sclerotial mycoparasitism. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 1262-1284, 2007.

MYCOBANK^(a); International Mycological Association. *Sclerotinia sclerotiorum*. Disponível em:
<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=24988&Fields=All>. Acesso em 15 de janeiro de 2019.

MYCOBANK^(b); International Mycological Association. *Sclerotium cepivorum*. Disponível em:
<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=25030&Fields=All>. Acesso em 15 de janeiro de 2019.

MYCOBANK^(c); International Mycological Association. *Sclerotium rolfssii*. Disponível em:
<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=29508&Fields=All>. Acesso em 15 de janeiro de 2019.

NEVES, M. C. P. 1992. Como os microrganismos do solo obtêm energia e nutrientes. p. 18-31. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (org.). **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**, v. único.

O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J.; VILGALYS, R. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, 2005.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). **Ciência e Prática**, v. 16, p. 42-47, 1992.

OMANN, M. R.; LEHNER, S.; RODRÍGUEZ, C. E.; BRUNNER, K.; ZEILINGER, S. The seven-transmembrane receptor Gpr1 governs processes relevant for the antagonist interaction of *Trichoderma atroviride* with its host. **Microbiology**, v. 158, p. 107-118, 2012.

OWLEY, B. H.; WINDHAM, M. T. 2010. Controle biológico de fitopatógenos. p. 447-459. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. (orgs.). **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório**. Artmed, v. único

PARRA, J. R. P. O controle biológico e o manejo de pragas: passado, presente e futuro. 2000. p. 60. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. (orgs.). **Bases e técnicas do manejo integrado de insetos**. Departamento de Defesa Fitossanitária, Santa Maria – RS.

PASTRANA, A. M.; BASALLOTE-UREBA, M. J.; AGUADO, A.; AKDI, K.; CAPOTE, N. Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. **Phytopathologia Mediterranea**. v. 55, n. 1, p. 109-120, 2016.

PFENNING, L. H. 2013. Fungos do solo. p. 273-287. In: MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STÜRMER, S. L. (org.). **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. UFLA, v. único.

PLIEGO, C.; RAMOS, C.; VICENTE, A.; CAZORLA, F. M. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. **Plant Soil**, v. 340, p. 505-520, 2011.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Os reinos dos fungos. **EDUNISC: Santa Cruz do Sul**. v. 2, p. 617, 2002.

RABOT, E.; WIESMEIER, M.; SCHLÜTER, S.; VOGEL, H. J. Soil structure as an indicator of soil functions: a review. **Geoderma**, v. 314, p. 122-137, 2018.

RAJESH, R. W.; RAHUL, M. S.; AMBALAL, N. S. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952–1965, 2016.

ROESE, A. D.; VIDAL, G. S.; ZIELINSKI, E. C.; MAY DE MIO, L. L. Native *Trichoderma* grown on oat grains controls damping-off and enhances height in soybean. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 1, p. 102–109, 2017.

SANTOYO, G.; PACHECO, C. H.; SALMERÓN, J. H.; HERNÁNDEZ-LEÓN, R. The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture: a review. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2017.

- SARAVANAKUMAR, K.; YU, C.; DOU, K.; WANG, M.; LI, Y.; CHEN, J. Biodiversity of *Trichoderma* Community in the Tidal Flats and Wetland of Southeastern China. **Plos One**, v. 11, n. 12, p. 1-18, 2016.
- SEIFERT, K.; MORGAN-JONES, G.; GAMS, W.; KENDRICK, B. The genera of hyphomycetes. **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre**, v. único, p. 5-6, 2011.
- SETHI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Screening of biocontrol potential of indigenous *Bacillus* spp. isolated from rice rhizosphere against *R. solani*, *S. oryzae*, *S. rolfsii*, and response towards growth of rice. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 41-53, 2018.
- SHAFIQUE, H. A., SULTANA, V., EHTESHAMUL-HAQUE, S., & ATHAR, M. Management of soil-borne diseases of organic vegetables. **Journal of Plant Protection Research**, v. 56, n. 3, p. 221–230. 2016.
- SHARMA, V.; SALWAN, R.; SHARMA, P. N.; KANWAR, S. S. Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: universal yet host specific response. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 72-79, 2017.
- SMITH, S. N.; PRINCE, M.; WHIPPS, J. M. Characterization of *Sclerotinia* and mycoparasite *Coniothyrium minitans* interaction by microscale co-culture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 128-133, 2008.
- SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 1-12, 2018.
- SUMIDA, C. H.; DANIEL, J. F. S.; ARAUJOD, A. P. C. S.; PEITL, D. C.; ABREU, L. M.; DEKKER, R. F. H.; CANTERI, M. G. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 142-156, 2018.
- SUNDARI, S. K.; SINGH, A.; YADAVA, P. Review of Current Research Advances in Microbial and Phyto-biopesticides. **International Journal of Biotechnology and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 73–77, 2016.

- STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; COELHO, A. S. G.; MILLER, R. N. G.; PAPPAS JÚNIOR, G. J.; ULHOA, C. U.; NORONHA, E. F. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 204, p. 1-14, 2014.
- TAYLOR, D. L.; HERRIOTT, I. C.; STONE, K. E.; McFARLAND, J. W.; BOOTH, M. G.; LEIGH, M. B. Structure and resilience of fungal communities in Alaskan boreal forest soils. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 40, n. 7, p. 1288–1301, 2010.
- TSAI, S. M.; BARAIBAR, A. V. L.; ROMANI, V. L. M. 1992. Efeito de Fatores do solo. p. 59-72. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (org.). **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**, v. único.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, MATEO. Trichoderma-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2008.
- VOLPIANO, C. G.; LISBOA, B. B.; SÃO JOSÉ, J. F. B.; OLIVEIRA, A. M. R.; BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L. M. P.; VARGAS, L. K. *Rhizobium* strains in the biological control of the phytopathogenic fungi *Sclerotium* (*Athelia*) *rolfsii* on the common bean. **Plant Soil**, v. 432, p. 229-243, 2018.
- WALKER, G. M.; WHITE, N. A. 2005. Introduction to fungal physiology. p. 1-34. In: KAVANAGH, K. (ed.). **Fungi: biology and applications**. John Wiley and Sons, v. único.
- WHIPPS, J. M.; GERLAGH, M. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. **Mycological Research**, v. 96, n. 11, p. 897-907, 1992.
- WURZBURGER, N.; BROOKSHIRE, E. N. J.; MCCORMACK, M. L.; LANKAU, R. A. Mycorrhizal fungi as drivers and modulators of terrestrial ecosystem processes. **New Phytologist**, v. 213, n. 3, p. 996–999, 2017.
- YOU, J.; ZHANG, J.; WU, M.; YANG, L.; CHEN, W.; LI, G. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. **Biological Control**, v. 101, p. 31-38, 2016.

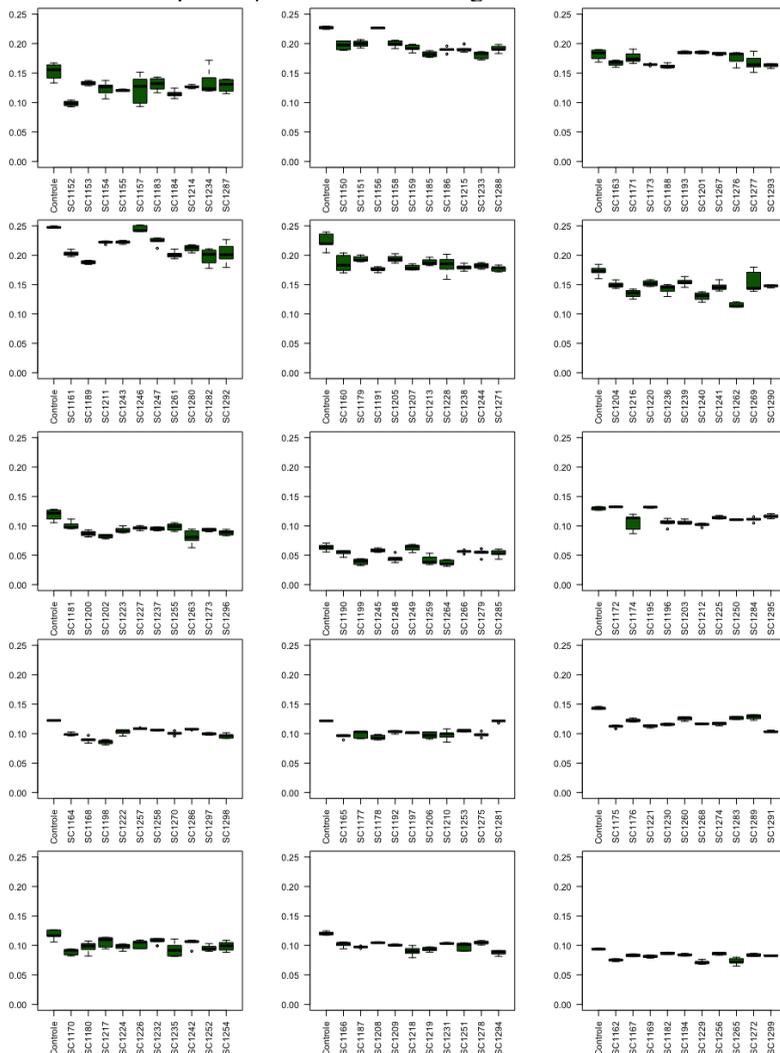
ZAK, D. R.; PREGITZER, K. S.; BURTON, A. J.; EDWARDS, I. P.; KELLNER, H. Microbial responses to a changing environment: implications for the future functioning of terrestrial ecosystems. **Fungal Ecology**, v. 4, p. 386-395, 2011.

ZENG, L. M.; ZHANG, J.; HAN, Y. C.; YANG, L.; WU, M.; JIANG, D. H.; CHEN, W.; LI, G. Q. Degradation of oxalic acid by the mycoparasite *Coniothyrium minitans* plays an important role in interacting with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 2591-2610, 2014.

ZOHAIR, M. M.; EL-BEIH, A. A.; HAMED, E. R.; SEDIK, M. S. Promising biocontrol agents isolated from medicinal plants rhizosphere against root-rot fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 11-18, 2018.

APÊNDICES

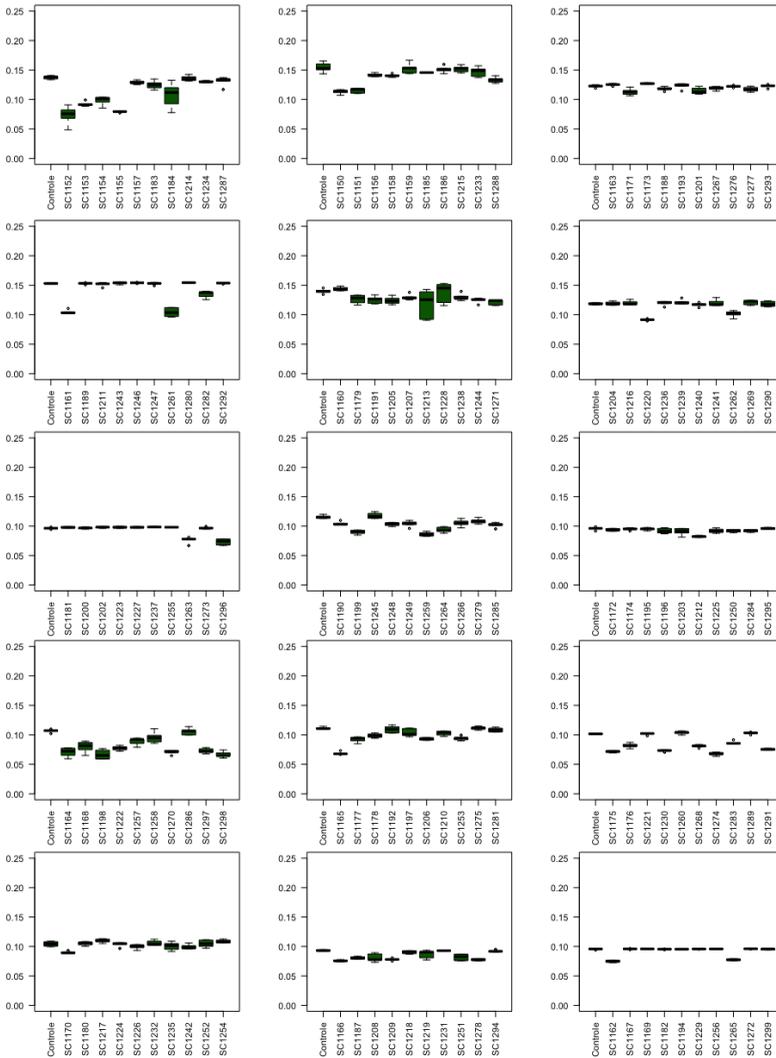
APÊNDICE A-I. Índice de velocidade crescimento micelial de *S. sclerotiorum* na presença de diferentes fungos de solo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Legenda: Cada gráfico de caixa possui sua própria testemunha (Controle) e informações dos valores de IVCM de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de 10 diferentes fungos isolados do solo. As identificações dos eixos x, se referem aos códigos de herboração dos isolados.

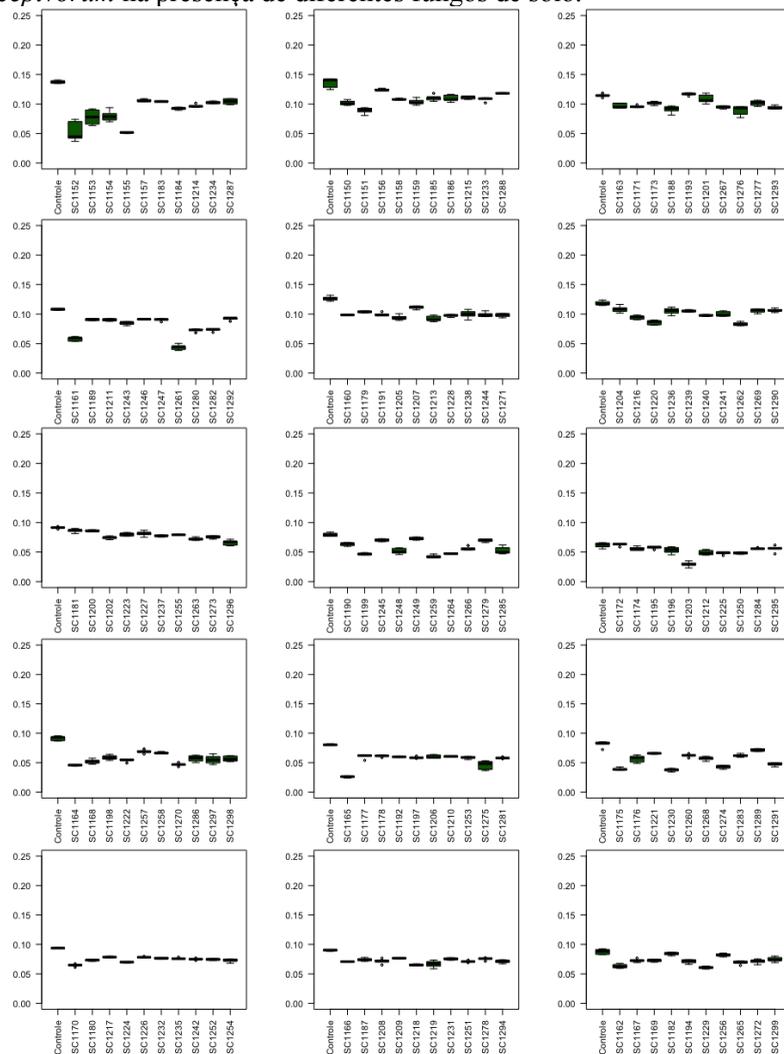
APÊNDICE A-II. Índices de velocidade do crescimento micelial de *S. rolfsii* na presença de diferentes fungos de solo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Legenda: Cada gráfico de caixa possui sua própria testemunha (Controle) e informações dos valores de IVCM de *Sclerotium rolfsii* na presença de 10 diferentes fungos isolados do solo. As identificações dos eixos x, se referem aos códigos de herborização dos isolados.

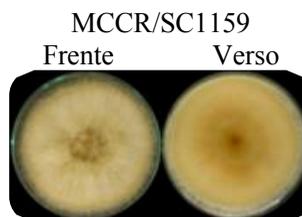
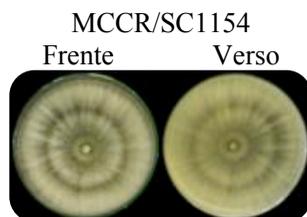
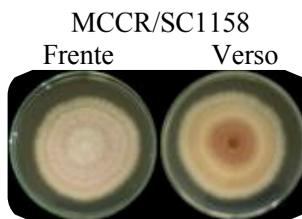
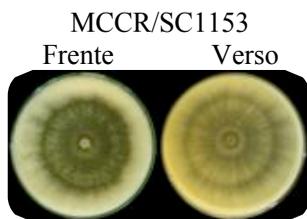
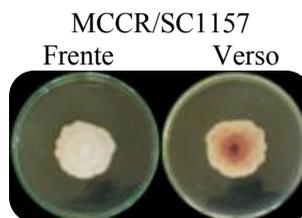
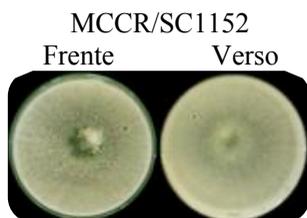
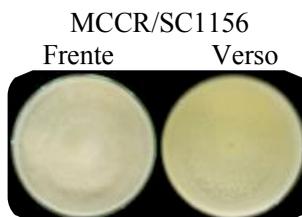
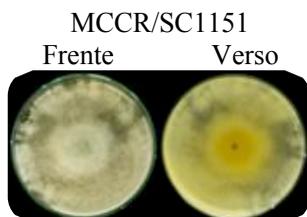
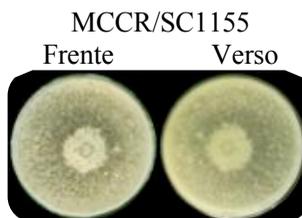
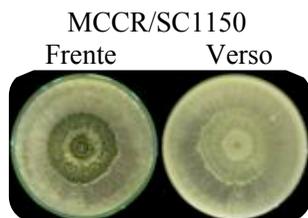
APÊNDICE A-III. Índices de velocidade do crescimento micelial de *S. cepivorum* na presença de diferentes fungos de solo.

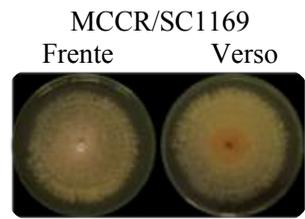
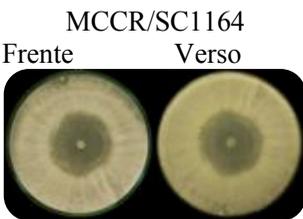
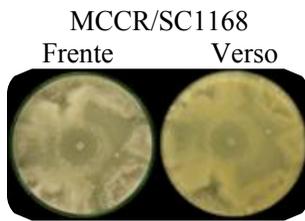
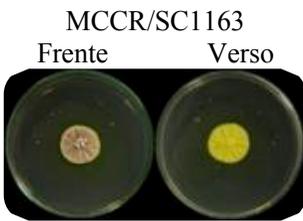
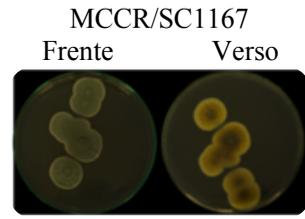
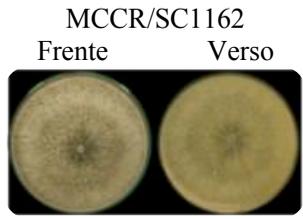
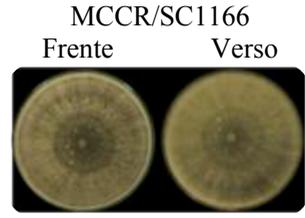
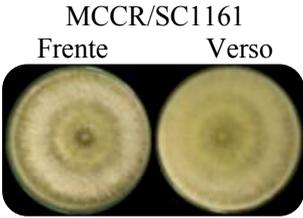
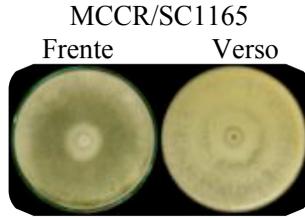
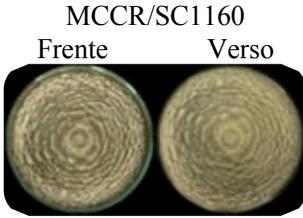


Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Legenda: Cada gráfico de caixa possui sua própria testemunha (Controle) e informações dos valores de IVCm de *Sclerotium cepivorum* na presença de 10 diferentes fungos isolados do solo. As identificações dos eixos x, se referem aos códigos de herborização dos isolados.

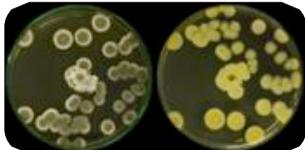
APÊNDICE C – Fotos das colônias dos fungos de solo utilizados nos experimentos de controle biológico.





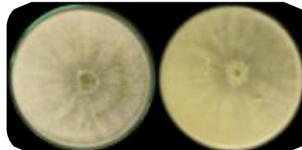
MCCR/SC1170

Frente Verso



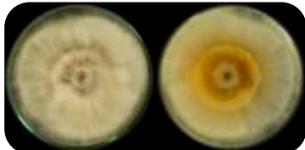
MCCR/SC1175

Frente Verso



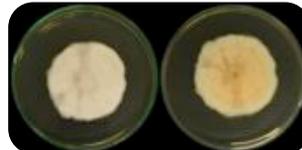
MCCR/SC1171

Frente Verso



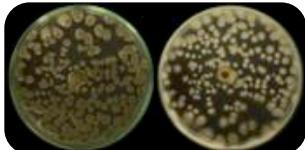
MCCR/SC1176

Frente Verso



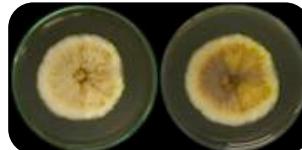
MCCR/SC1172

Frente Verso



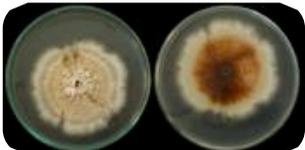
MCCR/SC1177

Frente Verso



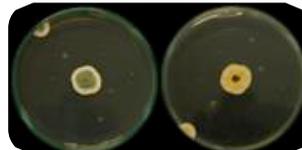
MCCR/SC1173

Frente Verso



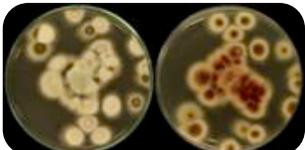
MCCR/SC1178

Frente Verso



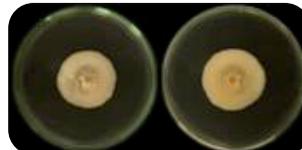
MCCR/SC1174

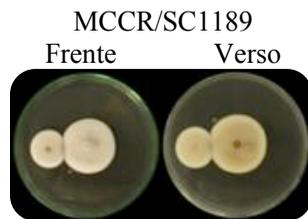
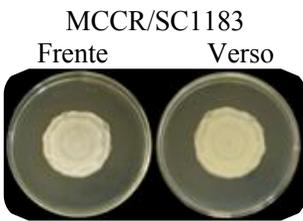
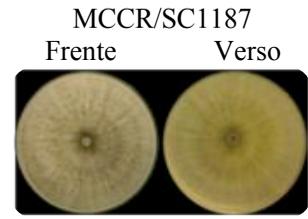
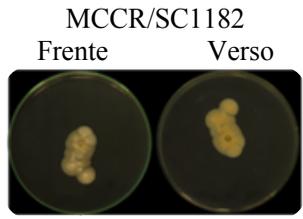
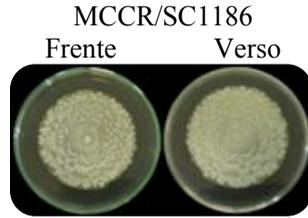
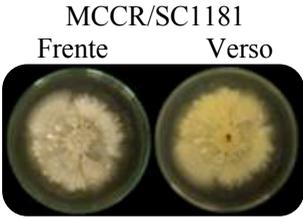
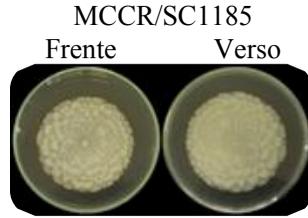
Frente Verso



MCCR/SC1179

Frente Verso





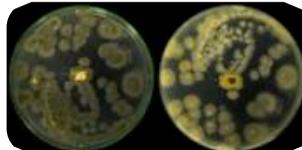
MCCR/SC1190

Frente Verso



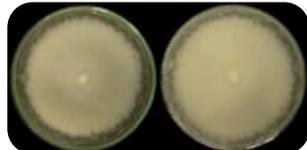
MCCR/SC1195

Frente Verso



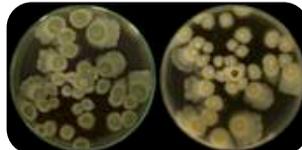
MCCR/SC1191

Frente Verso



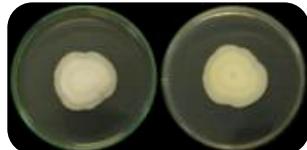
MCCR/SC1196

Frente Verso



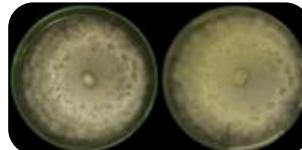
MCCR/SC1192

Frente Verso



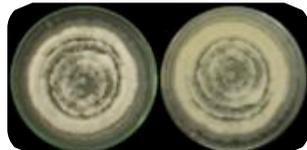
MCCR/SC1197

Frente Verso



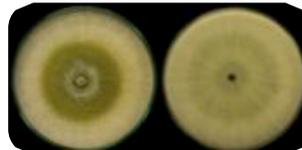
MCCR/SC1193

Frente Verso



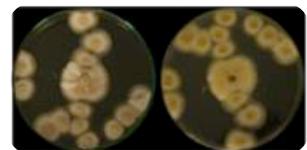
MCCR/SC1198

Frente Verso



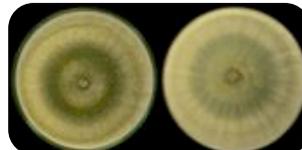
MCCR/SC1194

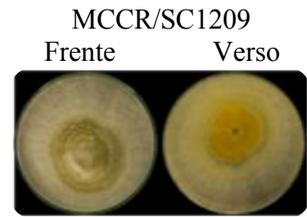
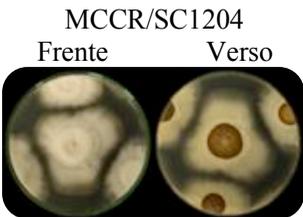
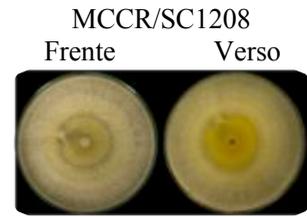
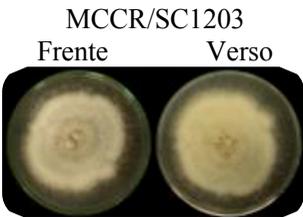
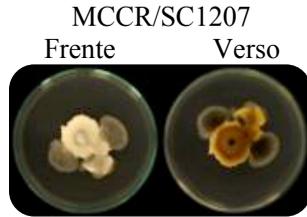
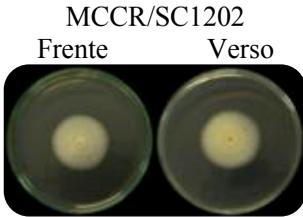
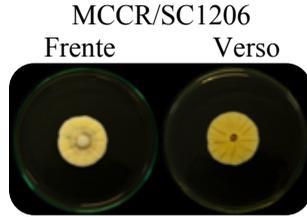
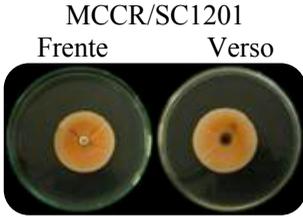
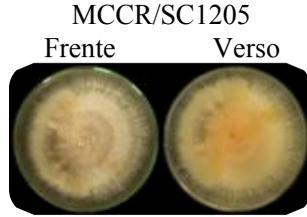
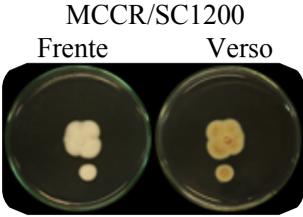
Frente Verso



MCCR/SC1199

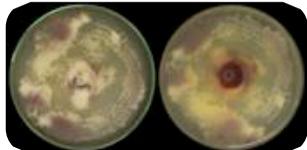
Frente Verso





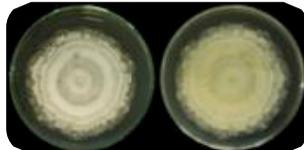
MCCR/SC1210

Frente Verso



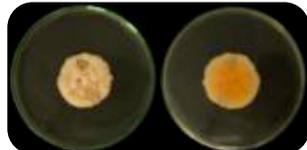
MCCR/SC1215

Frente Verso



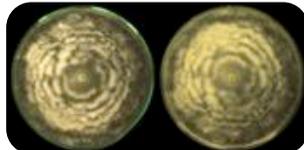
MCCR/SC1211

Frente Verso



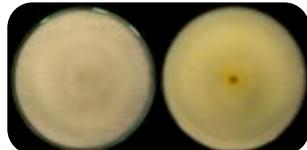
MCCR/SC1216

Frente Verso



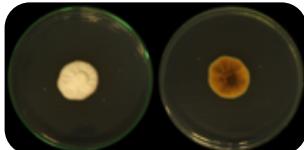
MCCR/SC1212

Frente Verso



MCCR/SC1217

Frente Verso



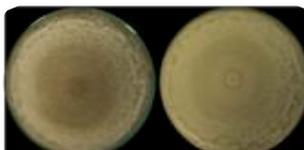
MCCR/SC1213

Frente Verso



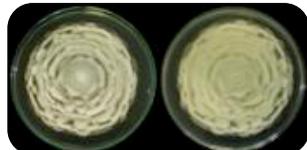
MCCR/SC1218

Frente Verso



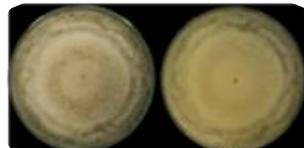
MCCR/SC1214

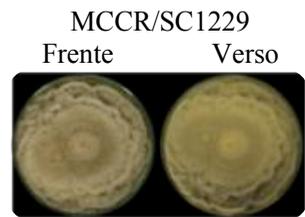
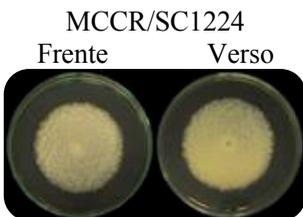
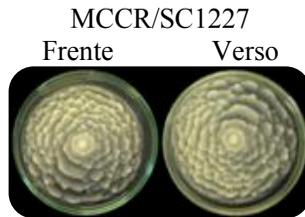
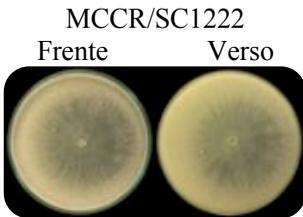
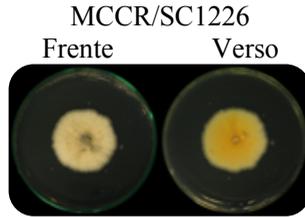
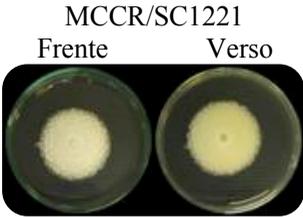
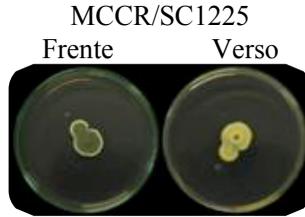
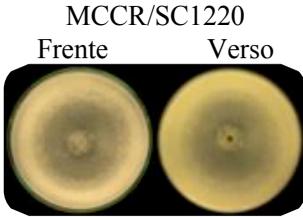
Frente Verso



MCCR/SC1219

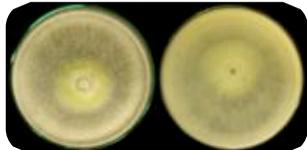
Frente Verso





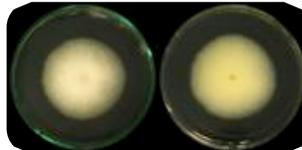
MCCR/SC1230

Frente Verso



MCCR/SC1235

Frente Verso



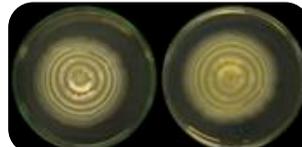
MCCR/SC1231

Frente Verso



MCCR/SC1236

Frente Verso



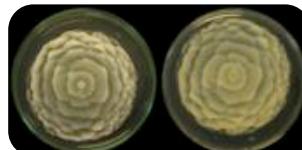
MCCR/SC1232

Frente Verso



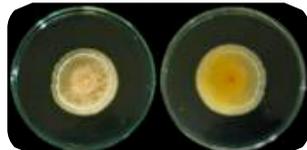
MCCR/SC1237

Frente Verso



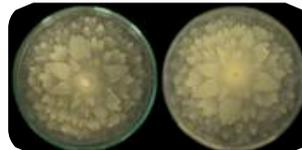
MCCR/SC1233

Frente Verso



MCCR/SC1238

Frente Verso



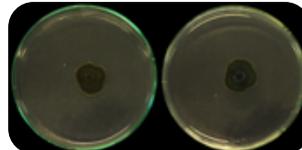
MCCR/SC1234

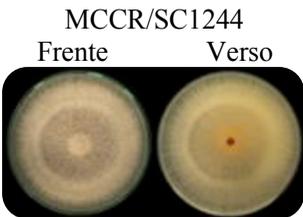
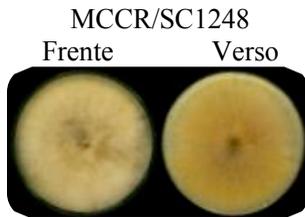
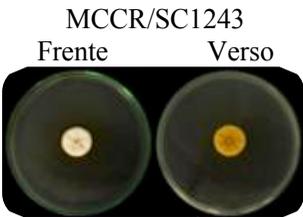
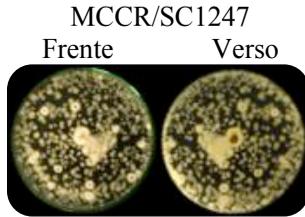
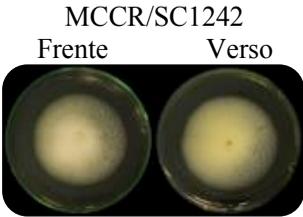
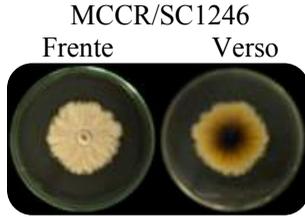
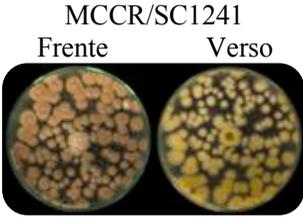
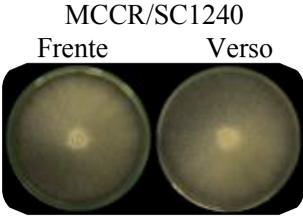
Frente Verso



MCCR/SC1239

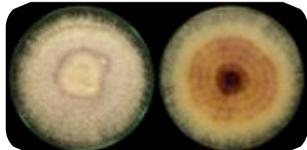
Frente Verso





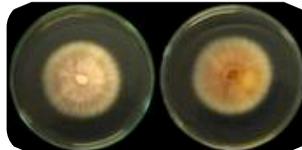
MCCR/SC1250

Frente Verso



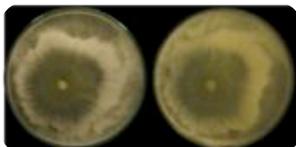
MCCR/SC1255

Frente Verso



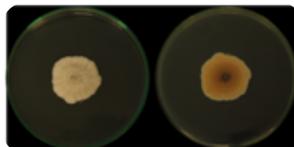
MCCR/SC1251

Frente Verso



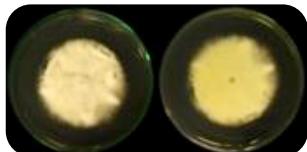
MCCR/SC1256

Frente Verso



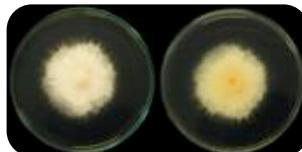
MCCR/SC1252

Frente Verso



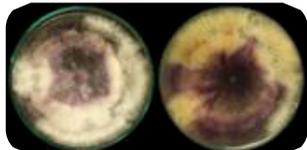
MCCR/SC1257

Frente Verso



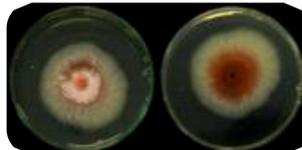
MCCR/SC1253

Frente Verso



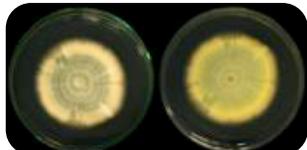
MCCR/SC1258

Frente Verso



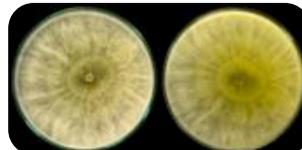
MCCR/SC1254

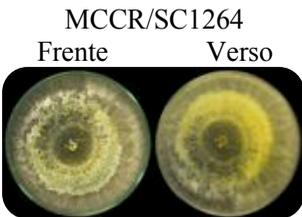
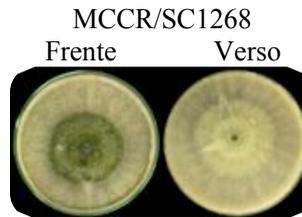
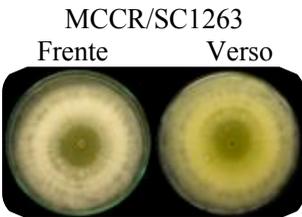
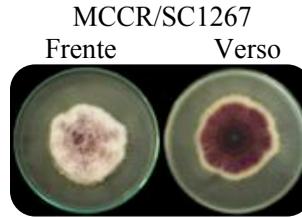
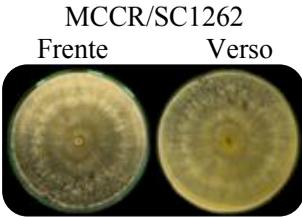
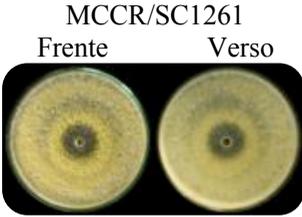
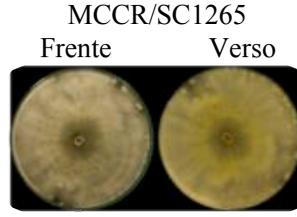
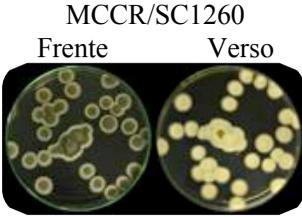
Frente Verso



MCCR/SC1259

Frente Verso





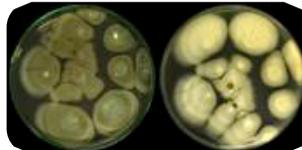
MCCR/SC1270

Frente Verso



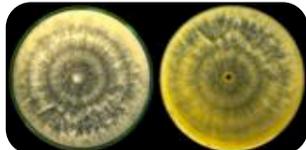
MCCR/SC1275

Frente Verso



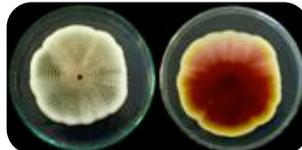
MCCR/SC1271

Frente Verso



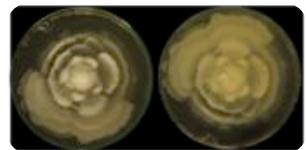
MCCR/SC1276

Frente Verso



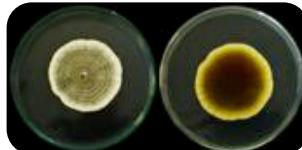
MCCR/SC1272

Frente Verso



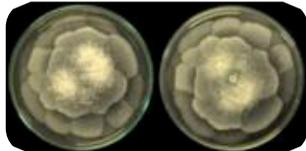
MCCR/SC1277

Frente Verso



MCCR/SC1273

Frente Verso



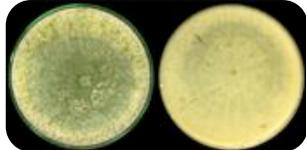
MCCR/SC1278

Frente Verso



MCCR/SC1274

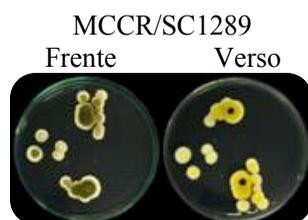
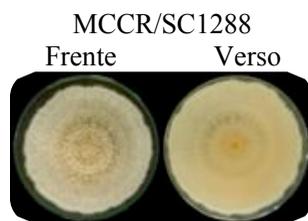
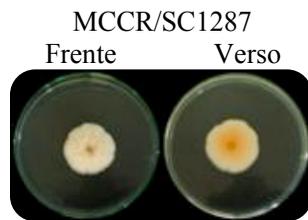
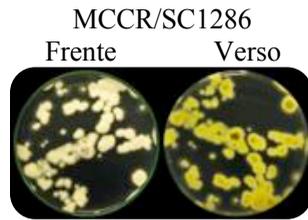
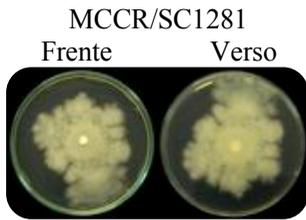
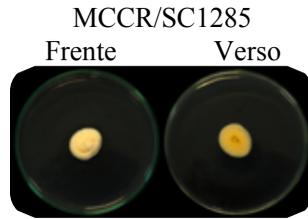
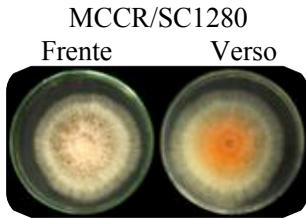
Frente Verso



MCCR/SC1279

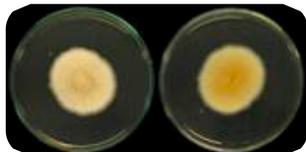
Frente Verso





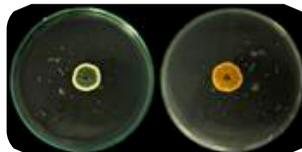
MCCR/SC1290

Frente Verso



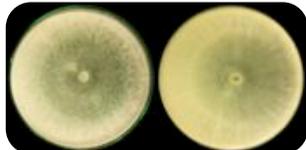
MCCR/SC1295

Frente Verso



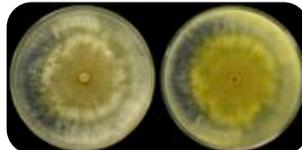
MCCR/SC1291

Frente Verso



MCCR/SC1296

Frente Verso



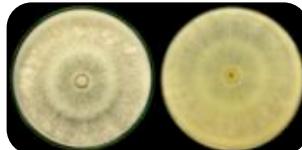
MCCR/SC1292

Frente Verso



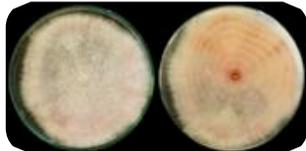
MCCR/SC1297

Frente Verso



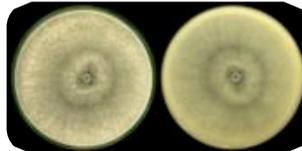
MCCR/SC1293

Frente Verso



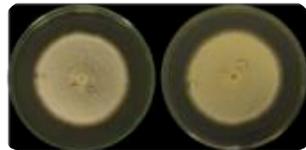
MCCR/SC1298

Frente Verso



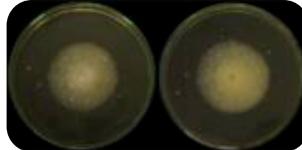
MCCR/SC1294

Frente Verso



MCCR/SC1299

Frente Verso



Fonte: Todas as imagens apresentadas neste Apêndice C foram editadas e identificadas pelo próprio autor (2018).