

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

SCHEISI NOGUEIRA NUNES

**ESTUDO DO FUNGO *Pestalotia* sp. NO CONTROLE DE
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

DOIS VIZINHOS
2018

SCHEISI NOGUEIRA NUNES

**ESTUDO DO FUNGO *Pestalotia* sp. NO CONTROLE DE
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, o curso Superior de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Pro. Dr. Maristela Rey Borin.

DOIS VIZINHOS
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que iluminou meu caminho durante esta caminhada. Aos meus pais Gilmar N. Nunes e Marisa Bacin pelo apoio e incentivo, ao meu irmão Chalder N. Nunes, pelo apoio, companheirismo, dedicação e força em todos os momentos.

Ao corpo docente da UTFPR-DV, pelos conhecimentos e orientações repassadas ao longo do curso que foram fundamentais para minha formação humana e profissional.

À minha orientadora Prof. Dr. Maristela Rey Borin, pelas oportunidades, por todo conhecimento repassado, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a elaboração desse projeto, sou muito grata por tudo.

A Prof. Ma. Lilian de Souza Vismara pelo auxílio no desenvolvimento de certas atividades e pela disposição de transferir conhecimentos e auxiliar-me.

Aos membros do Grupo do Laboratório de Fitossanidade, pelo companheirismo, amizade e ajuda ao longo desses últimos anos.

A todos que contribuíram de algum modo para realização deste trabalho.



TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO DO FUNGO *Pestalotia* sp. NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

por

SCHEISI NOGUEIRA NUNES

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) ou esta Monografia ou esta Dissertação foi apresentado(a) em 27 de NOVEMBRO de 2018 como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro(a) Agrônomo(a). O(a) candidato(a) foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof.(a) Dr.(a) Maristela Rey Borin
UTFPR-Dois Vizinhos

Prof.(a) Ma. Lilian de Souza Vismara
UTFPR-Dois Vizinhos

Ma. Thayllane de Campos Siega
UTFPR-Dois Vizinhos

Prof. Dr. Lucas Domingues
UTFPR – Dois Vizinhos

Prof.(a) Dr.(a) Angélica Signos Mendes

RESUMO

NUNES, SCHEISI NOGUEIRA. Estudo do fungo *Pestalotia sp.* no controle de fungos fitopatogênicos. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

Para a agricultura, os fungos e insetos apresentam grande acuidade, por isso deve se ter conhecimento da taxonomia e atuação destes, podendo este gerar danos as, também podem ser de extrema importância quanto ao controle biológico de alguma praga na cultura local. O objetivo foi coletar e isolar o fungo *Pestalotia sp.* para controle biológico, testar a compatibilidade para o controle de fungos fitopatogênicos de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sp.*, *Botrytis sp.* e *Colletotrichum sp.*. Os experimentos foram conduzidos em laboratório da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, realizado em duas etapas, sendo a primeira, a extração de metabólitos secundários do *Pestalotia sp.* testando sua atividade sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, e a segunda etapa, a realização do teste de antagonismo com a utilização do fungo *Pestalotia sp.* testando sua atividade antibiótica sobre *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium sp.*, *Botrytis sp.* e *Colletotrichum sp.*. Conclui-se com a realização deste trabalho que dois tratamentos resultante da extração de metabólitos teve eficiência na redução da *Sclerotinia sclerotiorum*; já no teste de antagonismo, o fungo *Colletotrichum sp.* apresentou seu valor de porcentagem de inibição de crescimento maior que os demais.

Palavras-chaves: controle alternativo, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sp.*, *Botrytis sp.* e *Colletotrichum sp.*

ABSTRACT

NUNES, SCHEISI WALNUT. Study of the fungus *Pestalotia* sp. In the control of phytopathogenic fungi. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

For agriculture, fungi and insects have great acuity, so it should be aware of the taxonomy and performance of these, which may generate damage, can also be extremely important regarding the biological control of some pest in the local culture. The objective was to collect and isolate the fungus *Pestalotia* sp. for biological control, test the compatibility for the control of phytopathogenic fungi of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp., *Botrytis* sp. and *Colletotrichum* sp.. The experiments were carried out in a laboratory of the Federal Technological University of Paraná, two neighboring campus, carried out in two stages, the first being the extraction of secondary metabolites from *Pestalotia* sp. testing its activity on *Sclerotinia Sclerotiorum*, and the second stage, the performance of the antagonistic test using the fungus *Pestalotia* sp. Testing its antibiotic activity on *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium* sp, *Botrytis* sp. and *Colletotrichum* sp.. It concludes with the accomplishment of this study that two treatments resulting from the extraction of metabolites had efficiency in the reduction of *Sclerotinia sclerotiorum*; In the antagonistic test, the fungus *Colletotrichum* sp. presented its percentage value of growth inhibition higher than the others.

Keywords: Alternative control, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp., *Botrytis* sp. and *Colletotrichum* sp.

SUMARIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	8
2 JUSTIFICATIVA	9
3 HIPÓTESE	10
4 OBJETIVOS	11
4.1 OBJETIVO GERAL	11
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	11
5 REVISÃO DE LITERATURA	12
5.4 INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM GRANDES CULTURAS	13
5.2.2. O fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	15
5.2.3. O fungo <i>Botrytis</i> sp.	15
5.2.4. O fungo <i>Colletotrichum</i> sp.....	16
5.2.5. <i>Pestalotia</i> sp.	17
5.3 <i>CONTROLE BIOLÓGICO COM FUNGOS</i>	17
5.4 <i>MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA CONTROLE DE DESENVOLVIMENTO DE PATÓGENOS</i>	18
6 MATERIAIS E MÉTODOS	18
6.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL	18
6.2 CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS	19
6.2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO <i>Pestalotia</i> sp.....	19
6.3 Contagem de esporos.....	19
6.4 Extrato de metabólitos.....	20
6.5 Teste de antagonismo.....	21
6.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
6.6.1 DIÂMETRO MÉDIO (dm, mm)	22
6.6.1 Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC, %)	22
6.6.2 Porcentagem de Inibição Antagônica (PIA, %)	23
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
7.1 Contagem de esporos.....	23
7.2 Extrato de metabólitos.....	23
7.2.1 ANOVA.....	24
7.2.2 Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC, %)	25

7.2.3	Diâmetro médio (dm, mm).....	25
7.3	Teste de antibiose	26
7.4	Porcentagem de inibição de antibiose (PIA, %)	27
8	CONCLUSÃO.....	29
9	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

Uma dificuldade comum a qualquer cultura é o ataque de pragas e doenças, presentes em diferentes fases do desenvolvimento. O controle de pragas, comumente é feito com o uso de inseticidas, sendo mais frequentes as lagartas desfolhadoras, percevejos e brocas. O uso de químicos também é feito no caso de doenças, causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus.

Um grande problema quando se refere ao controle químico, é o uso indiscriminado destes produtos. O gasto mundial anualmente de defensivos agrícolas está em aproximadamente 2,5 milhões de toneladas. No que se refere ao Brasil, aproximadamente 300 mil toneladas de defensivos agrícolas são utilizadas.

Além da poluição ambiental e gastos desnecessários, o mau uso de agroquímicos pode ser responsável pelo surgimento de uma população de indivíduos cuja seu controle torna-se mais difícil e custoso. Pensando nisso, há uma busca por alternativas que possam minimizar esse problema.

O controle biológico, juntamente com o manejo integrado de pragas é uma técnica que vem ganhando espaço ao decorrer dos anos, segundo EMBRAPA, o MIP-Soja por exemplo, vem sendo aperfeiçoado desde a década de 1970 por diferentes instituições e obteve sucesso na diminuição do uso indiscriminado de agroquímicos. No início da década de 1980, a redução média de aplicações por safra para o controle de pragas foi de mais de cinco para menos de duas no estado do Paraná. Este método tem como objetivo, controlar as pragas agrícolas e os insetos vetores de patógenos a partir do uso de seus inimigos naturais, podendo ser estes, fungos, vírus, bactérias, predadores e outros microrganismos.

Esse controle é um método natural e sadio, onde não há agressão ao meio ambiente, não deixando resíduos nos alimentos, além de diminuir as perdas na produção e gastos com agroquímicos.

Neste contexto, a utilização de inimigos naturais para o controle de pragas tem grande importância dentro de um sistema agroecológico e possui um destaque significativo em produções orgânicas. Desta forma, percebe-se que há necessidade de pesquisas direcionadas a utilização e aplicação destes métodos como controle alternativo.

2 JUSTIFICATIVA

As áreas agrícolas onde há o cultivo de soja no Brasil frequentemente são atacados por fungos, pragas, entre outros organismos simultaneamente. A alternativa mais utilizada pelos produtores é a utilização de fungicidas, inseticidas e herbicidas. Contudo há outras alternativas que podem ser adotadas para controle de diferentes agentes não desejados que são menos ofensivas ao meio ambiente, economicamente viáveis e socialmente justas.

Diante do exposto, com a realização deste projeto espera-se obter informações que permitam fornecer alternativas para que novos trabalhos sejam desenvolvidos até chegar em um “produto” que seja economicamente viável, socialmente justo e ecologicamente correto, com o uso de um fungo (*Pestalotia sp.*) que pode ser utilizado no controle biológico de *Fusarium sp.*, agente causador da Seca das Vagens, *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causador da Murcha e Tombamento de Sclerotium, *Botrytis sp.* agente causador da podridão cinzenta e *Colletotrichum sp* agente causador da Antracnose.

3 HIPÓTESE

Espera-se que o fungo *Pestalotia sp.* Apresente-se como antagônico aos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sp.*, *Botrytis sp.* e *Colletotrichum sp.*, assim como produza metabólitos que possam diminuir e ou inibir o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem como objetivo, realizar a coleta e isolamento do fungo *Pestalotia* sp. e testá-lo no controle biológico, realizar extração de metabólitos secundários, assim como, testar atividade antagônica e compatibilidade do fungo *Pestalotia* sp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp., *Botrytis* sp. e *Colletotrichum* sp..

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Realizar teste de atividade (redução ou inibição do crescimento micelial) do fungo em questão em *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Isolar o fungo *Pestalotia* sp., separar os melhores isolados.
- Repicar os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium* sp. *Botrytis* sp. e *Colletotrichum* sp. em placas de petri® com meio de cultura.
- Avaliar o efeito antagônico de *Pestalotia* sp. sobre os fungos fitopatogênicos.
- Realizar extração de metabólito do *Pestalotia* sp. e testar em *Sclerotinia sclerotiorum*.

5 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 CONTROLE BIOLÓGICO

A ideia principal do controle biológico é controlar as pragas agrícolas e os insetos transmissores de doenças usando seus inimigos naturais, que podem ser outros insetos benéficos, predadores, parasitóides, e microrganismos, como fungos, vírus e bactérias. Trata-se de um método de controle racional e sadio, que tem como objetivo final utilizar esses inimigos naturais que não deixam resíduos nos alimentos e são inofensivos ao meio ambiente e à saúde da população (EMBRAPA,2018).

No Brasil, em 2010, o mercado de produtos de controle biológico foi aproximadamente de U\$ 70 milhões, isto equivale a 2% da venda do mercado de agrotóxicos sintéticos. Há uma estimativa que a área tratada com agentes de controle biológico no Brasil seja inferior a 8 milhões de hectares/ano. Embora elevada participação percentual ainda é pequena nas culturas para as quais há alternativas biológicas disponíveis (EMBRAPA,2018).

O modelo predominante da agricultura convencional, tem como base o retorno econômico imediato, para isso, dá prioridade o controle aos problemas fitossanitários quase exclusivamente pela aplicação continuada e em larga escala de agrotóxicos. Assim, têm surgido diversos problemas de ordem ambiental, como contaminação de alimentos, solo, água e animais, intoxicação de agricultores, resistência de patógenos a certos princípios ativos dos agrotóxicos, desequilíbrio biológico, entre outros (MORANDI, M. A. B., 2009).

5.2 EFEITO ANTAGÔNICO

Uma das alternativas ao controle químico é o controle biológico, o uso de microrganismos que antagonizam patógenos de plantas é uma saída sustentável para o controle de doenças na agricultura, a qual se vincula por anos de cultivo agrícola, apesar do uso intenso de agrotóxicos. Espécies do gênero *Trichoderma*, por exemplo, possuem propriedades antagônicas baseadas na ativação de mecanismos variados, o que possibilita atividade contra um largo espectro de fitopatógenos, e capacidade de controlar um grande número de doenças de plantas (SOUZA, et. all., 2015).

O biocontrole ocorre de maneira indireta, sendo assim, ocorre devido a competição por espaço e nutrientes, estimulação do crescimento das plantas, de seus mecanismos de defesa, produção de antibióticos ou também, diretamente por micopredatismo. Esses mecanismos podem atuar de diferentes formas e a sua importância nos processos de biocontrole não só dependem da espécie, mas também do isolado do fungo a que antagoniza, do tipo de cultivo e das condições ambientais tais como disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura e umidade (SOUZA, et. all., 2015).

5.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo secundário está restrito a processos químicos únicos para uma dada espécie ou família, portanto, não é universal. Contudo, metabolismo é a química que conduz à formação de um produto natural, geralmente esse produto, definido como metabólito é oriundo a partir de um estresse que o indivíduo (planta, fungo, bactéria) é submetido. Algumas partes desta química são comuns para um número ou família diferente de plantas e até mesmo de fungos, mas, atualmente, a química dos produtos naturais usualmente é diferente de um organismo para outro (VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B., 2010).

5.4 INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM GRANDES CULTURAS

As doenças são um dos principais fatores que suprimem o rendimento e lucratividade. Tem-se conhecimento de mais de 100 doenças da cultura da soja mundialmente. O monocultivo é um fator relevante no desenvolvimento das doenças que acometem a cultura (SILVA; CARVALHO; CARVALHO, 2006). Segundo Yorinori e Lazzarotto (2004), existem cerca de 35 doenças identificadas no Brasil que possuem importância econômica, estas são causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus.

Fatores como grau de umidade das sementes e temperatura de armazenamento resultam em uma maior influência sobre a manutenção de sua viabilidade (Ward & Powell, 1983). Segundo Silva (1989), a potencialidade de conservação de sementes de soja depende da qualidade fisiológica das mesmas no início do período de armazenamento.

A qualidade fisiológica das sementes ou sua capacidade de germinação também depende da incidência de fungos. Estudos realizados por Henning (1987) demonstraram que *Phomopsis* spp. perde a viabilidade durante a armazenagem em condições

ambiente, ocorrendo concomitantemente, aumento gradual na porcentagem de germinação em laboratório.

As doenças ocasionadas por fungos estão entre os fatores que afetam o rendimento da soja, sendo estes responsáveis pelas variações da produtividade nas safras. Entre as doenças fúngicas em dimensão nacional, as mais comumente são a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), a mancha-parda (*Septoria glycines*), cretamento foliar de cercospora (*Cercospora kikuchii*), oídio (*Microsphaera difusa*), Podridão vermelha da raiz (*Fusarium sp*) e o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), antracnose (*Colletotrichum sp*) (CLAUS, et. al. 2016).

5.2.1 O fungo *Fusarium sp.*

Nome científico: *Fusarium sp.*

Classe: Sordariomycetes

Filo: Ascomycota

Ordem: Hypocreales

Sintomas: Pode ocorrer em reboleiras ou de forma generalizada na lavoura. A infecção inicia com uma mancha avermelhada, mais visível na raiz principal, geralmente localizada um a dois centímetros abaixo do nível do solo. O tecido lenhoso da haste, acima do nível do solo, adquire coloração castanho-claro. Na parte aérea, observa-se amarelecimento prematuro das folhas e necrose entre as nervuras, resultando no sintoma conhecido como folha “carijó”. Em plantas onde o ataque é severo, pode ocorrer desfolha prematura e abortamento de vagens (HENNING, et. al. 2014).

Comportamento: A doença costuma aparecer próximo ao florescimento. Cultivares precoces tendem a sofrer menos danos. A doença costuma ser mais severa em solos mal drenados e com problemas de compactação. A temperatura ótima de desenvolvimento varia de 22 °C a 24 °C (HENNING, et. al. 2014).

Controle: Evitar semeadura em solos compactados e mal drenados. A rotação de cultura com gramíneas não são eficientes. (HENNING, et. al. 2014).

Segundo Aoki, O'Donnell e Scandiani (2005), a podridão vermelha da raiz (PVR), na América do Sul é causada por quatro espécies de *Fusarium*: *Fusarium brasiliense sp. nov.*, *Fusarium cuneirostrum sp. nov.*, *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium virguliforme*. A PVR induz o sintoma foliar típico de folha carijó, com manchas cloróticas e necróticas, contudo a região das nervuras permanece com coloração verde normal (ALMEIDA et al., 1997).

5.2.2.O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

Nome científico: *Sclerotinia sclerotiorum*

Classe: Leotiomyces

Filo: Ascomycota

Ordem: Helotiales

Sintomas: Manchas aquosas que evoluem para coloração castanho-clara e logo desenvolvem abundante formação de micélio branco e denso. O fungo é capaz de infectar qualquer parte da planta (HENNING, et. al. 2014).

Comportamento: A fase mais vulnerável da planta vai do estágio da floração plena ao início da formação de vagens. Alta umidade e temperaturas amenas favorecem o desenvolvimento da doença (HENNING, et. al. 2014).

Na presença de um hospedeiro suscetível e em condições favoráveis, o escleródio (estrutura de resistência de *Sclerotinia sclerotiorum*) germina produzindo então micélios que penetram nos tecidos da planta provocando apodrecimento, também podem formar apotécios, que ao emergirem na superfície do solo liberam os ascósporos, para essa liberação as condições ideais são alta umidade relativa e temperatura ao redor de 10 °C a 21 °C, já para o desenvolvimento do micélio a temperatura situa-se entre 18°C e 25°C. (LEITE, 2005).

Controle: Evitar a introdução do fungo na área utilizando semente certificada livre do patógeno. Efetuar tratamento de semente com mistura de fungicidas de contato e benzimidazóis (HENNING, et. al. 2014).

5.2.3. O fungo *Botrytis* sp.

Nome científico: *Botrytis* sp

Classe : Leotiomyces

Filo: Ascomycota

Ordem: Helotiales

Sintomas: Causa podridão dos frutos e também ataca as folhas, pecíolos, caule, botões, florais e pétalas. A podridão geralmente inicia-se em um ponto qualquer da superfície do fruto, e geralmente começa no lado em que este entra em contato com o solo ou no lado em que entrou em contato com frutos contaminados. A doença é

favorecida por temperaturas amenas e elevada umidade (SAEGER, 2007; KOIKE et al., 2014).

Comportamento: É uma doença bastante comum na cultura de morango, podendo reduzir 50 % ou mais do seu rendimento.

As infecções iniciam com o enrolamento das folhas, seguindo de seca e queda. Surgem pequenas lesões de cor marrons, geralmente sobre o cálice, após o tamanho da lesão vai aumentando rapidamente formando uma camada cinzenta de esporos do fungo. Os esporos são capazes de germinar em água e pela mesma pode ocorrer a contaminação de frutos sadios (AVERRE et al., 2002; KRUGNER ; AUER, 2005).

Controle: Evitar plantio muito adensado. Realizar podas de limpeza para a retirada de todos os tecidos infectados, os quais devem ser queimados para evitar o aumento da fonte de inoculo no pomar.

Para culturas anuais, ornamentais e hortaliças, deve-se usar sementes limpas e devidamente tratadas com fungicidas sistêmicos, plantio em épocas de temperaturas mais altas e em áreas onde não são frequentes as neblinas, limitar o manuseio da plantação ao mínimo, visando evitar a ocorrência de danos/choques mecânicos, que servem como entrada para o fungo (AVERRE et al., 2002; KRUGNER ; AUER, 2005). .

5.2.4.O fungo *Colletotrichum* sp

Nome científico: *Colletotrichum* sp

Classe : Ascomycetes

Filo: Ascomycota

Ordem: Phyllachorales

Sintomas: O sintoma típico da doença é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (Bailey et al., 1992), podendo ocorrer uma podridão-mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (Lima Filho et al., 2003).

Comportamento: A antracnose causada por espécies de *Colletotrichum* é a principal doença de frutos em pós-colheita, sendo considerada doença de elevada importância econômica no Nordeste do Brasil (Serra & Silva, 2004).

Controle: Recomenda-se o uso de sementes sadias, tratamento de sementes, rotação de culturas, espaçamento entre fileiras e estande que permitam bom arejamento da lavoura e manejo adequado do solo, principalmente com relação à adubação potássica (HENNING, et. al. 2014).

5.2.5. *Pestalotia* sp.

Nome científico: *Pestalotia* sp.

Ordem: Sphaeropsidales

Sintomas: Não há relatos na literatura sobre este fungo nas grandes culturas, como soja, milho, trigo, ..., apenas algumas espécies causadoras de danos em florestais.

Comportamento: Barnett e Hunter (1998) listaram as características morfológicas principais de *Pestalotia* sp., sendo este fungo que apresenta frutificações acervuláres, claras, discóides ou em forma de almofada, seu posicionamento é subepidérmico, conidióforos são curtos, simples, conídios são escuros, unicelulares, hialinos, fusóides, elipsóides, sendo encontrados parasitando plantas ou em condições de saprofitismo.

De acordo com o INDEX FUNGORUM (2009) o gênero *Pestalotia* sp. pertence ao reino Fungi, grupo dos fungos Mitospóricos e ao subgrupo dos Coelomicetos. Existem registrados 590 espécies, variedades e formas especiais de *Pestalotia* sp. conhecidos no mundo.

Negrão et al. (2009), realizou um experimento com produção de mudas de eucalipto, onde observou a cultura do coqueiro no estado do Paraná, esta é afetada por *Pestalotia* sp. A doença tem como sintoma a requeima foliar que abrange de manchas negras, arredondadas evoluindo para lesões de formato ovalado a elíptico com bordos negros, no sentido das nervuras, podendo atingir até 3 cm. Quando em estágio mais avançado, as manchas coalescem resultando uma seca de todo ou de grande parte do folíolo. Altas temperaturas e umidade relativa do ar alta favorecem a formação de conídios, os quais são formados na superfície do tecido hospedeiro.

5.3 CONTROLE BIOLÓGICO COM FUNGOS

O Brasil é um importante produtor de alimentos, responsável pelo abastecimento do mercado interno e externo, contudo o agronegócio é um setor com posição de destaque. Para que essa posição continue estabilizada ou aumente que, é a projeção para os próximos anos, os produtores devem evoluir e serem cada vez mais eficientes, com uma produção máxima e com menor custo possível, sempre estando atento para práticas de manejo adequadas. (DALL'AGNOL A. ; HIRAKURI H. M., 2008).

Em todos os lugares do mundo onde a agricultura é praticada, a ingerência para o controle de doenças de plantas é amplamente efetivada através de produtos químicos (KIMATI et al., 1997).

O termo controle biológico é aplicado à utilização de competidores naturais disponíveis no ambiente, para diminuir a um limite sub-clínico sendo economicamente admissível a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola (GRONVOLD et al., 1996).

5.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA CONTROLE DE DESENVOLVIMENTO DE PATÓGENOS

Estudos relatam que certos fungos possuem capacidade de controlar agentes patógenos, sejam esses fungos, nematoides ou insetos. No Brasil os estudos relacionados a fungos entomopatogênicos tiveram início em 1923, quando foram identificadas duas espécies de cigarrinhas infectadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. Posteriormente, esse fungo foi utilizado para combater a cigarrinha *Tomaspis liturata*, no primeiro trabalho de pulverização realizado no país. (ALVES; FARIA, 2003).

Trichoderma harzianum, por exemplo, pode ser utilizado no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes, onde os isolados apresentaram antagonismo in vitro contra o patógeno (CARVALHO, D.C.,2011).

Existem instituições que realizam estudos e produzem microrganismos para atuar no controle de pragas da agricultura. Um exemplo é o convênio entre a empresa ItaforteProdutos e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP).

Há estudos que apontam resultados promissores com relação ao controle de crescimento micelial com testes de antagonismo, como é o caso do teste de antagonismo utilizando fungos endofíticos isolados de folhas de *Mikania glomerata spreng.* (asteracea) contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp (POLLI, 2013).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico e Fitossanidade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV), durante o período letivo de 2017 a 2018.

6.2 CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

6.2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO *Pestalotia* sp.

Inicialmente foi coletado o fungo *Pestalotia* sp. na lavoura de soja da área experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV) para realização do experimento, posteriormente foi replicado e purificado em placas de petri® até a obtenção de uma colônia pura.

6.3 Contagem de esporos

Para reconhecimento e padronização do fungo *Pestalotia* sp. foi realizado a observação e quantificação de esporos em Câmara de Neubauer. Para preparo da solução foi feito a raspagem de esporos a partir de uma placa de petri® com 10 dias de crescimento micelial (possibilitando a esporulação do fungo), estes foram dissolvidos com água deionizada destilada, adicionado à solução uma gota de Tween 80 e agitado por 1 min para homogeneização.

Com o auxílio de uma pipeta foi pipetado 1 ml da solução e depositado na câmara de Neubauer, sobre esta, foi adicionado uma lamínula. A câmara de Neubauer possui dimensões de 30 x 70 mm e 4 mm de espessura. É composta por duas câmaras (independentes), uma superior e uma inferior. Cada uma possui uma grade no centro, onde a contagem celular é realizada. A grade de contagem tem 3 mm x 3 mm de tamanho e é subdividida em nove quadrantes de 1 mm x 1 mm, posteriormente foi colocado a lamínula sobre a câmara, cobrindo a área central, onde a grade de contagem está. Servindo para concentrar a amostra entre o fundo da câmara e a própria lamínula, deixando exatamente 0,1 mm nesse espaço. (CÂMARA 2015).

Foram contabilizados todos os esporos que estavam nos quatro quadrantes laterais e no quadrante central e calculados através dessa fórmula: Número de

células/ml=número total de célula / número de quadrantes contados fator x fator de diluição x 10.000.

6.4 Extrato de metabólitos

Foi realizado um teste com extração de metabólitos do *Pestalotia* sp., o método consiste em estressar o fungo fazendo com que este produza metabólitos secundários. Para isso, foram utilizados 5 erlenmeyer contendo 50 ml de meio BD (batata e dextrose), cada erlenmeyer representa um tratamento diferente, estes foram agitados em uma plataforma agitadora por 7 dias na velocidade de 70 rpm. Cada erlenmeyer corresponde a um tratamento, representados na tabela 1.

Tabela de tratamentos.

NÚMERO DO TRATAMENTO	TRATAMENTOS
1	Micélio de <i>Pestalotia</i> sp
2	Micélio de <i>Pestalotia</i> sp. + escleródio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> inativo
3	Micélio de <i>Pestalotia</i> sp. + micélio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
4	Micélio de <i>Pestalotia</i> sp. + escleródio ativo
5	Micélio de <i>Pestalotia</i> sp. + micélio de <i>Fusarium</i> sp
6	Testemunha

Tabela 1. Tratamentos.

Cada metabólito foi submetido a uma filtragem grosseira, com gaze esterilizada e posteriormente a outra filtragem, com o intuito de passar apenas os metabólitos, para isso utilizou-se uma micro membrana (syringe filters- K18-430) com o auxílio de uma seringa de 5 ml. Após esse processo, cada metabólito foi misturado em 54 ml de meio BDA à temperatura de 60°C (para melhor diluição e homogeneização), na concentração de 10% (6 ml), e distribuído 15 ml em placas de petri® de 9 cm.

O procedimento de preparo do meio BDA consiste em lavar e escovar bem as batatas, retirando os todos os resíduos de terra, corta-las em fatias finas sem retirar as cascas (200 g de batata) e ferver em 0,5 litro de água destilada até que fique bem macia. Filtrar o líquido reservando-o e descartar as batatas cozidas, adicionar ao filtrado 20g de Dextrose e 20g de e preencher o volume final para 1 litro com água destilada. Misturar manualmente até dissolver e autoclavar a solução para não ocorrer contaminação (EMBRAPA, 1999).

Para cada tratamento, houve 4 repetições, sendo um tratamento a testemunha. Este teste foi realizado apenas com *S. sclerotiorum*, sendo avaliado o crescimento micelial diariamente até o fechamento da placa constituinte da testemunha (SILVA, M.B., et. al., 2008). A testemunha consiste em um disco de micélio de 5 mm do fungo *Pestalotia* sp. depositado no centro de uma placa de petri® contendo meio de cultura.

6.5 Teste de antagonismo

O fungo *Pestalotia* sp. (o qual foi determinado como antagonista) foi multiplicado, a partir do inóculo original, em meio de cultura BDA, composto por 200 g de batatas cruas cortadas em tiras, 20 g de dextrose, ágar (30 g), 1 litro de água, 500 mL para misturar os ingredientes e 500 mL para cozinhar a batata, após a inoculação, este foi incubado em câmara de B.O.D. (26 °C) durante aproximadamente 10 dias, para seu crescimento e esporulação. A partir destas placas, foram retirados discos de micélio de 5 mm com o auxílio de uma alça, com a mesma foi inoculado em uma das extremidades de placas de petri®, as quais possuem diâmetro de 9 cm e continham meio BDA, em outra extremidade dessas placas, havia um disco de micélio de 5 mm do fitopatógeno em questão, sendo estes *S. sclerotiorum*, *Fusarium* sp., *Botrytis* sp. e *Colletotrichum* sp. (CAROLLO; FILHO; 2016).

Na parte inferior das placas de petri® sobre cada disco de micélio, foi traçado dois eixos, sendo estes denominados como eixo "A" e "B", onde "A" é o antagonista e "B" o fitopatógeno (imagem 1), sendo assim, diariamente foram realizadas medições para determinar o seu crescimento. As medidas foram realizadas até o fechamento da placa das testemunhas (ZANCAN, et al., 2012).



Imagem 1: Placas de petri® com horizonte A e B determinados

Fonte: NUNES, S. N.

Foram utilizadas 4 repetições de placas para cada fungo, distribuídas de forma aleatória na BOD, sob condições de fotoperíodo e temperatura de 20 ± 2 °C.

6.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados utilizou-se a ferramenta computacional R (TEAM, 2018) versão 3.4.4. As variáveis repostas analisadas foram: diâmetro médio de crescimento micelial (dm, mm); porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC, %) e; porcentagem de inibição antagônica (PIA, %). Para análise e interpretação dos resultados adotou-se o modelo matemático do esquema de parcelas subdivididas no tempo em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para as variáveis dm e PIA (%), já para PIC (%) utilizou-se o modelo DIC.

6.6.1 DIÂMETRO MÉDIO (dm, mm)

Essa variável é obtida pela média dos diâmetros ortogonais. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos, realizou-se o teste de comparação de médias de Duncan, ao nível de 5% de significância. Aplicou-se o teste de Fisher (ou LSD de Least Significant Difference), ao nível de 5% de significância, para avaliar a interação tratamento (parcela principal) * tempo (subparcela).

6.6.1 Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC, %)

Para esta variável, considerou-se o modelo matemático do DIC, com 4 repetições, para a última coleta de dados (dia 4). Então, realizou-se a análise de variância (ANOVA) e, conseqüentemente, o teste de comparação de médias de Duncan, ao nível de 5% de significância.

6.6.2 Porcentagem de Inibição Antagônica (PIA, %)

Para análise da variável resposta PIA (%), o experimento foi em esquema de parcelas subdivididas no tempo em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições e 6 tratamentos.

O experimento foi encerrado quando um dos tratamentos “fitopatôgeno × antagonista” fechou a placa de petri®, o que ocorreu em 4 dias após a incubação do experimento.

Neste caso, considerou-se todas as medições do experimento, isto é, até que todos os tratamentos “fitopatôgeno versus antagonista” tenham fechado as placas de petri, o que ocorreu em 7 dias após a incubação do experimento. Desta forma, tem-se um conjunto de dados desbalanceado.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Contagem de esporos

Foram realizadas 4 repetições, onde na repetição 1 encontrou-se 127 esporos, na repetição 2 encontrou-se 429 esporos, na repetição encontrou-se 3, 298 esporos e na repetição 4 encontrou-se 325, dessa forma, por meio do cálculo de concentração obtivemos um valor de $C_e: 3,68 \times 10^5$ de esporos na solução, o que é consideravelmente alta.

7.2 Extrato de metabólitos

A interação tratamento * tempo (dias) foram significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro. Também foram significativos, ao nível de 5% de probabilidade de erro, o efeito dos tratamentos (parcela principal ou fator 1) e dos diferentes tempos (subparcela ou fator 2) de medição das colonônias. ZACARONI (2009), realizou um

experimento semelhante a este, com extração de óleo essencial, com o objetivo de avaliar o potencial fungitóxico, ele percebeu que as interações foram significativas quando avaliado o crescimento micelial dos fungos em questão, e que a diferença pode ser observada ao decorrer dos dias, dessa forma levou em consideração as medições ortogonais do diâmetro das colônias diariamente.

MUIS E QUIMIO (2006) ao avaliarem a difusão e a volatilidade de metabólitos tóxicos de *Bacillus* spp. em meio de cultura sobre o desenvolvimento de *Rhizoctonia solani* puderam comprovar a efetividade da produção de compostos tóxicos pela bactéria pela formação de halos de inibição durante o crescimento micelial do fungo. Também concluíram que além da difusão destes metabólitos no meio de cultura, a bactéria libera no meio compostos voláteis que agem como inibidores do crescimento micelial, pois as colônias apresentaram redução em seu diâmetro quando comparadas à testemunha.

7.2.1 ANOVA

De acordo com a análise de variância, os tratamentos 3 e 4, se diferem estatisticamente dos demais, representado na tabela 1.

TRATAMENTO	Diâmetro médio (mm)
1	55.90625 a
2	54.78125 a
3	42.40625 b
4	41.87500 b
5	53.81250 a
6	57.00000 a

Tabela 1. Diâmetro médio (mm) em relação aos Tratamentos

Houve um crescimento gradativo do diâmetro médio conforme o decorrer dos dias, diferenciando-os uns dos outros, como esperado, representado na tabela 2.

DIA	Diâmetro médio (mm)
1	7.416667 d
2	46.812500 c
3	68.687500 b

4	80.937500 a
---	-------------

Tabela 2. Relação dias e diâmetro médio (mm).

7.2.2 Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC, %)

Os tratamentos 1, 2 e 5 não inibiram o crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, ou seja, a variável PIC (%) é 0% (zero) para esses tratamentos. O tratamento 3 apresentou maior potencial de controle do fitopatógeno com PIC=31,80556% e o tratamento 4 com PIC=28,61111%, porém de acordo com o teste F, as médias dos tratamentos não podem ser consideradas diferentes.

7.2.3 Diâmetro médio (dm, mm)

O gráfico 1 representa a relação do diâmetro médio do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e os tratamentos.

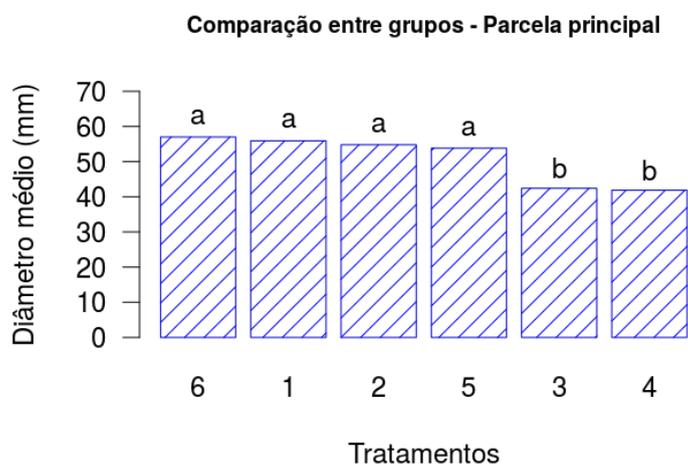


Gráfico 1- Relação entre diâmetro e tratamento. NUNES, S.N. 2018.

Tratamentos:

- 1- Micélio de Pestalotia sp
- 2- Micélio de Pestalotia sp. + escleródio de *Sclerotinia sclerotiorum* inativo
- 3- Micélio de Pestalotia sp. + micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*
- 4- Micélio de Pestalotia sp. + escleródio ativo
- 5- Micélio de Pestalotia sp. + micélio de *Fusarium* sp
- 6- Testemunha

No dia 4, no qual encerrou-se o experimento devido à cobertura total das colônias nas placas de petri® (90 mm) do tratamento testemunha (tratamento 6), bem como, dos tratamentos 1, 2 e 5. Já o diâmetro médio do tratamento 4 foi de 64,25 mm e o do tratamento 3 foi de 61,375 mm nesse dia. Isto indica que o tratamento atrasa o desenvolvimento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Como pode ser observado no gráfico 2.

O atraso do crescimento micelial é de suma importância, pois pode-se fazer o manejo com aplicação de fungicidas antes que a doença avance e forme as estruturas de resistência (escleródio), os quais podem permanecer no ambiente (HENNING, 2014).

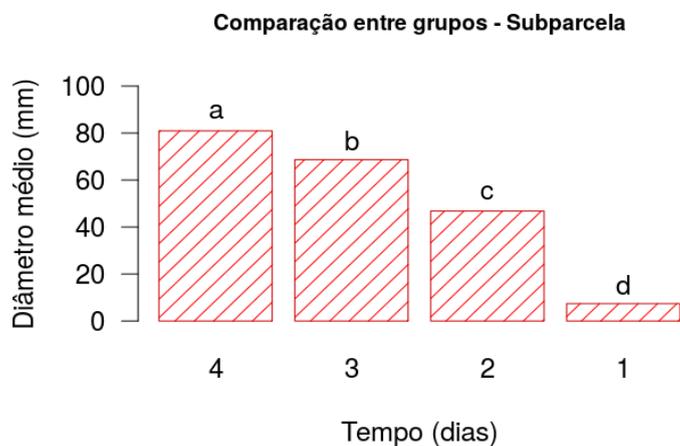


Gráfico 2- Relação entre diâmetro e tempo. NUNES, S.N. 2018.

De acordo com o teste F, as médias dos tratamentos 3 e 4 não podem ser consideradas diferentes.

7.3 Teste de antibiose

Diversos estudos têm mencionado variação de sensibilidade dos fungos fitopatogênicos a metabólitos produzidos por antagonistas. Segundo Martin-Corder e Melo (2014) a capacidade de *Trichoderma* por exemplo, de produzir metabólitos secundários e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies, entre isolados da mesma espécie, dessa forma os mecanismos empregados pelos agentes de biocontrole são muitos complexos e sua ação varia de acordo com o tipo de agente de biocontrole, do patógeno e do hospedeiro envolvida na interação.

A tabela 3 indica os tratamentos utilizados no teste de antibiose.

TRATAMENTO	FITOPATÓGENO × ANTAGONISTAS
1	<i>Pestalotia</i> sp. x <i>S. sclerotiorum</i>
2	<i>Pestalotia</i> sp x <i>Fusarium</i> sp.
3	<i>Pestalotia</i> sp x <i>Botrytis</i> sp.
4	<i>Pestalotia</i> sp x <i>Colletotrichum</i> sp.

Tabela 3. Tratamentos.

7.4 Porcentagem de inibição de antibiose (PIA, %)

Os dados foram agrupados de acordo com a probabilidade de diferenças de médias e nível alfa (0,05), onde os tratamentos com a mesma letra não são significativamente diferentes, como indica o gráfico 3.

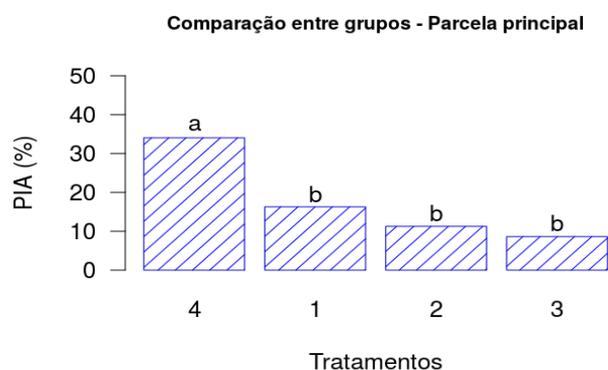


Gráfico 3- Relação entre PIA (%) e tratamentos.

Podemos perceber que o tratamento 4 houve diferença significativa dos demais tratamentos, onde a PIA(%) foi maior do que os demais, os tratamentos 1, 2 e 3 não se diferenciaram entre si.

PALLERO (2016), realizou estudos a partir dos quais foram levantadas as taxas médias de crescimento e a porcentagem de inibição, onde a porcentagem de inibição foi calculada utilizando o crescimento radial do fungo fitopatogénico *Curvularia* na presença do antagonista *T. gamsii*, que por sua vez, mostrou-se eficiente para a PIA (%)

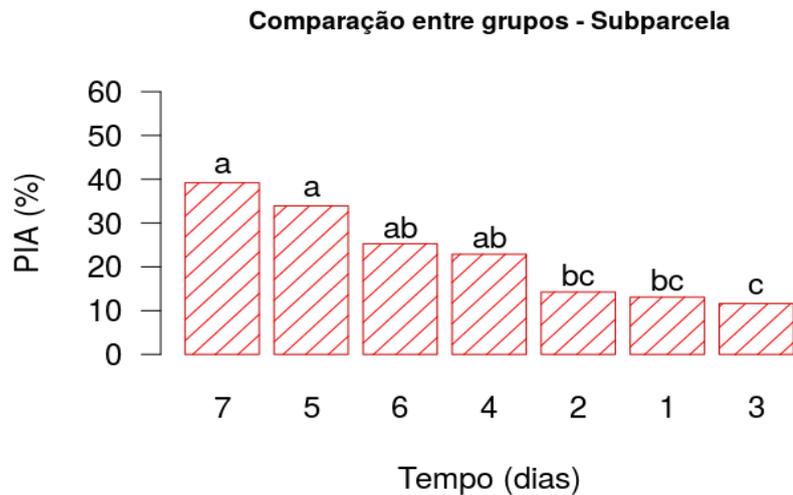


Gráfico 4- Relação entre PIA (%) e dias

Em relação aos 7 dias de medição, foi significativa a interação entre os dias e também significativo os tratamentos e o tempo de medições, dessa forma o dia 7 e 5 (não diferem entre si) houve uma maior porcentagem de inibição antagônica, seguido do dia 6 e 4 (não diferem entre si), os dias 1, 2 e 3 apresentam uma porcentagem de PIA (%) baixa quando comparada com os demais.

Silva (2008), constatou que o pareamento de *Phytophthora citrophthora* com isolados de *Trichoderma* demonstrou efeito significativo no crescimento micelial do fungo no sétimo dia de análise, o que nos permite a fazer uma comparação quanto aos dias de avaliação dos demais fungos.

8 CONCLUSÃO

Para análise dos dados relacionados ao extrato de metabólitos: os tratamentos 3 (Micélio de *Pestalotia* sp. + micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*) e 4 (Micélio de *Pestalotia* sp. + escleródio ativo) atrasaram o crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

Teste de antagonismo: em um modo geral, os dias interferem de forma significativa a porcentagem de inibição de antagonismo, apresentando resultados no sétimo dia de análise. O tratamento 4 *Pestalotia* sp versus *Colletotrichum* sp. foi o que apresentou maior resposta ao teste de antagonismo, tendo o seu valor de PIA (%) maior que os demais.

Finalmente, cabe lembrar que excelentes resultados com antagonistas obtidos *in vitro* podem não ser confirmados em condições de campo, já que esses organismos estão sujeitos às reações diferenciais do hospedeiro e do ambiente (HARMAN 1991).

9 REFERÊNCIAS

AGEITEC, Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica. Doenças fúngicas. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/amora/arvore/CONT000ggtku91a02wx5ok05vadr10jt7wsv.html>. Acesso em: 13 fev. 2017.

ÁLVES, S.B., PÁDUA, L. E. de M., et. Al. Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. Disponível em: <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/15178>. V.20, n.4, abr. 1985. Acesso em: 26 abr. 2017.

ARAÚJO, J.V., MOTA, M.A., CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2003000300001&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 23 abr. 2017.

AVERRE, C. W; JONES, R. K.; MILHOLLAND, R. D. Strawberry diseases and their control. Fruit Disease Information. Note n. 5, 2002. Acesso em: 20 nov. 2018.

BEAUVERIA, MEIO D E et al. (2009) Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. Disponível em : http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v71_1/dalzoto.pdf. Acesso em: 02 jul. 2017

Caderno de Agroecologia. Monocultura, insetos e agroquímicos. Disponível em: <http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/view/2225>. v. 2 n. 1 (2007): Resumos do II Congresso Brasileiro de Agroecologia. Acesso em: 13 fev 2017.

CÂMARA, B. (2015). Conhecendo a Câmara de Neubauer. Disponível em : <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/10/conhecendo-camara-de-eubauer.html>. Acesso em: 01 ago. 2018.

CAROLLO, E. M.; FILHO, H. P. S.; (2016). Manual Básico de Técnicas Fitopatológicas Laboratório de Fitopatologia Embrapa Mandioca e Fruticultura

Disponível em : <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/148757/1/Cartilha-ManualFito-215-14-Hermes.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2018.

CARVALHO, D.C., MELLO, S.C.M., JÚNIOR, M.L.. et.al. Controle de *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/894906/controle-de-fusarium-oxysporum-fsp-phaseoli-in-vitro-e-em-sementes-e-promocao-do-crescimento-inicial-do-feijoeiro-comum-por-trichoderma-harzianum>. Acesso em 20 nov. 2018.

DALL´AGNOL A. e HIRAKURI H. M. Realidade e perspectivas do Brasil na produção de alimentos e agroenergia, com ênfase em soja. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/470941/realidade-e-perspectivas-do-brasil-na-producao-de-alimentos-e-agroenergia-com-enfase-na-soja>. Acesso em: 26 mai. 2017.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Controle Biológico. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>. Acesso em: 08 fev. 2017.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Soja Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Rod. Amaral. Disponível em : <http://www.cnpso.embrapa.br/helicoverpa/folder-mip.pdf>. Acesso em: 26 mai. 2017.

GÁSPERI, A. C., PRESTES, A. M., & COSTAMILAN, L. M. (2003). Reação de Cultivares de Soja à Podridão Vermelha da Raiz Causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines* Use the "Insert Citation" button to add citations to this document.

LACERDA, A. L. S., LAZARINI, E., EUSTÁQUIO DE SÁ, M. et.al. Armazenamento de sementes de soja dessecadas e avaliação fisiológica, bioquímica e sanitária. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbs/v25n2/19655.pdf>: Acesso em : 23 abr. 2017.

LEITE, R.M. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Disponível em:

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/467525/1/comtec76.pdf>: Acesso em : 24 abr. 2017.

LIMA, A. A. (2008). Análise do efeito causado pelos genes quitinase e catepsina dos baculovírus CfDefNPV e AcMNPV inseridos no genoma do *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. Disponível em : http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/1317/1/2008_AnabeleALima.pdf. Acesso em: 27 mai. 2017.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.28, n.6, p.620-625, 2003. Acesso em: 20 nov. 2018.

PALLERO, F. B.; et. all. Uso de fungos antagonistas no controlo de doenças de plantas. 2016. Disponível em: http://www.aphorticultura.pt/uploads/4/8/0/3/48033811/uso_de_fungos_antagonistas_no_controlo_de_doencas_de_plantas.pdf. Acesso em: 22 nov. 2018.

REIS, E. F. Incidência de *Fusarium* spp. em soja sob diferentes preparados e coberturas do solo no inverno. Disponível em: <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/31812/R%20-%20T%20-%20EMERSON%20FABIO%20DOS%20REIS.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em : 24 abr. 2017.

SAEGER, S. C. S. Avaliação da Ação de Vigilância Sanitária Quanto à Redução dos Níveis de Resíduos de Agrotóxicos em Morangos Produzidos na Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro. – Uma Contribuição para a Avaliação do Risco. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007 (Tese de Mestrado). Acesso em: 20 nov. 2018.

SERRA, I. M. R. de S.; SILVA, G. S. da. Caracterização Morfofisiológica de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Agentes de Antracnose em Frutíferas no Maranhão. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 475-480. 2004. Acesso em: 20 nov. 2018.