

ANA CAROLINA DE ALMEIDA

**BIOCONTROLE DE TOMBAMENTO CAUSADO POR *Rhizoctonia solani* EM
PLÂNTULAS DE FEIJÃO E SOJA COM *Clonostachys* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Lucas Magalhães de Abreu

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A447b
2021 Almeida, Ana Carolina de, 1996-
Biocontrole de tombamento causado por *Rhizoctonia solani*
em plântulas de feijão e soja com *Clonostachys* spp. / Ana
Carolina de Almeida. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (68 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Lucas Magalhães de Abreu.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.098>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Feijão - Doenças e pragas. 2. Soja - Doenças e pragas.
3. Pragas agrícolas - Controle biológico. 4. Antibiose.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 635.65294


ANA CAROLINA DE ALMEIDA

**BIOCONTROLE DE TOMBAMENTO CAUSADO POR *Rhizoctonia solani* EM
PLÂNTULAS DE FEIJÃO E SOJA COM *Clonostachys* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de julho de 2021

Assentimento:



Ana Carolina de Almeida
Autora



Lucas Magalhães de Abreu
Orientador

Dedico

Aos meus pais, Nivaldo e Sônia

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os momentos de força durante as minhas fragilidades, medos e incertezas. Por toda manifestação em forma de amor por mim, sua filha.

Aos meus pais, Nivaldo e Sônia, que me apoiam em cada passo, me acolhem nos momentos difíceis e vibram em cada conquista, faltam palavras para expressar tamanha gratidão.

Aos meus irmãos, Bruno, Marcela e Ana Paula, pela união, confiança e presença em minha vida, e também aos meus cunhados Dacio e José Ricardo.

Aos meus sobrinhos, Bruna, Dacio Neto e Manuela, que mesmo na distância me proporcionam momentos de ternura e alegria.

À minha madrinha Vilma, por ser sempre presente em minha vida.

À Fernanda, pela amizade duradoura e necessária nesse período.

À Carol, por todos os momentos compartilhados nessa trajetória e principalmente por se tornar uma irmã no dia a dia.

Ao Caio, pelo companheirismo nessa jornada deixando-a mais leve e bonita, e também aos seus pais pelo acolhimento e demonstrações de carinho.

À Amanda, Andressa, Marcela e Paulo, pela amizade, companhia e conselhos.

A todos os colegas da Unidade de Controle Biológico de Viçosa, em especial aos que se tornaram amigos e foram essenciais neste trabalho: Carol, Hiago e Amarildo.

Ao Sr. Mário, que além do auxílio com os experimentos, juntamente com a Sr. Neuza tornaram o Viveiro do Café um lugar de aconchego.

Ao Sr. Paulo, pela confiança depositada em mim para realização de meu experimento em sua propriedade, o qual sem a ajuda de Guilherme, Rafael e prof. Jethro não seria possível.

Ao meu orientador Lucas, pela atenção, paciência, compreensão e conhecimento transmitido.

À banca examinadora, por aceitar o convite e todas as contribuições com este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de pós-graduação em Fitopatologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que direta ou indiretamente, fizeram parte desse período.

"[...] porque é Deus mesmo quem guia a sabedoria e emenda os sábios; porque nós estamos nas Suas mãos, nós e nossos discursos, toda a nossa inteligência e nossa habilidade; foi Ele quem me deu a verdadeira ciência de todas as coisas, quem me fez conhecer a constituição do mundo e as virtudes dos elementos, o começo, o fim e o meio dos tempos, a sucessão dos solstícios e as mutações das estações, os ciclos do ano e as posições dos astros, a natureza dos animais e os instintos dos brutos, os poderes dos espíritos e os pensamentos dos homens, a variedade das plantas e as propriedades das raízes [...]" (Bíblia Ave Maria, Sabedoria, 7: 15-20).

BIOGRAFIA

Ana Carolina de Almeida, filha de Nivaldo Camilo de Almeida e Sônia Maria Ferreira de Almeida, nasceu em Carlópolis - Paraná, no dia 03 de dezembro de 1996. Residiu sua infância e adolescência em Joaquim Távora, Paraná. Em 2014 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Estadual do Norte do Paraná, em Bandeirantes, concluindo a graduação em 2018. Em agosto de 2019 iniciou o mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em julho de 2021.

RESUMO

ALMEIDA, Ana Carolina de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Biocontrole de tombamento causado por *Rhizoctonia solani* em plântulas de feijão e soja com *Clonostachys* spp.** Orientador: Lucas Magalhães de Abreu.

Doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo são de difícil manejo, como é o caso de tombamentos causados por *Rhizoctonia solani* em culturas economicamente importantes no Brasil. A busca por tecnologias que possam contribuir com o manejo desta doença se torna de extrema importância e o biocontrole com microrganismos antagonistas é uma vertente a ser explorada. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes espécies do gênero *Clonostachys* no biocontrole de tombamentos por *R. solani* em plantas de feijão e soja. Foram realizados dois bioensaios: em casa de vegetação com plantas de feijão e soja e em campo comercial de soja com histórico de infestação natural por fitopatógenos habitantes do solo. No primeiro, foi avaliado o efeito de dez isolados de nove espécies de *Clonostachys*, aplicados via tratamento de sementes (TS) ou via solo (AS), sobre a percentagem de emergência das plântulas em solo artificialmente infestado com *R. solani*. A incidência desses isolados nas raízes, sem e com desinfestação superficial, também foi avaliada. No segundo bioensaio, tratamentos compostos por duplas de isolados de três espécies de *Clonostachys* foram aplicados no sulco do plantio, de maneira individual ou combinada com um biofertilizante comercial; e a percentagem de emergência de plântulas e produtividade de grãos foram avaliadas. Em casa de vegetação, a aplicação de *Clonostachys* spp. via AS resultou em melhores índices de porcentagens de emergência das plântulas do que via TS. Dentre os dez isolados aplicados no solo, seis foram eficientes no biocontrole de tombamento em pré-emergência causada por *R. solani* no feijão, e oito isolados na soja, resultando em valores de emergência entre 40 e 80%, em contraste com porcentagens de emergência entre 0 e 15% no controle com solo infestado com o fitopatógeno. O efeito de biocontrole de três isolados foi contrastante entre soja e feijão, evidenciando o efeito do hospedeiro na interação. A rizocompetência da maioria dos isolados não se relacionou com o biocontrole exercido por eles. No campo, a incidência natural de tombamentos foi pequena, provavelmente em decorrência do clima seco e quente no norte do Paraná no segundo semestre de 2020. Dessa forma, o efeito da aplicação de *Clonostachys* spp. no biocontrole não pôde ser avaliado. Conclui-se que, além de *C. rosea*, outras espécies do gênero são antagonistas úteis para o biocontrole de doenças causadas por *R. solani* e que, para alguns isolados, a planta hospedeira parece influenciar diretamente o efeito de controle.

Palavras-chave: Tombamento. Rizocompetência. Antagonismo.

ABSTRACT

ALMEIDA, Ana Carolina de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Biocontrol of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* on common bean and soybean seedlings with *Clonostachys* spp.** Advisor: Lucas Magalhães de Abreu.

Soil-borne diseases such as damping-off caused by *Rhizoctonia solani* are challenging to manage. The search for technologies that contribute to the management of this disease is significant, and biocontrol with antagonistic microorganisms is an excellent tool to be explored. This study aimed to evaluate different species of the ubiquitous genus *Clonostachys* against the damping-off caused by *R. solani* in common bean and soybean. Two bioassays were carried out: one under a greenhouse environment with common bean and soybean seedlings and another in a commercial soybean field naturally infested by soil-borne pathogens. In the first assay, the effect of the treatment with ten isolates of nine species of *Clonostachys* spp. isolates on seedling emergence, applied via seed treatment (TS) or via soil application (AS) was evaluated. The incidence of the isolates colonization in the roots, with and without disinfestation, was also evaluated. In the second bioassay, treatments composed of pairs of isolates of three species of *Clonostachys* were applied in the planting row, individually or combined with a commercial biofertilizer, to evaluate their effect on seedling emergence and yield. Under the greenhouse, the application of *Clonostachys* spp. via AS promoted higher seedling emergence percentages than via TS. Among the ten isolates applied to the soil, six were efficient in biocontrol of pre-emergence damping-off caused by *R. solani* in common bean, and eight isolates in soybean, resulting in an emergence that ranged between 40 and 80%, superior to the control treatment, which had emergence between 0 and 15%. The biocontrol effect of three isolates was compared between the two crop species, and the effect of host was demonstrated. The rhizocompetence of most isolates was not correlated with their biocontrol activity. The biocontrol by *Clonostachys* spp. in the field could not be evaluated due to the low natural incidence of seedling damping-off in the second semester of 2020, probably due to the dry and hot climate conditions in northern Paraná. We concluded that other species from this genus, besides *C. rosea*, might be valuable antagonists against *R. solani*, and for some isolates, the host seems to influence their biocontrol effect directly.

Keywords: Damping-off. Rhizocompetence. Antagonisms.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Emergência de plântulas de feijão e probabilidade de emergência de plântulas com sintomas ocasionados por *R. solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo. 38
- Figura 2.** Emergência de plântulas de feijão e probabilidade de emergência de plântulas com sintomas ocasionados por *R. solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo. 40
- Figura 3.** Frequência de *Clonostachys* spp. em raízes de feijão processadas sem ou com desinfestação superficial, ao final da primeira e segunda execução do ensaio de biocontrole, respectivamente. 43
- Figura 4.** Frequência de *Clonostachys* spp. em raízes de soja processadas sem ou com desinfestação superficial, ao final da primeira e segunda execução do ensaio de biocontrole, respectivamente. 44
- Figura 5.** Boxplots da emergência de plântulas de soja na área comercial em Cambará-PR após duas avaliações realizadas com intervalo de 30 dias, com a aplicação de *Clonostachys* spp. e Moss®. 46
- Figura 6.** Médias (pontos sólidos) e intervalos de confiança de 95% (linhas verticais) da produção estimada da safra 2020/2021, na área comercial de soja, Cambará-PR, em parcelas tratadas com *Clonostachys* spp. e Pick Up Moss®. 47
- Figura 7.** Viabilidade de conídios dos isolados de *Clonostachys* spp. determinada no período de seis meses, iniciando no mês de outubro/2020 até março/2021, armazenados em câmara fria a 4°C. 50

FIGURAS SUPLEMENTARES

- Figura suplementar 1.** *Rhizoctonia solani* ocasionando sintomas de pré e pós-emergência em plântulas de feijão. 61
- Figura suplementar 2.** Emergência de plântulas de feijão, sem e com sintomas ocasionados por *R. solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo e no tratamento de sementes. 62
- Figura suplementar 3.** Emergência de plântulas de soja, sem e com sintomas ocasionados por *R. solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo e no tratamento de sementes. 63
- Figura suplementar 4.** Micoparasitismo de *Clonostachys* spp. em *Rhizoctonia solani*. 64
- Figura suplementar 5.** Precipitação Pluviométrica desde os meses que antecederam a semeadura até o período da avaliação dos sintomas de tombamento. 64
- Figura suplementar 6.** Temperatura máxima e mínima desde os meses que antecederam a semeadura até o período da avaliação dos sintomas de tombamento. 65

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Lista de isolados de <i>Clonostachys</i> spp. e <i>Rhizoctonia solani</i> usados nos bioensaios em casa de vegetação.	26
Tabela 2. Descrição dos tratamentos para o teste em área comercial.	32
Tabela 3. Comparação da emergência das plântulas de feijão com aplicação de <i>Clonostachys</i> spp. no solo e no tratamento de sementes para o biocontrole de <i>Rhizoctonia solani</i> .	36
Tabela 4. Comparação da emergência das plântulas de soja com aplicação de <i>Clonostachys</i> spp. no solo e no tratamento de sementes para o biocontrole de <i>Rhizoctonia solani</i> .	37
Tabela 5. Classificação dos isolados de <i>Clonostachys</i> spp. conforme a atividade de biocontrole nos ensaios em casas de vegetação com as culturas do feijão e da soja.	41
Tabela 6. Frequência de fungos nas subamostras de solo da propriedade comercial de soja, Cambará-PR.	48

TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1. Emergência de plântulas de feijão e probabilidade de emergência de plântulas com sintomas ocasionados por <i>Rhizoctonia solani</i> , após a aplicação de <i>Clonostachys</i> spp. no solo.	66
Tabela suplementar 2. Emergência de plântulas de soja e probabilidade de emergência de plântulas com sintomas ocasionados por <i>Rhizoctonia solani</i> , após a aplicação de <i>Clonostachys</i> spp. no solo.	67
Tabela suplementar 3. Avaliação da emergência de plântulas e produção estimada de soja do bioensaio da área comercial de Cambará-PR.	68
Tabela suplementar 4. Resultado da análise de solo do campo comercial de soja, Cambará-PR.	68

SUMÁRIO

Introdução Geral	12
Referências	18
Artigo: Biocontrole de tombamento ocasionado por <i>Rhizoctonia solani</i> em plântulas de feijão e soja com <i>Clonostachys</i> spp.	22
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Obtenção dos fungos	25
2.1.1. Extração de DNA ePCR	26
2.2. Teste de Patogenicidade	27
2.3. Biocontrole de tombamento de plântulas de feijão e soja por <i>Rhizoctonia solani</i>	28
2.3.1. Métodos de aplicação com <i>Clonostachys</i> spp.	28
2.3.2. Ensaios de biocontrole com diferentes espécies de <i>Clonostachys</i>	29
2.3.3. Frequência de <i>Clonostachys</i> nas raízes de soja e feijão	29
2.4. Ensaio de Biocontrole em Campo Comercial de Soja	30
2.4.1. Produção massal de <i>Clonostachys</i>	30
2.4.2. Viabilidade dos conídios	30
2.4.3. Aplicação no campo	31
2.4.4. Avaliação de doenças e produtividade	32
2.4.5. Análise química e biológica do solo	32
2.5. Análises Estatísticas	34
3. RESULTADOS	34
3.1. Biocontrole de tombamento de plântulas por <i>Rhizoctonia solani</i> em casa de vegetação	34
3.1.1. Comparação entre os métodos de aplicação com <i>Clonostachys</i> spp.	34
3.1.2. Efeito de <i>Clonostachys</i> spp. aplicado no solo no biocontrole de <i>R. solani</i>	37
3.1.3. Frequência de <i>Clonostachys</i> spp. nas raízes	41
3.2. Bioensaio em campo comercial	45
3.2.1. Avaliação de doenças e produtividade	45
3.2.2. Análise do solo	47
3.2.3. Viabilidade dos conídios	49
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS	57
7. DADOS SUPLEMENTARES	61

Introdução Geral

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a principal cultura agrícola do Brasil, atualmente o maior produtor mundial da oleaginosa. Essa cultura ocupa um lugar importante na indústria mundial de alimentos, oferecendo óleo para consumo humano e um farelo rico em proteínas para alimentação animal. Com a expectativa de crescimento populacional e demanda por proteína vegetal, o uso de soja aumenta a cada ano (Contini; Pena Júnior; Vieira, 2013; Gazzoni; Dall'agnol, 2018). A área de cultivo está estimada em 38,2 milhões de hectares, ocupando 56% do total (65,9 milhões de hectares) da área cultivada (Conab, 2020). O desafio do Brasil é manter a capacidade de produzir soja de forma rentável e sustentável (Cattelan; Dall'agnol, 2018).

Outra cultura de importância para o país é o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), considerada a leguminosa de grão mais importante para o consumo humano direto no mundo (Broughton et al., 2003). O Brasil se destaca não só como o maior consumidor, mas também como o terceiro maior produtor do feijão comum, com 10% da produção mundial anual (Salvador, 2020). A cultura é considerada de ciclo curto e, por isso, apresenta uma vantagem para o produtor, que consegue adequar o seu plantio dentro de uma janela menor, sem ter que renunciar à produção de outros grãos no mesmo ano agrícola. Nesse cenário, o Brasil possui três épocas distintas de plantio, favorecendo assim, uma oferta constante do produto ao longo do ano (Conab, 2020).

A produção das duas leguminosas é constantemente desafiada por vários fatores abióticos e bióticos. Dentre os fatores bióticos, as doenças, e principalmente as doenças fúngicas, são apontadas como a principal causa da baixa produtividade nas lavouras (Michereff et al., 2005). A importância econômica de uma doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra, e da cultivar utilizada (Sinclair; Hartman, 1999; Embrapa, 2013).

Doenças nas culturas da soja e do feijão

Considerando as doenças fúngicas, as mais comuns na cultura da soja são: ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), oídio (*Microsphaera diffusa*), mancha-alvo (*Corynespora cassicola*), mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), podridão da Rhizoctonia (*Rhizoctonia solani*), podridão cinzenta do caule (*Macrophomina phaseolina*) e o complexo de doenças de final de ciclo causados por *Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii* (Almeida et al., 2001,

Almeida et al., 2005; Henning et al., 2014). A cultura do feijão é acometida principalmente pelas doenças: antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha-angular (*Pseudocercospora griseola*), ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), mela e/ou tombamento (*Rhizoctonia solani*), oídio (*Erysiphe poligoni*), murcha-de-fusarium (complexo *Fusarium oxysporum*), podridão radicular seca, (complexo *Fusarium solani*) (Jaccoud Filho; Passini, 2018) e podridão cinzenta (*Macrophomina phaseolina*) (Singh; Schwartz, 2010).

Os fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* e *Macrophomina phaseolina* são denominados fitopatógenos habitantes do solo. São definidos assim, porque passam a maior parte do seu ciclo de vida no solo, infectam órgãos subterrâneos ou caules das plantas, têm capacidade de sobreviver no solo por um longo período na ausência de seus hospedeiros, possuem capacidade de competição saprofítica e seus estádios de disseminação e sobrevivência são confinados ao solo, embora alguns possam produzir esporos dispersos pelo ar ou água (Hillocks; Waller, 1997).

Manejo de fitopatógenos habitantes do solo

Devido às características dos fitopatógenos transmitidos pelo solo, e em particular sua sobrevivência no solo, há dificuldade na aplicação de ferramentas de controle (Katan; Shtienberg; Gamliel, 2012). Um conjunto de medidas básicas devem ser tomadas para que o inóculo não continue sua propagação para toda a área e, conseqüentemente, se dissemine para outras regiões (erradicação), o que acarreta danos severos à produção. Assim, métodos como controle físico, cultural, químico e biológico podem ser adotados.

Medidas culturais devem ser levadas em consideração, como: rotação e sucessão de culturas, controle da irrigação quando possível, previsão da melhor data de semeadura e definição da melhor densidade de plantas para a cultura. Com essas medidas adotadas, pode-se evitar a permanência e aumento do inóculo do patógeno na área, diminuir as condições/microclima favorável para a ocorrência da doença, além de se tentar o escape das épocas favoráveis da infecção do patógeno, adiando ou atrasando a semeadura (Katan, 2000). A semeadura superficial das sementes, em torno de 2 cm de profundidade, é um método de escape empregado contra tombamentos pelo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Chang et al., 2004).

A solarização do solo é uma prática realizada antes do plantio, por meio do aquecimento solar do solo (45-55°C), o qual é coberto com material plástico transparente apropriado, durante

a estação quente e seca, por cerca de quatro a seis semanas. Tem como objetivo a redução efetiva das populações de fitopatógenos presentes, com o mínimo de dano às atividades biológicas que são essenciais ao ecossistema solo (Katan, 2017). Existem patógenos termotolerantes, como *Macrophomina phaseolina*, que não são controlados pela solarização do solo (Katan; Gamliel, 2012). A solarização é um método aplicado principalmente em hortaliças, mas a instalação do filme plástico em grandes áreas no campo de feijão e soja, pode ser feita por máquinas especialmente desenvolvidas para tal finalidade (Ghini, 2001).

O uso de cultivares resistentes é uma opção rentável e eficiente, contudo, não existem cultivares resistentes para a maioria dos fitopatógenos de solo e, quando existem, a resistência é parcial, ou de fácil suplantação por esses fitopatógenos (Bellé; Fontana, 2018). O uso de diferentes cultivares mais tolerantes de feijão e soja, quando existe essa opção, entre uma safra e outra, pode retardar a suplantação. São exemplos de genótipos com fontes de resistência a cultivar de feijão BRS FP 403, moderadamente resistente à murcha de fusarium (complexo *Fusarium oxysporum*), podridão radicular seca (complexo *Fusarium solani*) e damping-off (*Rhizoctonia solani*) (Souza et al., 2019), e a cultivar de soja BRS 137, moderadamente resistente à podridão vermelha da raiz (complexo *Fusarium solani*), (Gásperi; Prestes; Costamilan, 2003). Dentre as práticas de controle recomendadas, principalmente para o tombamento de plântulas, o tratamento das sementes com fungicidas assume um importante papel, sendo considerado, até o momento, a principal medida a ser adotada tanto no feijão como na soja. O tratamento com fungicidas protege as plântulas do ataque dos fitopatógenos no início do seu desenvolvimento, mas se a área estiver com alta infestação, essa proteção não será suficiente para proteger o cultivo até o período de colheita (Gaspar et al., 2015).

Com a dependência do uso de fungicidas no tratamento de sementes para o controle de fitopatógenos habitantes do solo, pode ocorrer uma pressão de seleção de indivíduos resistentes, reduzindo a eficiência dos produtos (Ajayi-Oyetunde; Bradley, 2018). Diante desse cenário, medidas complementares precisam ser introduzidas no manejo destes fitopatógenos, de forma a promover um controle eficiente do inóculo sobrevivente e aumentar a eficiência de controle com os fungicidas.

Controle biológico: uma ferramenta segura e viável

A introdução de microrganismos que possuam ação antagônica aos fitopatógenos habitantes do solo é vista como uma ferramenta viável de manejo tanto na pesquisa quanto em

escala comercial (Lopes; Michereff, 2018). Produtos comerciais para o controle biológico de doenças à base de fungos e bactérias são os mais comuns no Brasil, compostos principalmente por fungos micoparasitas do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus* (MAPA, 2021). Os produtos biológicos para o controle das doenças radiculares são formulados para tratamento de sementes e aplicação no sulco do plantio (Bettiol, 2012).

Bactérias empregadas no controle biológico de doenças ocasionadas por fitopatógenos habitantes do solo são principalmente dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*. As características relacionadas ao biocontrole destas incluem a capacidade de: utilizar rapidamente exsudatos de sementes e raízes; colonizar e se multiplicar nos ambientes da rizosfera, espermosfera e no interior da planta; produzir um amplo espectro de metabólitos bioativos (ou seja, antibióticos, voláteis, sideróforos, substâncias promotoras de crescimento); competir agressivamente com outros microrganismos (Singh et al., 2018).

Os fungos micoparasitas do gênero *Trichoderma* compõem a maioria dos produtos usados no manejo de doenças no Brasil, sendo usados para o controle de fitopatógenos como: *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *Thielaviopsis paradoxa*, *M. phaseolina* e *Moniliophthora perniciosa* e patógenos do complexo *Fusarium solani*. Os agentes de biocontrole do gênero *Trichoderma*, além da competição por espaço, água, nutrientes e oxigênio com estes fitopatógenos na rizosfera, devido ao seu rápido crescimento, protegem as raízes contra a penetração destes. Estes fungos têm efeitos na erradicação do inóculo através do parasitismo e secreção de enzimas hidrolíticas que atuam diretamente na degradação da parede celular dos fitopatógenos, como outras proteínas com atividades antifúngicas. Além dos efeitos sobre os fitopatógenos, *Trichoderma* spp. mostra efeitos diretos sobre a planta, com a promoção da produção de raízes, aumento da absorção de nutrientes e maior crescimento, além dos efeitos de estimulação do sistema de defesa (Meyer; Mazaró; Silva, 2019; MAPA, 2021).

Clonostachys spp. **no biocontrole**

Outro gênero de fungos micoparasitas com potencial de uso no biocontrole de doenças de plantas é o *Clonostachys*. Ao contrário de *Trichoderma*, em que várias espécies são conhecidas, investigadas e empregadas no controle biológico, os estudos sobre *Clonostachys* se concentram somente na espécie *C. rosea*, e ainda não há registros no Brasil de produtos biológicos à base desse fungo para o manejo de doenças radiculares.

A espécie *C. rosea* contém micoparasitas inespecíficos destrutivos empregados no biocontrole de doenças ocasionadas fitopatógenos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Bipolaris*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Moniliophthora*, que ocasionam doenças na parte aérea, e *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Rhynchosporium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Macrophomina* causando podridão de sementes e podridão radicular, além de atuar no biocontrole de alguns fitonematoides (Silva et al., 2021; Sun et al., 2020; Gimeno et al., 2019; Rodríguez et al, 2011; Ndiaye; Termorshuizen; Van Bruggen, 2010). Há alguns relatos de biocontrole de *C. rosea* sobre o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, nas culturas da soja e do feijão (Ndiaye; Termorshuizen; Van Bruggen, 2010; Morandi; Costa, 2009).

O mecanismo de controle biológico de *C. rosea* é atribuído principalmente à secreção de enzimas que degradam a parede celular, à produção de metabólitos secundários e à indução de resistência de plantas (Chatterton; Punja, 2009 ; Fatema et al., 2018). Estudos demonstram que, dentre os metabólitos secundários responsáveis pela atividade antimicrobiana de *C. rosea* estão: peptaibols, epipolisulfanildioxopiperazinas e policetídeos (Dong et al., 2005; Fatema et al., 2018; Rodriguez et al., 2011; Zhai et al., 2016). *C. rosea* também possui boa tolerância a compostos tóxicos produzidos por fungos-presa e a fungicidas, dada por mecanismos intracelulares de desintoxicação associados a um grande número de transportadores de membranas, responsáveis pela excreção de substâncias (Karlsson et al. 2015; Dubey; Jensen; Karlsson, 2016).

Existem cerca de 50 espécies no gênero *Clonostachys* e levantamentos da diversidade de espécies existentes nos solos e outros substratos naturais brasileiros mostraram que há pelo menos dez espécies de *Clonostachys* comumente encontradas, algumas bem mais abundantes e dispersas do que *C. rosea* (Schroers, 2001; Abreu et al., 2014; Moreira et al, 2016). A extensa literatura sobre o potencial de biocontrole de *C. rosea* está em nítido contraste com a ausência de informações sobre as possibilidades de uso de outras espécies de *Clonostachys* no manejo de fitopatógenos habitantes do solo. Silva et al. (2021) mostraram que, além da espécie *C. rosea*, isolados de três outras espécies de *Clonostachys* foram efetivos no controle da pinta-preta da batata em casa de vegetação, através da proteção das plantas, retardo no progresso da doença e erradicação do inóculo do patógeno sobrevivente nos restos da cultura, por meio do micoparasitismo.

Diante desse cenário, avaliar a eficácia das demais espécies sobre os patógenos habitantes do solo se torna uma oportunidade para encontrar agentes de biocontrole adaptados às condições de solo brasileiro, que possam ser tão ou mais eficazes que *C. rosea* ou mesmo

que produtos à base de *Trichoderma* spp. já empregados no Brasil. Essa estratégia poderá contribuir para ampliar as opções de agentes de biocontrole no manejo de fitopatógenos habitantes do solo.

Referências

- Abreu, L. M.; Moreira, G. M.; Ferreira, D.; Rodrigues-Filho, E.; Pfenning, L. H. Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry. **Fungal biology**, v. 118, n. 12, p. 1004-1012, 2014.
- Almeida, A. M. R.; Seixas, C.D.S. **Soja: doenças radiculares e de hastes e interrelações com o manejo do solo e da cultura**. Londrina: Embrapa Soja, p. 399, 2010.
- Almeida, A. M. R.; Torres, E.; Farias, J. R. B.; Benato, L. C.; Pinto, M. C.; Marins, S. R. R. **Macrophomina phaseolina em soja: Sistema de semeadura, sobrevivência em restos cultura e diversidade genética**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.
- Ajayi-Oyetunde, O. O.; Bradley, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant pathology**, v. 67, n. 1, p. 3-17, 2018.
- Bellé, R.; Fontana, D. Patógenos de Solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 28, p. 779-803, 2018. Centro Científico Conhecer. http://dx.doi.org/10.18677/encibio_2018b65.
- Bettiol, W.; Morandi, M. A. B.; Pinto, Z. V.; Paula Júnior, T. J.; Corrêa, E. B.; Moura, A. B.; Lucon, C. M. M.; Costa, J. C. B.; Bezerra, J. L. **Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 155, 2012.
- Broughton, W. J.; Hernandez, G.; Blair, M.; Beebe, S.; Gepts, P.; Vanderleyden, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.
- Cattelan, A. J.; Dall’Agnol, A. The rapid soybean growth in Brazil. **Ocl**, v. 25, n. 1, p. 1-12, jan. 2018. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/ocl/2017058>.
- Chang, K. F.; Hwang, S. F.; Gossen, B. D.; Turnbull, G. D.; Howard, R. J.; Blade, S. F. Effects of soil temperature, seeding depth, and seeding date on rhizoctonia seedling blight and root rot of chickpea. **Canadian journal of plant science**, v. 84, n. 3, p. 901-907, 2004.
- Chatterton, S.; Punja, Z. K. Chitinase and β -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. catenulata against fungal plant pathogens. **Canadian journal of microbiology**, v. 55, n. 4, p. 356-367, 2009.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2020/2021, Brasília, v. 7, 2020. Disponível em: https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/32932_bd1481aad9724985f6cd7d2ad9655cf2, acessado em 25 de janeiro de 2021.
- Contini, E.; Pena Júnior, M.; Vieira, P. A. Seca norte-americana. Preços agrícolas e implicações para o Brasil. **Revista de Política Agrícola**. Brasília, DF, vol. 22, n° 1. p. 85-97, 2013.
- Dong, J. Y.; He, H. P.; Shen, Y. M.; Zhang, K. Q. Epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. **Journal of natural products**, v. 68, n. 10, p. 1510-1513, 2005.

Dubey, M.; Jensen, D. F.; Karlsson, M. The ABC transporter ABCG29 is involved in H₂O₂ tolerance and biocontrol traits in the fungus *Clonostachys rosea*. **Molecular Genetics And Genomics**, v. 291, n. 2, p. 677-686, 31 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-015-1139-y>.

EMBRAPA. Sistema de plantio direto. Janeiro, 2013. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONT000fu5hwsuy02wx5eo0c9s%20lralhbxadb.html>>. Acesso em 23 de janeiro de 2021.

Fatema, U.; Broberg, A.; Jensen, D. F.; Karlsson, M.; Dubey, M. Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2018.

Gaspar, A. P.; Mitchell, P. D.; Conley, S. P. Economic risk and profitability of soybean fungicide and insecticide seed treatments at reduced seeding rates. **Crop Science**, v. 55, n. 2, p. 924-933, 2015. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.02.0114>

Gásperi, A. C.; Prestes, A. M.; Costamilan, L. M. Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 544-547, 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-41582003000500013>.

Gazzoni, D. L.; Dall’Agnol, A. **A saga da soja: de 1050 a.C. a 2050 d.C.** Brasília: Embrapa Soja, p. 199, 2018.

Ghini, R. **Solarização do solo**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 4, 2001. Disponível em:http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Ghini_solarizacaoID-VArAMJxNVp.pdf. Acesso em: 17 jun. 2021.

Gimeno, A.; Sohlberg, E.; Pakula, T.; Limnell, J.; Keller, B.; Laitila, A.; Vogelgsang, S. TaqMan qPCR for Quantification of *Clonostachys rosea* Used as a Biological Control Agent Against *Fusarium graminearum*. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, p. 1627, 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01627>.

Henning, A.A.; Almeida, A. M.; Godoy, C. V.; Seixas, C. D. S.; Yorinori, J.T.; Costamilan, L. M.; Ferreira, L. P.; Meyer, M. C.; Soares, R. M.; Dias, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. Ed.5. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

Hillocks, R. J.; Waller, J.M. Soilborne diseases and their importance in tropical agriculture. In: Hillocks, R. J.; Waller, J. M. (Eds.) **Soilborne Diseases of Tropical Crops**. Wallingford. CAB International. p. 3-16, 1997.

Jaccoud Filho, D. S.; Passini, F. B. Ferrugem Asiática da Soja na Cultura do Feijão. In: Pria, M. D.; Silva, O. C. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora Uepg, p. 75-88, 2018.

Karlsson, M., Durling, M. B., Choi, J., Kosawang, C., Lackner, G., Tzelepis, G. D., ... & Jensen, D. F. Insights on the Evolution of Mycoparasitism from the Genome of *Clonostachys rosea*.

Genome Biology and Evolution, v. 7, n. 2, p. 465-480, 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evu292>.

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

Katan, J. Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. **Crop Protection**, v. 19, n. 8-10, p. 725-731, 2000.

Katan, J.; Gamliel, A. **Soil solarization: Theory and practice**. APS Press, St. Paul, MN, USA, 2012.

Katan, J.; Shtienberg, D.; Gamliel, A. The integrated management concept in the context of soilborne pathogens and soil disinfestation. **Soil solarization: theory and practice**, p. 91-97, 2012.

Lopes, U. P.; Michereff, S. J. Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. **Recife: Edufrpe**, 2018.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **AGROFIT: sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 12 Fev. 2021

Meyer, M. C.; Mazaro, S. M.; Silva, J. C. Trichoderma uso na agricultura. **Embrapa Soja-Livro científico (ALICE)**, p. 538, 2019.

Michereff, S. J.; Andrade, D. E. G. T.; Peruch, L. A. M. Manejo Integrado de Doenças Radiculares. In: Michereff, S. J.; Andrade, D. E. G. T.; Menezes, M. (ed.). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife: Ufrpe, p. 1-398, 2005.

Morandi, M. A. B.; Costa, L. B. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on beans in field by *Trichoderma asperellum* and *Clonostachys rosea*. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Meeting of the working group biological control of fungal and bacterial plant pathogens, 10., 2009, Interlaken, Switzerland. Molecular tools for understanding and improving biocontrol. IOBC WPRS Bulletin, v. 43, p. 243-246, 2009.

Ndiaye, M.; Termorshuizen, A. J.; Van Bruggen, A. H. C. Effects of compost amendment and the biocontrol agent *Clonostachys rosea* on the development of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea. **Journal of Plant Pathology**, p. 173-180, 2010.

Rodríguez, M. A.; Cabrera, G.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Godeas, A. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 5, p. 1177-1186, 2011.

Salvador, C. A. Mercado Mundial do Feijão. In: GARRIDO, M. (ed.). **Boletim Semanal* – 14/2020 – 07 de agosto de 2020**. Paraná: Governo do Estado do Paraná, p. 1-6, 2020. Disponível em:

http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-08/boletim_semanal_14_deral_07_agosto_2020f_0.pdf. Acesso em: 26 jan. 2021.

Schroers, H. J. A monograph of Bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **STUD MYCOL**, v. 46, p. 1-214, 2001.

Silva, H. A. O.; Teixeira, W. D.; Borges, Á. V.; Silva Junior, A. L.; Alves, K. S.; Rodrigues Junior, O. M.; Abreu, L. M. Biocontrol of potato early blight and suppression of *Alternaria grandis* sporulation by *Clonostachys* spp. **Plant Pathology**, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppa.13402>

Singh, S.; Kumar, R.; Yadav, S.; Kumar, R.; Kumari, P.; Singh, R. K. Effect of bio-control agents on soil borne pathogens: A review. **Journal Of Pharmacognosy and Phytochemistry**, India, v. 3, n. 7, p. 406-411, 2018.

Singh, S. P.; Schwartz, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199-2223, 2010.

Sinclair, J. B.; Hartman, G. L. Soybean Rust. In: Hartman, G. L.; Sinclair, J. B.; Rube, J.C. (Eds). **Compendium of Soybean Diseases**. 4 ed. Saint paul MN. APS Press, p. 25-26, 1999.

Souza, T. L. P. O. D., Pereira, H. S., Peloso, M. J. D., Faria, L. C. D., Costa, J. G. C. D., Wendland, A., ... & Melo, L. C. BRS FP403: high-yielding black-seeded common bean cultivar with superior grain quality and moderate resistance to fusarium wilt. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 240-244, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332019v19n2c34>.

Sun, Z. B.; Li, S. D.; Ren, Q.; Xu, J. L.; Lu, X.; Sun, M. H. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 3, p. 486-495, 2020.

Zhai, M. M.; Qi, F. M.; Li, J.; Jiang, C. X.; Hou, Y.; Shi, Y. P., Di, D. L.; Zhang, J.W.; Wu, Q. X. Isolation of secondary metabolites from the soil-derived fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a biological control agent, and evaluation of antibacterial activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 11, p. 2298-2306, 2016.

Artigo: Biocontrole de tombamento ocasionado por *Rhizoctonia solani* em plântulas de feijão e soja com *Clonostachys* spp.

1. Introdução

A produção de soja em áreas tropicais aumentou nas últimas décadas e esse crescimento deve continuar. O cultivo intensivo em áreas extensas, principalmente com a monocultura, leva ao desenvolvimento de doenças e/ou estresses, que podem ter impactos profundos na produtividade. Entre as doenças, uma das mais importantes no início do ciclo, e de difícil controle nos campos cultivados com soja, é o damping-off ou tombamento ocasionado por *Rhizoctonia solani* (Lopes et al., 2018). O mesmo ocorre no feijoeiro, no qual, dentre as doenças ocasionadas por fitopatógenos habitantes do solo, o tombamento por *R. solani* é umas das principais (Bianchini, Maringoni, Carneiro, 2005).

Pertencente ao filo Basidiomycota, *R. solani* é identificada principalmente por seus caracteres vegetativos, através da formação de hifas septadas multinucleadas, inicialmente hialinas e que tornam-se marrons, ramificação de hifas em ângulo reto, ramificação do hilo que se origina do septo doliporo distal com uma constricção característica no ponto de ramificação, a presença de células monilioides e escleródios de textura uniforme que são geralmente produzidos pela maioria, mas não por todos os membros do grupo. O estado sexual é caracterizado por um himênio ramificado verticalmente, seguido por camadas de basídios alongados ligeiramente mais largos que as hifas basais. Este patógeno também é classificado por um sistema baseado em grupos de anastomose de hifas (AG), no qual isolados geneticamente semelhantes, que imediatamente unem suas hifas e compartilham citoplasma e núcleo, são colocados no mesmo grupo de anastomose (Ajayi-Oyetunde; Bradley, 2018).

Para que a maioria das infecções ocasionadas por *Rhizoctonia* ocorram, os escleródios primeiro devem germinar para formar micélios que crescem em direção à planta hospedeira, em resposta a exsudatos liberados por essas. Após a fixação de suas hifas no tecido do hospedeiro, o fungo se desenvolve ao longo das paredes das células epidérmicas, formando hifas que irão penetrar e colonizar o tecido (Keijer, 1996). A infecção ocasionada por *R. solani* tem sido associada à produção de enzimas e toxinas que levam à morte do tecido hospedeiro antes mesmo da colonização, caracterizando-o como patógeno necrotrófico (Van Kan, 2006).

Em relação aos sintomas, no feijão, *R. solani* reduz o estande de plantas através do tombamento de plântulas, causa lesões necróticas nas folhas (mela ou murcha da teia micélica)

e leva à perda de produtividade de até 100% (Ghini; Zaroni, 2001). O sintoma mais comum de *R. solani* no feijão comum é a lesão na interface raiz-parte aérea, conhecida como damping-off (Schwartz et al., 2005). Os sintomas da doença na soja variam desde a podridão da semente e o tombamento em pré-emergência, especialmente sob alta densidade de inóculo, até a podridão radicular ou do hipocótilo, dependendo de qual grupo de anastomose está presente no momento da infecção (Ajayi-Oyetunde; Bradley, 2018). Na região amazônica, existe uma variante da anastomose do patógeno (AG-4 HI) que é responsável tanto pelos sintomas de damping-off quanto pela mela, ou seja, os sintomas são observados em todo o ciclo do feijão e da soja (Nechet; Halfeld-Vieira, 2006). A cultura da soja e do feijão no Brasil, partilham, na maioria das vezes, grupos de anastomose (AG-1 IA, AG-1 IF, AG-2-2IIIB, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-4 HGIII) (David et al., 2018).

O manejo eficaz desta doença se baseia na adoção de várias medidas de controle, como o uso de sementes certificadas, sementes tratadas com fungicidas ou produtos biológicos e, quando disponíveis, o uso de cultivares resistentes. Mas a escassez de cultivares comerciais com altos níveis de resistência tem impedido sua introdução no manejo dessa doença, resultando no uso de tratamentos de sementes com fungicidas, que oferecem proteção tanto à semente quanto à muda durante os estágios iniciais de crescimento (Dorrance et al., 2003), como o método mais utilizado para o controle de *R. solani* (Ajayi-Oyetunde; Bradley, 2018). Atualmente no Brasil, são registrados 51 produtos para controle de *R. solani* na cultura da soja e 24 produtos na cultura do feijão, sendo a grande maioria composta pelo mesmo ingrediente ativo, carbendazim, fungicida sistêmico com ação preventiva do grupo dos benzimidazóis e outros do grupo dos triazóis (ipconazol, por exemplo) (MAPA, 2021)..

A busca por medidas eficientes para complementar o uso dos fungicidas se faz necessária. Nos Estados Unidos, a resistência aos fungicidas inibidores externos de quinonas utilizados no tratamento de sementes de soja já foi registrada em populações de AG-1 de *R. solani* (Ajayi-Oyetunde; Bradley, 2018; Olaya et al., 2012). Portanto, a introdução de microrganismos habitantes do solo que possuam ação antagônica a *R. solani* é vista como uma alternativa viável tanto na pesquisa quanto em escala comercial (Lopes; Michereff, 2018). Esses microrganismos compõem produtos biológicos que são formulados para tratamento de sementes e aplicação no sulco do plantio (Bettiol, 2012), de maneira que, além de oferecerem proteção às sementes, podem colonizar o solo e provocar um efeito prolongado de biocontrole. Por outro lado, o número de opções disponíveis de agentes de biocontrole é restrito a poucos grupos taxonômicos, compostos por fungos micoparasitas do gênero *Trichoderma* e bactérias

do gênero *Bacillus* (MAPA, 2021), indicando uma lacuna que poderá ser preenchida com a pesquisa envolvendo outros potenciais antagonistas de *R. solani* e demais fitopatógenos habitantes do solo.

A espécie *Clonostachys rosea* é caracterizada por seu micoparasitismo eficiente contra muitos fitopatógenos, dentre eles, fitopatógenos habitantes do solo como: *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Rhynchosporium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Macrophomina* que causam podridão de sementes e podridão radicular (Sun et al., 2020; Rodríguez et al, 2011; Ndiaye; Termorshuizen; Van Bruggen, 2010). Além de micoparasita, *C. rosea* pode secretar substâncias tóxicas e metabólitos secundários que auxiliam no antagonismo a fitopatógenos, como também pode induzir o sistema de defesa da planta (Daguerre et al., 2014).

Além de *C. rosea*, há uma diversidade de espécies no gênero isoladas de solos e outros substratos naturais brasileiros, encontradas de forma mais abundante que *C. rosea* (Schroers, 2001; Abreu et al., 2014; Moreira et al, 2016). Silva et al. (2021), trabalhando com *C. chloroleuca*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga*, observou que isolados dessas outras espécies também eram efetivos no controle da pinta-preta na batata ocasionada por *Alternaria grandis*. Na busca por novos agentes de controle biológico para o manejo eficiente de fitopatógenos habitantes do solo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o biocontrole de tombamento, mediante emergência das plântulas, por *R. solani* em plântulas de feijão e soja com isolados de diferentes espécies de *Clonostachys*, através de bioensaios em casa de vegetação, como também em uma área de plantio comercial de soja com histórico desta doença.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados na Unidade de Controle Biológico (UCB) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e em um campo comercial de soja na safra 2020/21 (propriedade Santa Maria, Cambará - PR), com histórico de doenças por patógenos habitantes do solo (Produtor Paulo Nunes, 2020, comunicação pessoal).

2.1. Obtenção dos fungos

A partir de amostras de solo, provenientes do campo comercial de soja no Paraná, foram obtidos dois isolados denominados UCBV 255 e UCBV 256 de *Clonostachys chloroleuca* (identidades confirmadas pelo sequenciamento de *acl1*, conforme descrito no item 2.1.1, seguido da comparação com sequências de referência, usadas por Moreira et al., 2016). O isolado UCBV 257 de *Rhizoctonia solani* (identidade confirmada pela caracterização morfológica, Figura Suplementar 1A, 1B e 1C) foi obtido por meio de isolamento indireto de plantas de soja com lesões no colo também oriundas do campo comercial de soja. Esses isolados foram adicionados à coleção de microrganismos da Unidade de Controle Biológico da Universidade Federal de Viçosa (UCBV).

Além do isolado UCBV 255 de *C. chloroleuca* (o isolado UCBV 256 não foi selecionado para os demais bioensaios), foram utilizados nove isolados de *Clonostachys* pertencentes à coleção de microrganismos da UCBV, conforme citados na Tabela 1. Os isolados de *Clonostachys* foram cultivados em meio de cultura aveia-ágar (30 g de aveia e 20 g de ágar/L de água destilada) e, após seu crescimento, foram retirados dez discos de micélio e distribuídos em sacos de polipropileno contendo 20 gramas de arroz parboilizado esterilizado e 18 mL de água (previamente autoclavados a 121 °C durante 30 minutos e pressão de 1 atm, por duas vezes, num intervalo de 24 horas), e cultivados por um período de 10 dias a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas luz.

Também foi adicionado aos bioensaios em casa de vegetação um tratamento com o produto comercial Trichodermil® SC 1306, composto pelo fungo *Trichoderma harzianum* cepa ESALQ-1306, registrado para o controle de *Rhizoctonia solani*.

Tabela 1. Lista de isolados de *Clonostachys* spp. e *Rhizoctonia solani* usados nos bioensaios em casa de vegetação.

Código	Espécie	Substrato	Local
UCBV 05	<i>C. pseudochroleuca</i>	<i>Lychnophora pinaster</i>	Ingaí, MG
UCBV 07	<i>C. chloroleuca</i>	Solo nativo do cerrado	Montividiu, GO
UCBV 35	<i>C. byssicola</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	Bento Gonçalves, RS
UCBV 38	<i>C. rhizophaga</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Taquarituba, SP
UCBV 44	<i>Clonostachys</i> sp. 1	Liteira	Itumirim, MG
UCBV 52	<i>Clonostachys</i> sp. 2	Solo da Floresta Amazônica	Benjamin Constant, AM
UCBV 98	<i>C. candelabrum</i>	Liteira	Itumirim, MG
UCBV 101	<i>C. rogersoniana</i>	Solo sob <i>Araucaria</i> sp.	São Paulo, SP
UCBV 133	<i>C. rosea</i>	<i>Prunus persica</i>	Viçosa, MG
UCBV 255	<i>C. chloroleuca</i>	Solo cultivado com soja	Cambará, PR
UCBV 257	<i>R. solani</i>	<i>Glycine max</i>	Cambará, PR

Estados Brasileiros: AM: Amazonas; GO: Goiás; MG: Minas Gerais; PR: Paraná; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo.

2.1.1. Extração de DNA e PCR

Os isolados de *Clonostachys* spp. obtidos de amostras de solo da área comercial de soja do Paraná foram cultivados em meio de cultura aveia-ágar por 7 dias a 25 °C no escuro. Em seguida, os micélios crescidos foram coletados e transferidos para microtubos de centrifugação estéreis de 1,5 mL contendo 3 beads de aço inoxidável para a maceração dos micélios. Os microtubos foram colocados em um disruptor mecânico de células L-Beader 3 (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) ajustado em 4000 rpm, 2 ciclos de 15s cada. O DNA total foi extraído utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

A partir do DNA extraído, fragmentos de ATP citrato liase (*ac11*) foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) utilizando os *primers* *ac11-230up* e *ac11-1220low* (Gräfenhan et al., 2011). Para a PCR, utilizou-se um volume total

de 12,5 µL, onde cada reação continha: 6,25 µL de Dream-Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA); 4 µL de água ultrapura esterilizada; 1,25 µL de BSA; 0,25 µL de DMSO; 0,25 µL de cada primer; e 0,25 µL de DNA (30 ng/µl). A reação de PCR obedeceu às seguintes condições: 94 °C por 5 min, 38 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C de 30 s, 72 °C de 30 s e uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Os produtos da PCR (4 µL de cada reação) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados sob luz UV. Em sequência, o restante de cada reação foi tratado com kit de purificação ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos de DNA amplificados foram enviados para sequenciamento pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, South Korea, <http://www.macrogen.com>).

2.2. Teste de Patogenicidade

O isolado UCBV 257 foi cultivado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e, após a colonização na placa, dez discos de micélio obtidos da borda de uma placa foram retirados e distribuídos em sacos de polipropileno contendo 20 gramas de arroz parboilizado esterilizado e 18 mL de água (previamente autoclavados a 121 °C durante 30 minutos e pressão de 1 atm, por duas vezes, num intervalo de 24 horas), incubados por 7 dias a 25°C. Para a realização do teste de patogenicidade em plantas de feijão, o solo utilizado foi misturado com substrato comercial na proporção 1:1 (volume/volume) e acondicionados em copos plásticos (capacidade de 250 mL); o solo foi infestado com grãos de arroz colonizados por *R. solani* na proporção de um grão por copo. O grão foi colocado na profundidade aproximada de 5 cm e coberto com o solo. Logo, prosseguiu-se com a semeadura de duas sementes de feijão carioca (sementes comerciais da marca Codil Alimentos LTDA) para cada vaso, na profundidade aproximada de 3 cm (adaptado de Silva-Barreto et al. 2010). A avaliação foi realizada até o final do estágio fenológico V3, e a patogenicidade foi confirmada pelo surgimento de sintomas de tombamentos de pré-emergência de plântulas e podridão, assim como lesões no colo quando ocorreu a emergência.

O tratamento controle foi composto por arroz parboilizado estéril. Cada tratamento tinha um total de 10 copos (repetições) e foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, em casa de vegetação com temperatura entre 25 ± 5°C.

2.3. Biocontrole de tombamento de plântulas de feijão e soja por *Rhizoctonia solani*

2.3.1. Métodos de aplicação com *Clonostachys* spp.

Três métodos de aplicação de *Clonostachys* foram inicialmente testados no biocontrole do tombamento causado por *Rhizoctonia solani* em plântulas de feijão carioca (o mesmo utilizado no teste de patogenicidade): tratamento de sementes, aplicação diretamente no solo e por arroz colonizado. Em todos os casos, o patógeno foi incorporado ao solo como feito no teste de patogenicidade (item 2.2.). Para este teste, foi utilizado apenas o isolado UCBV 07 (selecionada devido aos resultados obtidos em bioensaios anteriores) e os tratamentos controle consistiram em plantas não inoculadas com *R. solani* e plantas inoculadas mas não tratadas com *Clonostachys* spp., que receberam apenas aplicação de água destilada no mesmo volume dos tratamentos descritos a seguir.

O tratamento de sementes foi realizado de duas maneiras, a primeira com uma solução aquosa de sacarose a 0,5% (m/v), adicionada a uma suspensão filtrada e ajustada para 2×10^7 conídios.mL⁻¹ do isolado UCBV 07. Na segunda, o aditivo foi goma xantana a 0,2% (m/v). As sementes de feijão foram submersas na suspensão por um período de 5 minutos sob agitação manual (100 gramas de sementes por aproximadamente 10 mL da suspensão, todas sementes foram cobertas com a suspensão, sem que houvesse sobra do produto). Depois de secas em temperatura ambiente, duas sementes foram semeadas em cada copo plástico com capacidade de 250 mL, contendo solo e substrato na proporção 1:1 infestados com *R. solani*.

A aplicação de *Clonostachys* ao solo também foi realizada de duas formas: a primeira através da incorporação de 2 grãos de arroz colonizado pelo isolado de UCBV 07 em cada copo plástico (250 mL). O segundo método consistiu na aplicação direta ao solo de 12,5 mL da suspensão de 2×10^7 conídios. mL⁻¹ de *Clonostachys* em cada copo. Tanto o arroz colonizado quanto a suspensão de conídios foram incorporados ao solo no momento da semeadura. O cálculo para aplicação no solo foi baseado no volume de uma aplicação a campo correspondente a uma calda de 600 L/ha, visto que grandes volumes de calda podem elucidar melhor a presença de biocontrole ou não (Peng et al., 2010).

As avaliações foram realizadas até o final do estágio fenológico V3. Como parâmetro de avaliação da doença, foi determinada a incidência de tombamento pré-emergência e de sintomas pós-emergentes, determinados conforme a presença de lesões marrom-avermelhadas no colo da planta, ausência das folhas cotiledonares (mas presença das folhas verdadeiras, com

atraso na formação) e plântulas de tamanho inferior às do tratamento controle; não foi observado presença de tombamento pós-emergência.

2.3.2. Ensaio de biocontrole com diferentes espécies de *Clonostachys*

Os dois métodos de aplicação que apresentaram maior eficiência no controle do tombamento ocasionado por *R. solani* (tratamento de sementes com goma xantana e aplicação direta no solo) foram adotados como metodologia padrão para o bioensaio com todas as espécies descritas na tabela 1. Um tratamento com o produto comercial Trichodermil® SC 1306 também foi adicionado na concentração de conídios recomendada pelo fabricante (12,5 mL do produto aplicados diretamente ao solo); os bioensaios foram realizados com sementes de feijão carioca (sementes comerciais da marca Codil Alimentos LTDA) e soja das cultivares NS 5959 IPRO e TMG 7063 IPRO.

Todos os ensaios foram realizados duas vezes em casa de vegetação e seus tratamentos tinham um total de 10 repetições dispostas em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 13x2x2, 13 tratamentos contendo dois controles, um tratamento com o produto comercial e dez tratamentos com *Clonostachys* spp. aplicados nas culturas soja e feijão e comparados pelos dois métodos de aplicação. Na segunda repetição utilizou-se um datalogger, sendo possível atribuir ao bioensaio os seguintes dados: temperatura média de 20,6 °C, máxima de 34,9 °C e mínima de 14,2 °C variando a umidade relativa entre 40,6 e 74,3%, com média de 64 %.

2.3.3. Frequência de *Clonostachys* nas raízes de soja e feijão

Ao final de cada avaliação dos bioensaios com soja e feijão descritos anteriormente (com exceção dos testes preliminares), as raízes dos tratamentos aplicados diretamente ao solo foram retiradas, lavadas em água corrente e posteriormente com água destilada estéril mais Tween 80 (0,05%) com auxílio do vórtex, para analisar se houve colonização superficial na raiz das espécies de *Clonostachys*. Na segunda repetição, além da lavagem, realizou-se a desinfestação superficial nas raízes (30 segundos em álcool 70%, 3 minutos em hipoclorito de sódio 1% e duas lavagens com água destilada estéril) para avaliar a colonização endofítica de *Clonostachys* spp. Nos dois processos, após as lavagens e/ou desinfestação, foram retirados 10

fragmentos de raízes secas e distribuídos em placas de Petri contendo duas camadas de papéis estéreis umedecidos com 3 mL de água destilada estéril, incubadas em câmara BOD a 25°C por um período de 10 dias (ao 5º dia, era adicionado mais 3 mL de água destilada estéril).

A avaliação da frequência foi realizada com auxílio de um microscópio de dissecação, através da observação da presença estruturas características dos isolados de *Clonostachys*, como: abundante produção de massas de conídios (coloração branca, rosa ou verde) e observação de conidióforos penicilados e/ou verticilados sobre cada fragmento de raiz.

2.4. Ensaio de Biocontrole em Campo Comercial de Soja

2.4.1. Produção massal de *Clonostachys*

Três espécies de *Clonostachys*, representadas por dois isolados cada, foram utilizadas nos ensaios: *C. chloroleuca* (isolados UCBV 07 e 17), *C. rhizophaga* (isolados UCBV 06 e 38) e *C. rosea* (isolados UCBV 10 e 133).

Os isolados foram cultivados em meio de cultura aveia-ágar e 10 discos de 5 mm foram transferidos para grãos de arroz (250 gramas) umedecidos com 212,5 mL de água destilada acondicionados em sacos polipropileno, previamente esterilizados. Após cultivo inicial, por aproximadamente 3 dias em temperatura ambiente sob fotoperíodo de 12 horas luz, o arroz colonizado foi transferido para bandejas (33 x 24 cm) estéreis fechadas com papel kraft esterilizado, para maior circulação de ar e teve seu cultivo continuado por aproximadamente 7 dias, de modo a alcançar a completa colonização do arroz. As bandejas foram acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar para desidratação a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ por 72 horas. A biomassa seca de cada isolado foi triturada e peneirada (100 mesh), para posterior armazenamento em sacos plásticos na câmara fria (4°C).

2.4.2. Viabilidade dos conídios

O produto de cada isolado armazenado em câmara fria a 4°C foi avaliado no período de 6 meses, em intervalos de 30 dias. Para analisar a viabilidade, 10g do produto e 90g de solução salina estéril + Tween 80 a 0,1% (diluição 10^{-1}) foram colocados em agitador orbital por 60

minutos a 120 rpm. Após a agitação, as amostras foram acondicionadas em banho de ultrassom por 5 minutos e submetidas a diluições seriadas; 15 µL dos produtos das diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram depositados em cinco pontos previamente demarcados em duas placas de Petri contendo meio BDA, que foram incubadas em temperatura de 25 ± 2 °C no escuro por um período suficiente para germinação de cada isolado. O número de conídios germinados (presença do tubo germinativo com tamanho igual ou superior ao comprimento do conídio) e não germinados foi contabilizado nos cinco pontos determinados. Foram considerados 100 conídios em cada ponto e determinada a porcentagem média de conídios germinados e não germinados.

2.4.3. Aplicação no campo

A aplicação de cada tratamento foi realizada no sulco da semeadura, onde os produtos triturados dos dois isolados de *Clonostachys* de cada espécie foram misturados no momento da aplicação, ou seja, cada tratamento foi composto pela combinação dos isolados pertencentes à mesma espécie de *Clonostachys* (metodologia proposta em bioensaios anteriores com resultados promissores), a concentração usada foi de 1×10^7 conídios. mL⁻¹. Em todos os tratamentos, houve a adição de Tween 80 (0,1%) e, em metade deles foi adicionado o fertilizante Pick Up Moss ® fabricado pela empresa Ballagro (2,2% N ; 7,5% COT ; 1,7% P₂O₅ ; 1,7% K₂O ; 2,7% Cu ; 11% Mn ; 4,7% Zn), na dose recomendada de 200 mL ha⁻¹, com o intuito de avaliar o efeito conjunto com o agente de biocontrole. O experimento foi composto por oito tratamentos (Tabela 2), e cada tratamento foi aplicado em 4 parcelas de 15 m² (3m x 5m), em delineamento em blocos ao acaso (DBC); correspondendo a uma área total de 60 m² por tratamento. Em cada parcela, foram semeadas 300 sementes de soja da cultivar TMG 7062 IPRO com tratamento de sementes Standak® Top (10 sementes por metro linear, cada parcela era composta por 6 linhas), com um espaçamento de 10 cm entre planta e 45 cm entre linhas. As bordaduras de cada parcela foram desconsideradas na avaliação.

As aplicações foram realizadas logo após a semeadura, com o auxílio de um pulverizador costal pressurizado por CO₂, pressão de 32 lb pol⁻² ou 2,20 Bar e velocidade de deslocamento de 1 m s⁻¹, com taxa de aplicação de 200 L ha⁻¹, por meio de uma ponta tipo leque simples 11002-BD e peneira malha 50.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos para o teste em área comercial.

Tratamentos	Composição¹
T1	Testemunha
T2	Pick Up Moss ®
T3	<i>Clonostachys rhizophaga</i> (UCBV 06 + 38)
T4	<i>C. chloroleuca</i> (UCBV 07 + 17)
T5	<i>C. rosea</i> (UCBV 10 + 133)
T6	<i>C. rhizophaga</i> (UCBV 06 + 38) + Pick Up Moss ®
T7	<i>C. chloroleuca</i> (UCBV 07 + 17) + Pick Up Moss ®
T8	<i>C. rosea</i> (UCBV 10 + 133) + Pick Up Moss ®

¹As doses correspondentes a cada tratamento foram: T1 – 2L de água; T2 – 1mL de Pick Up Moss® diluídos em 2L de água; T3, T4 e T5 – concentração 1×10^7 conídios. mL⁻¹ em 2L de água e T6, T7 e T8 – concentração 1×10^7 conídios. mL⁻¹ e 1mL de Pick Up Moss® diluído em 2L de água.

2.4.4. Avaliação de doenças e produtividade

As avaliações foram divididas em duas etapas. Inicialmente, foram realizadas duas avaliações com intervalo de 30 dias, baseadas no número de plantas emergidas nas 4 linhas centrais, desconsiderando a bordadura (área útil). Ao final da safra, a produtividade foi contabilizada nas duas linhas centrais de cada parcela, transformando os dados para kg ha⁻¹.

2.4.5. Análise química e biológica do solo

As amostras de solo foram coletadas conforme descrito por Ghini, Freitas e Oliveira (2006) para análise química e biológica. Uma amostra composta (7 repetições/subamostras) foi coletada entre 0 a 10 cm do solo, no momento anterior à aplicação. A análise química foi realizada pelo Laboratório de Análises de Solo da Universidade Estadual do Norte do Paraná. Com o intuito de determinar a comunidade fúngica fitopatogênica presente no solo, foram realizados três métodos de detecção: filtragem e lavagem de solo, método de iscas, conforme descrito por Pfenning e Abreu (2006), e isolamento indireto através de plântulas sintomáticas.

Para o método de filtragem e lavagem de solo, 10 gramas de cada subamostra do solo foram transferidos para Erlenmeyers contendo 100 mL de água destilada, os quais foram submetidos à agitação por 5 minutos a 180 rpm; após a decantação do solo, o sobrenadante foi descartado e o processo repetido por mais duas vezes. Posteriormente, as subamostras foram transferidas para um conjunto de peneiras com os diâmetros de abertura de 0,7 mm, 0,5 mm e 0,2 mm, filtradas e lavadas com um jato de água destilada por um minuto. A amostra contida na peneira de menor abertura foi coletada e depositada em papel filtro estéril dentro do fluxo laminar para secagem. Cinco partículas do solo foram transferidas para placa de Petri, sendo 5 placas para cada subamostra, contendo o meio de cultura semisseletivo de KHMP para fungos habitantes do solo (1g KH_2PO_4 ; 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g KCl ; 0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,20g NaNO_2 ; 0,05g cloranfenicol, 20g ágar; 940 mL água destilada) adaptado de Bueno, Ambrósio e Souza (2007). As placas foram incubadas em câmara BOD a 25 ± 2 °C, por um período de sete dias sob fotoperíodo de 12 horas luz.

O método de iscas consistiu em semear 2 sementes de soja e beterraba (desinfestadas superficialmente, um minuto em álcool 70%, três minutos em hipoclorito de sódio 1% e duas lavagens com água destilada estéril) no solo amostrado, em 4 repetições de cada subamostra. Após dois dias em contato com o solo, as sementes foram retiradas e depositadas em meio de cultura semisseletivo de KHMP, acondicionadas em câmara BOD a 25 ± 2 °C por um período de sete dias.

Por fim, as subamostras do solo também foram utilizadas como substrato para semear 2 sementes de feijão desinfestadas (um minuto em álcool 70%, três minutos em hipoclorito de sódio 1% e duas lavagens com água destilada estéril), colocadas em casa de vegetação com temperatura a 25 ± 2 °C. Após a emergência das plântulas, foram selecionadas aquelas com tecidos necróticos e esses foram desinfestados e depositados em meio de cultura semisseletivo de KHMP, acondicionadas em câmara BOD a 25 ± 2 °C, por um período de sete dias.

A identificação dos gêneros de fungos isolados das subamostras de solo foi realizada conforme visualização de estruturas características com o auxílio de um microscópio de dissecação e microscópio óptico.

2.5. Análises Estatísticas

Biocontrole de tombamento de plântulas de feijão e soja por *Rhizoctonia solani*

Para avaliação do efeito dos tratamentos sobre a emergência das plântulas, os dados foram analisados utilizando um modelo linear generalizado em regressão logística da família binomial. Esse tipo de modelo foi escolhido devido à natureza da variável resposta (emergência de plântulas) ser binomial: emergência ou não emergência da plântula e, posteriormente, emergência de plântulas sintomáticas ou não sintomáticas. Os tratamentos e tipo de aplicação foram utilizados como variáveis independentes em estrutura de interação. O modelo foi ajustado utilizando a função *glm()* do software R (R core team 2019). Comparações post-hoc foram realizadas através do teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade ($P < 0.05$). As funções '*emmeans()*' e '*cld()*' dos pacotes *emmeans* (Russell, 2019) e *multcomp* (Hothorn, 2008) foram utilizadas, respectivamente.

Bioensaio em campo comercial

Os dados do bioensaio foram submetidos ao teste de Bartlett para verificar a homocedasticidade das variâncias, de modo que as premissas da ANOVA fossem atendidas. Após serem atendidas as premissas, os dados foram ajustados ao modelo linear e para isso, utilizou-se a função '*lm*' do pacote do R *lme4* (Bates et al., 2015). Para comparação entre os tratamentos, os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0.05$), utilizando-se a função '*emmeans*' e '*cld*' dos pacotes do R *emmeans* e *multcomp*.

3. Resultados

3.1. Biocontrole de tombamento de plântulas por *Rhizoctonia solani* em casa de vegetação

3.1.1 Comparação entre os métodos de aplicação com *Clonostachys* spp.

A patogenicidade do isolado de *R. solani* foi confirmada no teste de patogenicidade. O tratamento controle (sem inóculo do patógeno) teve emergência de 90% das plântulas, enquanto o tratamento com o inóculo do patógeno teve emergência de 15%.

No bioensaio preliminar, composto por três métodos de aplicação do isolado UCBV 07, o tratamento de sementes com goma xantana e a aplicação no solo aumentaram a porcentagem de emergência das plântulas de feijão quando comparados ao solo infestado por *R. solani* e aos demais tratamentos (dados não mostrados). Portanto, os dois métodos foram utilizados com os isolados de todas as espécies de *Clonostachys* listados na Tabela 1 nos ensaios de biocontrole de *R. solani*, nas culturas do feijão e da soja em casa de vegetação.

Na comparação entre os dois métodos de aplicação de *Clonostachys*, a porcentagem de emergência das plântulas foi superior nos tratamentos aplicados no solo quando comparados ao tratamento de sementes (Tabelas 3 e 4). No feijão, três tratamentos aplicados no solo tiveram resultados significativamente superiores ao tratamento de sementes, e apenas um tratamento teve resultado contrário. Ainda, três tratamentos não diferiram estatisticamente entre os métodos, resultando em porcentagem de emergência superiores a 30%, em contraste com 7,5% de plântulas emergidas no solo infestado de *R. solani*. Na soja, sete tratamentos aplicados no solo tiveram resultados significativamente superiores ao tratamento de sementes e em nenhum dos isolados o tratamento de sementes foi superior à aplicação no solo.

Em virtude dos resultados obtidos na comparação dos métodos de aplicação, os dados mostrados posteriormente são apenas os obtidos pelo método de aplicação no solo. Os dados brutos correspondentes ao tratamento de sementes podem ser conferidos nas Figuras Suplementares 2 e 3.

Tabela 3. Comparação da emergência das plântulas de feijão com aplicação de *Clonostachys* spp. no solo e no tratamento de sementes para o biocontrole de *Rhizoctonia solani*.

Tratamento ¹	% Emergência ^a				
	AS	E.P ²	TS	E.P	P ^b
Testemunha	57,5	0,0782	57,5	0,0782	-
<i>Rhizoctonia</i>	7,5	0,0416	7,5	0,0416	-
Pick Up Moss®	22,5	0,0660	22,5	0,0660	-
UCBV 05	37,5	0,0765	32,5	0,0741	-
UCBV 07	35	0,0754	40	0,0775	-
UCBV 35	42,5	0,0782	42,5	0,0782	-
UCBV 38	57,5	0,0782	25	0,0685	*
UCBV 44	7,5	0,0416	5,0	0,0345	-
UCBV 52	17,5	0,0601	10	0,0474	-
UCBV 98	5,0	0,0345	17,5	0,0601	-
UCBV 101	0	1,47 e ⁻⁰⁵	22,5	0,0660	*
UCBV 133	35	0,0754	15	0,0565	*
UCBV 255	40	0,0775	5	0,0345	*

^aMédia dos dois bioensaios; ^bPresença de * indica diferença significativa entre os métodos de aplicação na análise estatística pelo Teste de Tukey (p<0.05); AS: Aplicação no Solo; TS: Tratamento de Sementes; ²E.P: Erro Padrão. ¹Testemunha: solo não inoculado com *Rhizoctonia solani* e não tratado com *Clonostachys* spp.; *Rhizoctonia*: solo inoculado com *R. solani* mas não tratado com *Clonostachys*; Tratamentos UCBV quando ocorria AS: uma suspensão de 2 x 10⁷ conídios.mL no volume de 12,5 mL por copo era distribuída no solo e TS: 10 mL da solução contendo goma xantana 0,2% (v/m) adicionada a uma suspensão de 2 x 10⁷ conídios.mL era utilizada para cada 100 gramas de sementes.

Tabela 4. Comparação da emergência das plântulas de soja com aplicação de *Clonostachys* spp. no solo e no tratamento de sementes para o biocontrole de *Rhizoctonia solani*.

Tratamento ¹	% Emergência ^a				
	AS	E.P ²	TS	E.P	P ^b
Testemunha	75,0	0,0685	75,0	0,0685	-
<i>Rhizoctonia</i>	7,5	0,0416	7,5	0,0416	-
Pick Up Moss®	20,5	0,0632	20,5	0,0632	-
UCBV 05	5,0	0,0345	5,0	0,0345	-
UCBV 07	37,5	0,0765	22,5	0,0660	-
UCBV 35	27,5	0,0706	20,0	0,0632	-
UCBV 38	22,5	0,0660	7,5	0,0632	*
UCBV 44	25,0	0,0685	0	1,47 e ⁻⁰⁵	*
UCBV 52	37,5	0,0765	2,5	0,0247	*
UCBV 98	60	0,0775	0	1,47 e ⁻⁰⁵	*
UCBV 101	60	0,0775	0	1,47 e ⁻⁰⁵	*
UCBV 133	27,5	0,0706	2,5	0,0247	*
UCBV 255	47,5	0,0790	10,3	0,0486	*

^aMédia dos dois bioensaios; ^bPresença de * indica diferença significativa entre os métodos de aplicação na análise estatística pelo Teste de Tukey (p<0.05); AS: Aplicação no Solo; TS: Tratamento de Sementes; ²E.P: Erro Padrão. ¹Testemunha: solo não inoculado com *Rhizoctonia solani* e não tratado com *Clonostachys* spp.; *Rhizoctonia*: solo inoculado com *R. solani* mas não tratado com *Clonostachys*; Tratamentos UCBV quando ocorria AS: uma suspensão de 2×10^7 conídios.mL no volume de 12,5 mL por copo era distribuída no solo e TS: 10 mL da solução contendo goma xantana 0,2% (v/m) adicionada a uma suspensão de 2×10^7 conídios.mL era utilizada para cada 100 gramas de sementes.

3.1.2. Efeito de *Clonostachys* spp. aplicado no solo no biocontrole de *R. solani*

A emergência de plântulas de feijão no solo infestado com *R. solani* é apresentada na Figura 1 (os valores são descritos na Tabela Suplementar 1). Na primeira repetição do ensaio, sete dentre os 10 tratamentos contendo as diferentes espécies de *Clonostachys* tiveram valores intermediários entre os tratamentos: *Rhizoctonia* (solo infestado de *R. solani*) e Testemunha

(não inoculado com *R. solani*), e apresentaram variação na porcentagem de emergência entre 15 (UCBV 35 e 52) e 60% (UCBV 38). Apenas três tratamentos não diferiram estatisticamente do tratamento *Rhizoctonia* (5% de emergência), sendo eles: UCBV 44, UCBV 98 e UCBV 101. Na segunda repetição, a maioria dos tratamentos mantêm-se nos mesmos grupos, exceto o produto comercial (Pick Up Moss®), que foi estatisticamente igual ao tratamento *Rhizoctonia* (10% de emergência), e o tratamento UCBV 35 (70% de emergência), que foi superior a Testemunha, este com apenas 45% de emergência. Os demais tratamentos se agruparam entre *Rhizoctonia* e UCBV 35. A variação na porcentagem de emergência na segunda repetição foi de 20 e 70%.

Ainda, a Figura 1 mostra a probabilidade de plântulas com sintomas característicos do ataque de *R. solani*, em relação ao total de plântulas emergentes. Exemplificando, no tratamento com o isolado UCBV 38, no primeiro ensaio: de 100 sementes de feijão semeadas no solo infestado por *R. solani*, 60 plântulas irão emergir, destas, 30 apresentam sintomas (azul claro na figura 1) pós-emergência, como má-formação da plântula e lesões marrom-avermelhadas no colo.

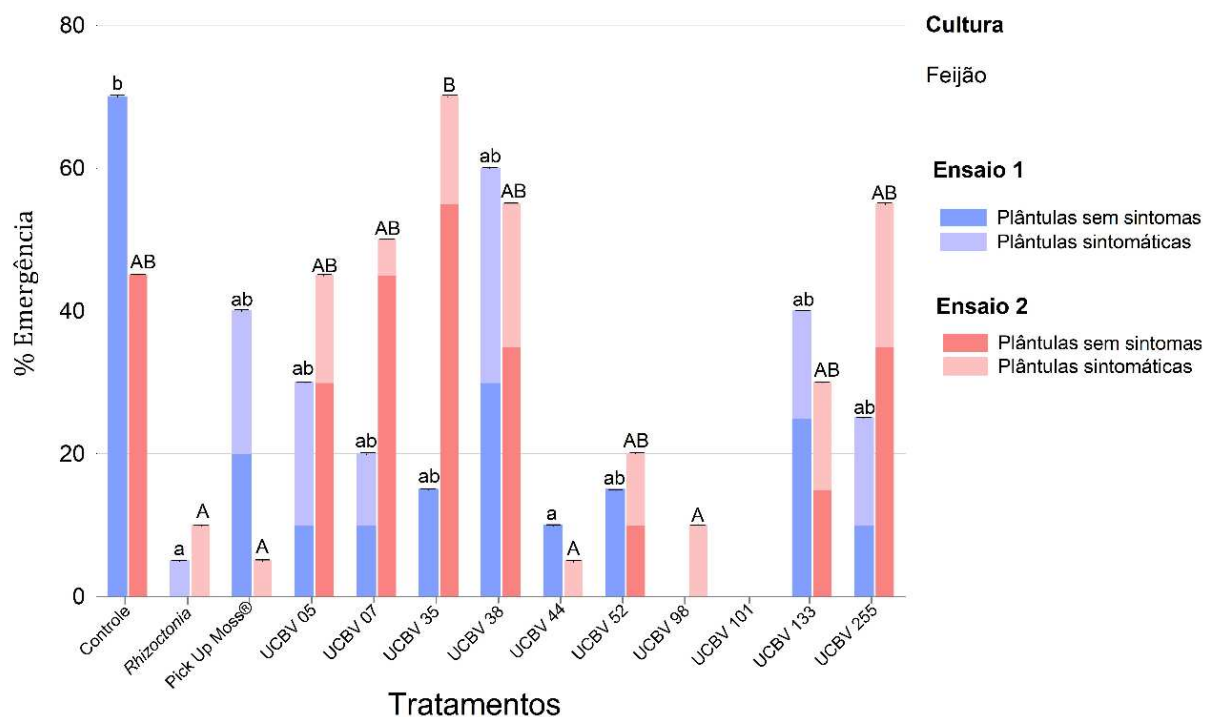


Figura 1. Emergência de plântulas de feijão e probabilidade de emergência de plântulas com sintomas ocasionados por *Rhizoctonia solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo. Tratamentos acompanhados de letras minúsculas iguais, coluna azul, não diferem

estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$), e tratamentos acompanhados de letras maiúsculas iguais, coluna vermelha, não diferem estatisticamente entre si pelo mesmo teste.

Nos ensaios conduzidos com plântulas de soja, também foram observadas variações no efeito dos tratamentos entre as duas repetições, com resultados melhores de biocontrole na segunda repetição (Figura 2, Tabela Suplementar 2). Na primeira repetição, quatro tratamentos tiveram valores intermediários entre os tratamentos: *Rhizoctonia* (0% de emergência) e Testemunha (75% de emergência), com valores de emergência entre 25 e 45%. Na segunda repetição, um tratamento não teve diferença estatística de *Rhizoctonia* (15% de emergência); oito tratamentos ficaram entre *Rhizoctonia* e o tratamento UCBV 255 (80% de emergência), correspondendo aos valores de emergência entre 20 e 60%; dois tratamentos, incluindo a Testemunha (75% de emergência), foram agrupados com o tratamento UCBV 255 (80% de emergência).

A frequência de emergência de plântulas sintomáticas na soja foi menor do que o observado para o feijão. Os melhores tratamentos para a soja, com valores superiores a 50% de emergência, resultaram em valores entre 0 e 25% da probabilidade de emergência de plântulas sintomáticas; no feijão, essa variação ficou entre 10 e 50 % de probabilidade.

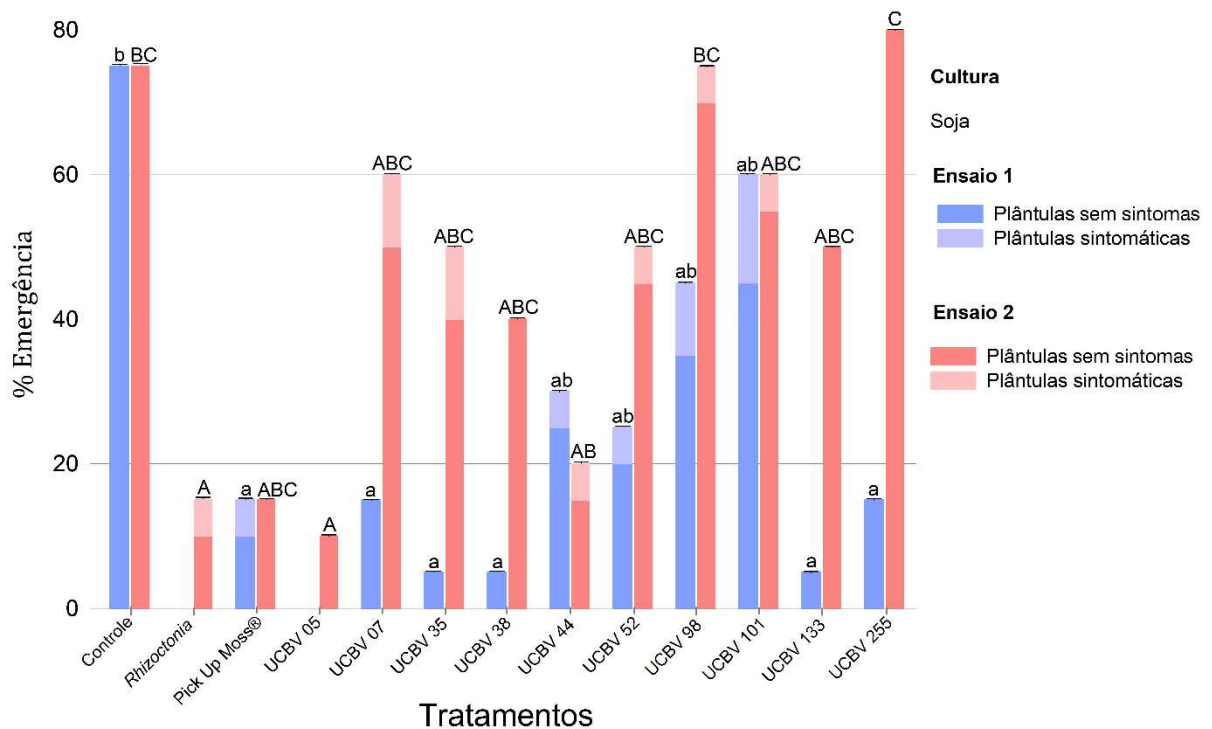


Figura 2. Emergência de plântulas de feijão e probabilidade de emergência de plântulas com sintomas ocasionados por *Rhizoctonia solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo. Tratamentos acompanhados de letras minúsculas iguais, coluna azul, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$), e tratamentos acompanhados de letras maiúsculas iguais, coluna vermelha, não diferem estatisticamente entre si pelo mesmo teste.

Em decorrência da variação na porcentagem de emergência das plântulas submetidas aos mesmos tratamentos entre as duas repetições do bioensaio, os isolados de *Clonostachys* podem ser agrupados em: **i)** isolados que foram efetivos no biocontrole nas duas repetições do bioensaio; **ii)** isolados que foram efetivos no biocontrole apenas em uma das repetições do bioensaio; **iii)** e isolados que não foram efetivos (Tabela 5).

Tabela 5. Classificação dos isolados de *Clonostachys* spp. conforme a atividade de biocontrole nos ensaios em casas de vegetação com as culturas do feijão e da soja.

Agrupamento*	Culturas	
	Feijão	Soja
i	UCBV 05, 38 e 133	UCBV 98 e 101
ii	UCBV 07, 35, 255 e Pick Up Moss®	UCBV 07, 35, 38, 44, 52, 133 e 255
iii	UCBV 44, 52, 98 e 101	UCBV 05 e Pick Up Moss®

*i: isolados que foram efetivos no biocontrole nas duas repetições do bioensaio; ii: isolados que foram efetivos no biocontrole apenas em uma das repetições do bioensaio; iii: isolados que não foram efetivos.

Com base em todos os resultados expostos até aqui, é possível visualizar os efeitos dos isolados de *Clonostachys* entre as culturas do feijão e da soja em cada repetição do bioensaio. Assim, tem-se que os isolados UCBV 07, UCBV 35, UCBV 38, UCBV 133 e UCBV 255 de *Clonostachys* demonstraram efeito de biocontrole de *R. solani* em pelo menos uma das repetições dos bioensaios tanto no feijão como na soja. No entanto, alguns isolados promoveram aumento da emergência das plântulas em apenas uma cultura, mas na outra, esse resultado foi estatisticamente igual ao tratamento *Rhizoctonia*. Assim temos, o isolado UCBV 05, com efeito no biocontrole de *R. solani* na cultura do feijão, mas sem efeito na cultura da soja, e os isolados UCBV 98 e UCBV 101, com efeitos no biocontrole de *R. solani* na cultura da soja mas sem efeito na cultura do feijão.

3.1.3. Frequência de *Clonostachys* spp. nas raízes

A frequência de *Clonostachys* spp. observada no rizoplano de plantas de feijão e soja na primeira repetição do bioensaio dos tratamentos aplicados no solo, variou entre 10 e 75% no feijão e 0 e 95% na soja. Considerando o valor arbitrário de frequência igual ou maior que 40% nas raízes não desinfestadas, tem-se que de dez isolados de *Clonostachys*, cinco foram bons colonizadores na rizosfera do feijão e quatro na soja, sendo mais rizocompetentes que os demais (Figura 3 e 4). Os isolados UCBV 07, UCBV 38 e UCBV 255 estão entre os mais rizocompetentes em ambas as culturas, apesar do UCBV 07 ser estatisticamente superior na soja. Já o isolado UCBV 05 está entre os isolados mais rizocompetentes no feijão e, na soja, é o isolado menos rizocompetente.

Na avaliação realizada após desinfestação superficial nas raízes, na segunda repetição do bioensaio, os valores de incidência não passaram de 35%. Nas raízes de feijão, cinco isolados não foram detectados e na soja, apenas um. No feijão, UCBV 38 foi o isolado detectado com maior incidência (35%), enquanto na soja, este foi o único isolado não detectado. O mesmo ocorreu aos isolados UCBV 35 e UCBV 101, com maior incidência nas raízes de soja, mas com baixa incidência ou não detectados no feijão.

Devido às variações de efeito dos tratamentos entre a primeira e segunda repetição dos ensaios de biocontrole do item anterior, uma correlação desses resultados com a rizocompetência se torna difícil, ainda mais considerando que os métodos de tratamento das amostras de raiz foram diferentes nas duas execuções. Mas é notório que o isolado UCBV 05, além de ser o menos rizocompetente na soja, também não teve efeito no biocontrole nessa cultura, e os isolados UCBV 44, 52, 98 e 101, que foram os menos rizocompetentes no feijão, tiveram pouco ou nenhum efeito no biocontrole nessa cultura.

Durante a segunda repetição do ensaio, foi possível observar o micoparasitismo nas hifas e nos escleródios de *R. solani* pelos isolados UCBV 07 (*C. chloroleuca*) e UCBV 38 (*C. rhizophaga*) nas raízes de soja (Figura Suplementar 4).

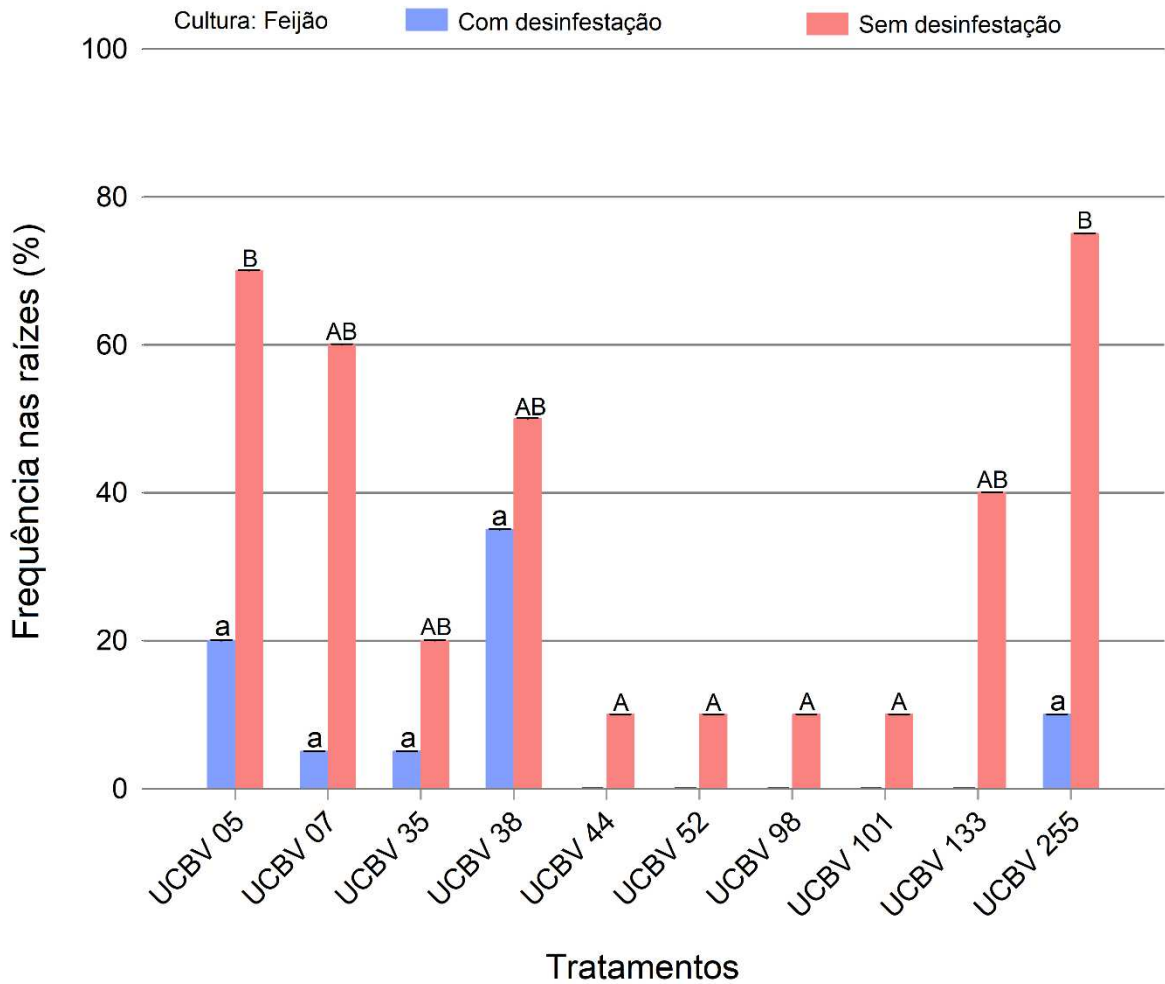


Figura 3. Frequência de *Clonostachys* spp. em raízes de feijão processadas sem ou com desinfestação superficial, ao final da primeira e segunda execução do ensaio de biocontrole, respectivamente. Tratamentos acompanhados de letras minúsculas iguais, coluna azul, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$), e tratamentos acompanhados de letras maiúsculas iguais, coluna vermelha, não diferem estatisticamente entre si pelo mesmo teste.

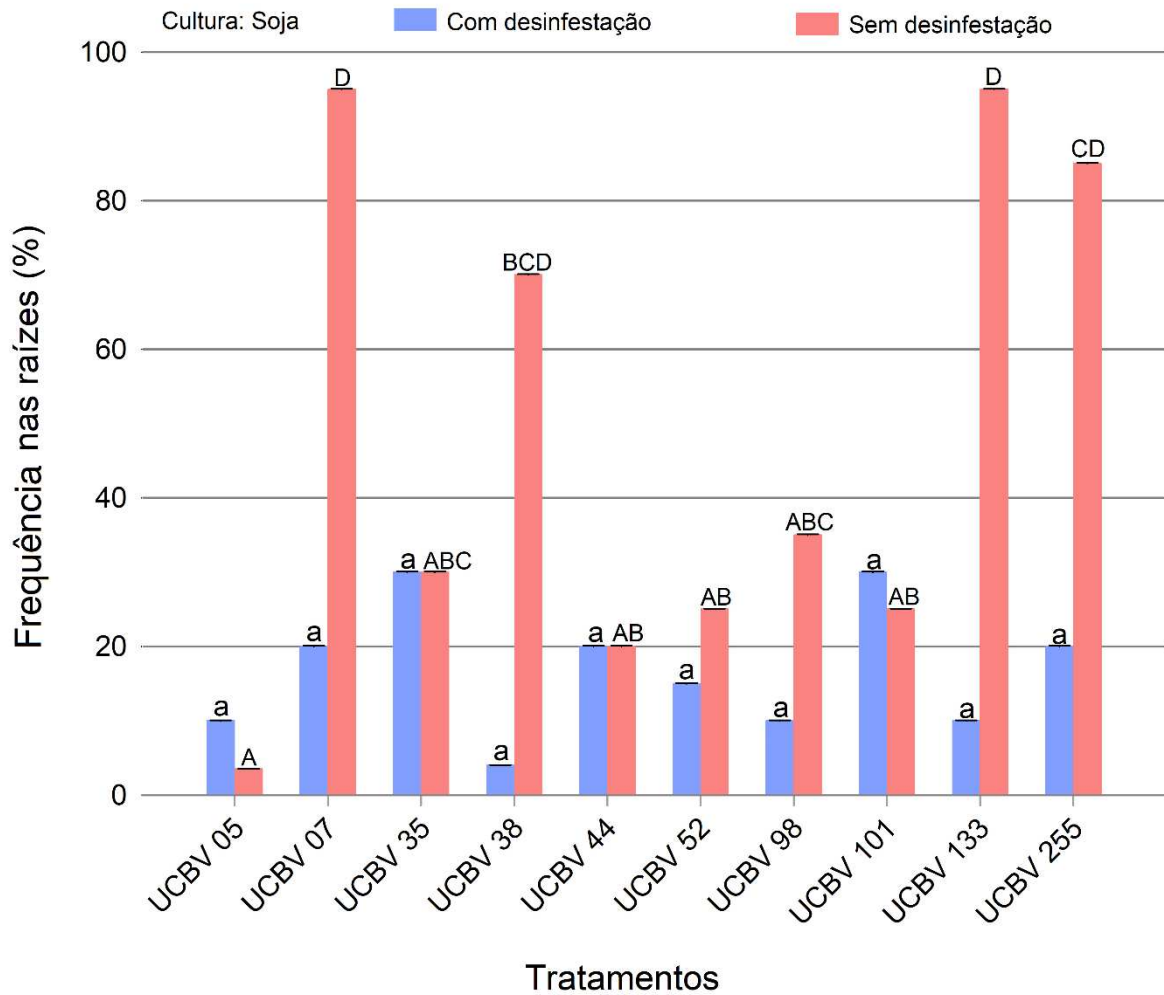


Figura 4. Frequência de *Clonostachys* spp. em raízes de soja processadas sem ou com desinfestação superficial, ao final da primeira e segunda execução do ensaio de biocontrole, respectivamente. Tratamentos acompanhados de letras minúsculas iguais, coluna azul, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$), e tratamentos acompanhados de letras maiúsculas iguais, coluna vermelha, não diferem estatisticamente entre si pelo mesmo teste.

3.2. Bioensaio em campo comercial

3.2.1. Avaliação de doenças e produtividade

O bioensaio na área comercial do município de Cambará/PR foi iniciado no dia 15 de novembro. Devido às condições climáticas atípicas do estado nessa época, como baixa incidência de chuva e altas temperaturas na região (Figura Suplementar 5 e 6), a semeadura, que era prevista para o início do mês de setembro, foi atrasada em aproximadamente 45 dias. Após a emergência, foram observadas poucas plântulas tombadas e com anelamento no colo (uma a três plântulas por parcela), de forma esporádica nos tratamentos, ao contrário do que é relatado para área nas safras anteriores. Acredita-se que a menor incidência de tombamentos seja devida às condições climáticas já relatadas.

Diante deste cenário, as avaliações de incidência de tombamento ocasionado por fitopatógenos habitantes do solo não foram realizadas. A emergência das plântulas foi contabilizada em cada linha da área útil. Se a emergência das plântulas fosse igual a 100%, seriam contabilizadas 48 plantas/linha, pois foram semeadas 12 sementes/metro e cada linha tinha 4 metros (desconsiderando 0,50 m de ambos os lados da linha). Os tratamentos, ao final da segunda avaliação, tinham entre 31 e 34 plantas/linha, correspondendo a 65 - 71% de emergência, não havendo diferenças estatísticas significativas entre estes (Tabela Suplementar 1). A maioria dos tratamentos teve pelo menos uma parcela com mais de 40 plantas por linha (Figura 5).

Em relação à produtividade, a produção estimada das parcelas dos tratamentos variou, mas sem diferenças estatísticas significativas entre as médias (Figura 6). Nos tratamentos aplicados com Pick Up Moss® (T2, T6 e T7), a produção foi maior que 5.000 kg ha⁻¹ em algumas parcelas. O tratamento apenas com Pick Up Moss® resultou na maior média de produção por hectare (4.341 kg ha⁻¹), que corresponde a um valor estimado de 73 sacas ha⁻¹, enquanto na testemunha, o valor médio foi de 68 sacas ha⁻¹ (4.026kg ha⁻¹) (Tabela suplementar 1).

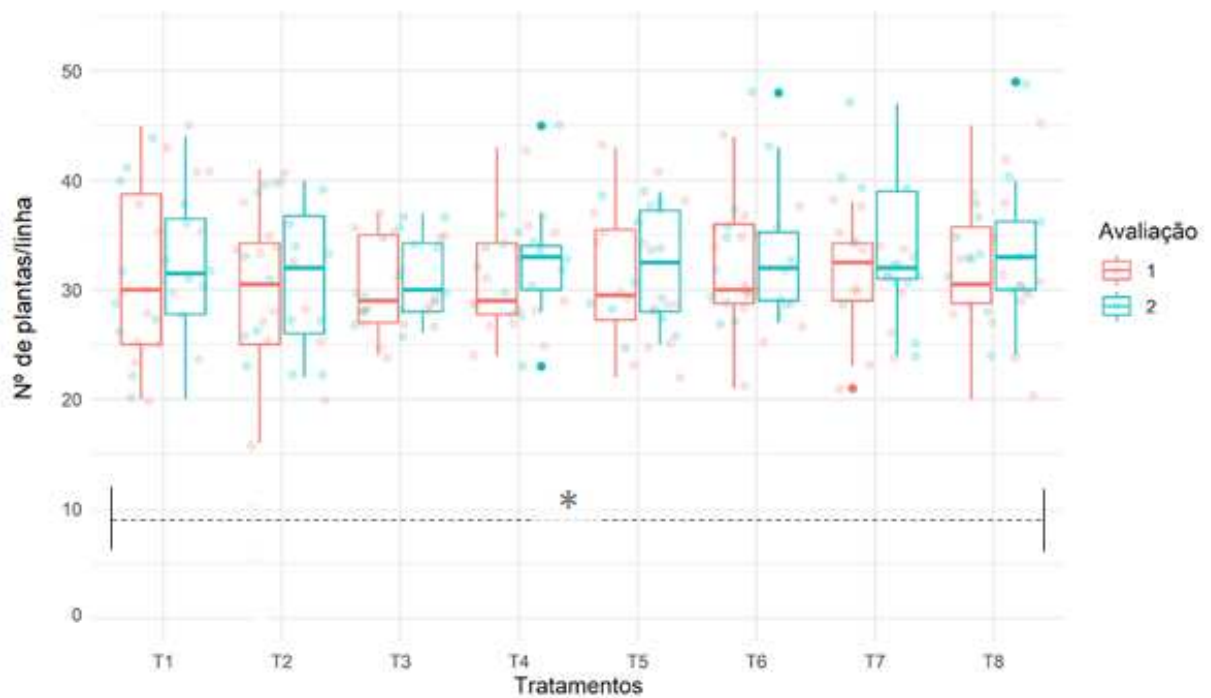


Figura 5. Boxplots da emergência de plântulas de soja na área comercial em Cambará-PR após duas avaliações realizadas com intervalo de 30 dias, com a aplicação de *Clonostachys* spp. e Moss®. * Os resultados não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

Tratamentos: T1 – Testemunha; T2 – Pick Up Moss ®; T3 – *Clonostachys rhizophaga* (UCBV 06 + 38); T4 – *C. chloroleuca* (UCBV 07 + 17); T5 – *C. rosea* (UCBV 10 + 133); T6 – *C. rhizophaga* (UCBV 06 + 38) + Pick Up Moss ®; T7 – *C. chloroleuca* (UCBV 07 + 17) + Pick Up Moss ® e T8: *C. rosea* (UCBV 10 + 133) + Pick Up Moss ®.

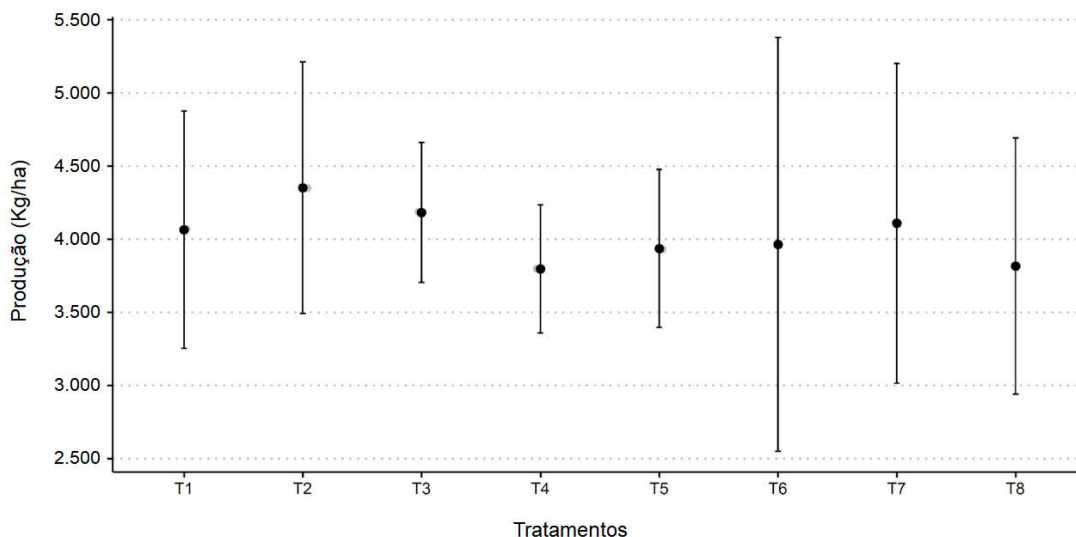


Figura 6. Médias (pontos sólidos) e intervalos de confiança de 95% (linhas verticais) da produção estimada da safra 2020/2021, na área comercial de soja, Cambará-PR, em parcelas tratadas com *Clonostachys* spp. e Pick Up Moss®.

Tratamentos: T1 – Testemunha; T2 – Pick Up Moss®; T3 – *Clonostachys rhizophaga* (UCBV 06 + 38); T4 – *C. chloroleuca* (UCBV 07 + 17); T5 – *C. rosea* (UCBV 10 + 133); T6 – *C. rhizophaga* (UCBV 06 + 38) + Pick Up Moss®; T7 – *C. chloroleuca* (UCBV 07 + 17) + Pick Up Moss® e T8: *C. rosea* (UCBV 10 + 133) + Pick Up Moss®.

3.2.2. Análise do solo

A análise química determinou que a matéria orgânica presente no solo estava em baixo nível para um solo classificado como muito argiloso (Tabela Suplementar 2). Quanto às demais variáveis analisadas, com exceção do alumínio, os níveis estavam altos/não prejudiciais, conforme a recomendação descrita na análise.

O levantamento dos fungos presentes nas subamostras de solo permitiu a identificação de 13 gêneros, como descrito na Tabela 10. Os fungos com maior frequência foram dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma*. Os fungos *Clonostachys*, *Epicoccum* e *Mucor* têm menor frequência, mas foram detectados nos três métodos utilizados. Os fungos detectados podem ser classificados em: potenciais fitopatógenos (*Alternaria*, *Fusarium*, *Lasioidiplodia*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*), saprófitos (*Absidia*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Nigrospora*) e ainda, possíveis micoparasitas (*Trichoderma*, *Clonostachys*) (Tabela 10). Alguns dos possíveis micoparasitas foram isolados e adicionados à coleção micológica da Unidade de

Controle Biológico. Ao total, foram obtidos dois isolados de *Trichoderma* e cinco de *Clonostachys*; dois isolados de *Clonostachys* foram identificados como *C. chloroleuca* (identidades confirmadas pelo sequenciamento de *acl1*, conforme descrito no item 2.1.1, seguido da comparação com sequências de referência, usadas por Moreira et al., 2016). Um isolado de cada um desses dois gêneros foi utilizado nos ensaios de biocontrole em casa de vegetação; o efeito do isolado de *C. chloroleuca* (identificado UCBV 255) foi visto no item 3.1, já o tratamento com o isolado de *Trichoderma* resultou em baixa emergência de plântulas de feijão e soja em solo infestado com *Rhizoctonia solani* (dados não mostrados).

A diversidade de gêneros de fitonematoides também foi avaliada, de forma qualitativa, e foram encontrados os seguintes gêneros: *Aphelenchoides*, *Aphelenchus*, *Scutellonema*, *Helicotylenchus*, *Meloidogyne*, *Rotylenchulus* e *Tylenchus*.

Tabela 6. Frequência de fungos nas subamostras de solo da propriedade comercial de soja, Cambará-PR.

Gênero	Métodos de Detecção		
	Lavagem do solo	Isca	Isolamento indireto
<i>Absidia</i>	+++ ⁴	-	-
<i>Alternaria</i>	- ¹	+	-
<i>Aspergillus</i>	+ ²	-	-
<i>Clonostachys</i>	+	+	+
<i>Epicoccum</i>	+	++	++
<i>Fusarium</i>	++ ³	+++	+++
<i>Lasiodiplodia</i>	+	-	-
<i>Macrophomina</i>	+	-	+
<i>Mucor</i>	+	+	++
<i>Nigrospora</i>	+	-	-
<i>Rhizoctonia</i>	+	+	-
<i>Scopulariopsis</i>	+	-	-
<i>Trichoderma</i>	+++	+	+++

¹- ausência do gênero na amostra; ²+ presença do gênero entre 1-25% das repetições; ³++ presença do gênero entre 26-50%; ⁴+++ presença do gênero >50%.

3.2.3. Viabilidade dos conídios

A avaliação da viabilidade de conídios dos isolados de *Clonostachys* selecionados para o bioensaio na área comercial de soja, feita mensalmente durante seis meses, mostrou que as duplas de isolados da mesma espécie de *Clonostachys* tiveram um comportamento semelhante. Não houve perda total da viabilidade dos conídios durante o período avaliado, mas reduções drásticas nas contagens entre o segundo e o terceiro mês de avaliação. Os valores finais de germinação de cinco dos seis isolados testados ficaram abaixo de 30%.

Na Figura 7, observa-se que a viabilidade dos conídios dos isolados UCBV 06 e 38 (*C. rhizophaga*) decresceu de forma gradual ao longo dos meses de avaliação; ao final da avaliação, os conídios do isolado UCBV 06 tinham 20% de viabilidade e os do isolado UCBV 38, 43% de viabilidade. A viabilidade dos conídios dos isolados UCBV 07 e 17 (*C. chloroleuca*) teve uma redução gradual até o terceiro mês, posteriormente, os valores se mantiveram próximos a 30% e 16% de viabilidade, respectivamente. Enquanto os conídios dos isolados UCBV 10 e 133 (*C. rosea*) tiveram uma drástica redução na sua viabilidade já no segundo mês de avaliação e a partir de então se estabilizaram em valores de viabilidade de 19 a 17 %, respectivamente.

Estatisticamente, ao longo dos seis meses, houve perda significativa de viabilidade dos isolados UCBV 133 e 38 em relação aos demais isolados. Avaliando-se o comportamento de viabilidade dentro dos meses, apenas o isolado UCBV 38 apresentou diferença significativa, mantendo-se viável por mais tempo.

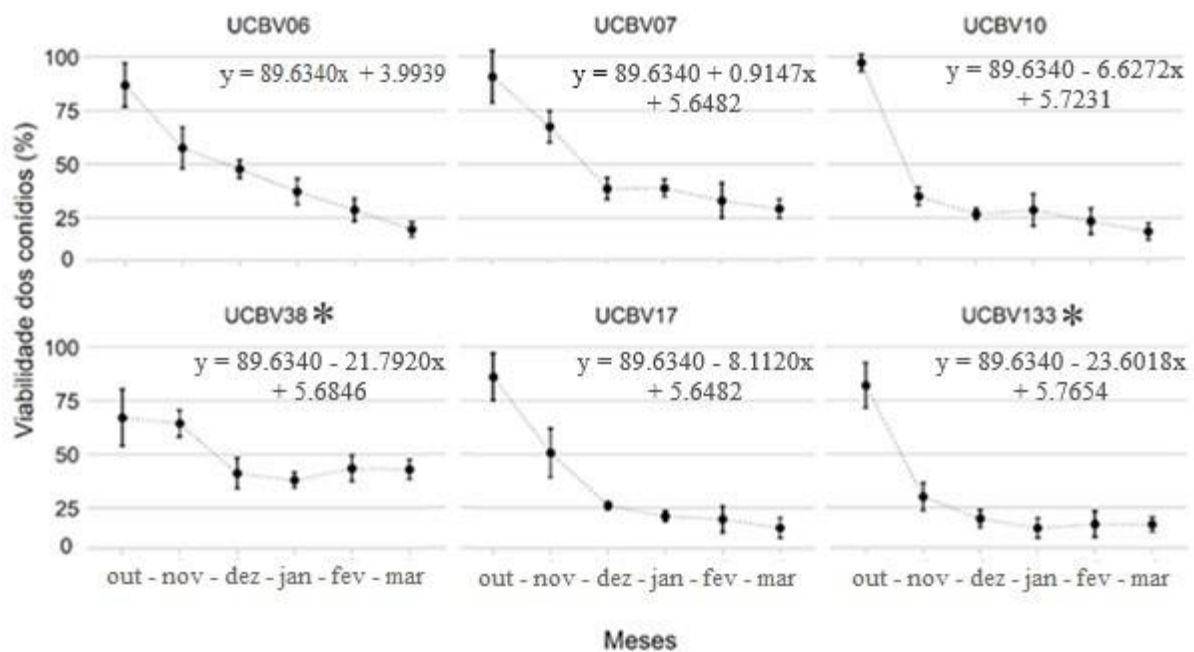


Figura 7. Viabilidade de conídios dos isolados de *Clonostachys* spp. determinada no período de seis meses, iniciando no mês de outubro/2020 até março/2021, armazenados em câmara fria a 4°C. * Diferem estatisticamente dos demais pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

4. Discussão

Biocontrole de tombamento em pré-emergência por *Clonostachys* spp.

Neste trabalho, verificamos que o uso de isolados de diferentes espécies de *Clonostachys* como agentes de biocontrole, na maioria das vezes, resultou no aumento da emergência de plântulas de feijão e soja, semeadas em solo infestado com *R. solani*, com valores de até 80% de emergência, enquanto no solo infestado apenas com o fitopatógeno *R. solani*, o valor máximo de emergência foi de 15%. A aplicação realizada diretamente no solo resultou em maiores índices de emergência de plântulas, quando comparada com o tratamento de sementes, principalmente na cultura da soja nas duas execuções do bioensaio (Figura Suplementar 3). No feijão, apesar das diferenças entre os métodos de aplicação não serem tão evidentes (Figura Suplementar 2), a média das execuções mostra que a aplicação no solo, na maioria dos tratamentos, foi melhor que o tratamento de sementes. Uma explicação para esses resultados seria que, no tratamento de sementes ocorra uma maior variação da quantidade e

distribuição de biomassa fúngica na superfície das sementes, enquanto na aplicação no solo, a maior quantidade de conídios distribuídos como suspensão tenha efeito mais homogêneo no biocontrole. Ainda, há de se considerar que a integração dos dois métodos de aplicação pode ser mais eficaz na supressão da doença e seria uma opção para ensaios futuros. Para o controle de damping-off, causado por um complexo de fitopatógenos habitantes do solo incluindo *Rhizoctonia solani*, em *Panax quinquefolius*, foi avaliada a aplicação de Prestop Mix G (produto composto por *Clonostachys rosea* f. *catenulata*) via drench e via tratamento de sementes, seguida de três aplicações via drench durante e após emergência das plântulas; comparada à testemunha (em torno de 12% de emergência), a combinação dos métodos de aplicação de Prestop Mix G resultou em 37% de emergência, enquanto que, com a aplicação via drench somente esse valor foi de 23% (Rahman; Punja, 2007).

O bioensaio em casa de vegetação constou com duas execuções e o efeito de biocontrole dos tratamentos com isolados das diferentes espécies de *Clonostachys* variou entre estas, principalmente na soja, onde os valores de emergência aumentaram consideravelmente na maioria dos tratamentos na segunda repetição. O mesmo não ocorreu com as testemunhas não inoculadas e com as plantas de soja apenas inoculadas com o fitopatógeno, que mantiveram porcentagens similares de emergência nas duas execuções. Nos ensaios com feijão, a porcentagem de emergência das plântulas na segunda repetição foi inferior à da primeira nas plantas não inoculadas e no tratamento com o produto comercial. A origem do solo utilizado na primeira repetição diferiu da origem da segunda, o que pode ter influenciado na emergência da testemunha não inoculada do feijão, além de que as sementes utilizadas eram para consumo, o que não garante boas taxas de germinação. Outros fatores que possam ter influenciado os resultados são: a distribuição da biomassa de *Clonostachys* spp. no solo, distribuição do inóculo do fitopatógeno no grão de arroz, a distribuição do volume de água utilizado na irrigação, e outros fatores não compreendidos. Assim, devido aos contrastes de resultados entre uma execução e a outra, tornam-se necessárias mais execuções do ensaio.

Mesmo diante das variações de efeito dos tratamentos no tombamento em pré-emergência entre as execuções do ensaio, podemos identificar sete tratamentos em soja e cinco em feijão que resultaram em valores de emergência iguais ou superiores a 45% na segunda execução do ensaio. O produto comercial adicionado aos ensaios teve resultado satisfatório em apenas uma execução e com o feijão. Foi realizado um teste para avaliar a viabilidade dos conídios do isolado de *Trichoderma harzianum* componente do produto comercial, ao final dos experimentos, e esta estava dentro dos valores recomendados para tais produtos (dados não

mostrados). Este produto é registrado para o controle de diversos fitopatógenos habitantes do solo em várias culturas, como para *Rhizoctonia solani* em feijão, mas não em soja, o que dá suporte aos resultados aqui obtidos, embora o baixo percentual de emergência das plântulas na segunda execução do feijão permaneça incompreendido.

Por outro lado, alguns tratamentos foram consistentes entre as repetições e tiveram efeitos distintos quando aplicados em feijão e soja, como o isolado UCBV 05, que resultou em até 45% da emergência das plântulas no feijão e, no máximo, 10% na soja, e os isolados UCBV 98 e 101, que resultaram em média 60% da emergência das plântulas de soja e no feijão, quando houve emergência, foi apenas de 10%. A influência da cultivar da planta hospedeira no efeito do biocontrole traz questionamentos sobre a natureza deste. Como *Trichoderma* spp., as espécies de *Clonostachys* são micoparasitas inespecíficos e a ação direta sobre *R. solani* através da degradação enzimática das hifas e excreção de substâncias bioativas é tida como o principal modo de ação, baseado principalmente em resultados com o modelo *C. rosea* (Sun et al, 2020; Daguerre et al., 2014; Chatterton; Punja, 2009). Já o papel da planta não está evidente e a produção e excreção de exsudatos de composição distinta poderia atuar na indução e promoção maior ou menor do crescimento e colonização pelos diferentes isolados de *Clonostachys*, resultando em quantidades diferentes de biomassa destes fungos e, por conseguinte, de efeito direto contra o patógeno. Outra hipótese é a da indução diferenciada das respostas de defesa em diferentes genótipos de plantas hospedeiras pelos distintos agentes de biocontrole, como já relatado no patossistema *Fusarium culmorum* e trigo, com indícios de uma participação ativa da planta hospedeira no biocontrole exercido por *Clonostachys rosea* contra o fitopatógeno, reduzindo a intensidade da doença por meio da ativação do sistema de defesa da planta, o que resultou no aumento da expressão de algumas isoformas de peroxidase e quitinase, bem como proteínas PR4 (Roberti et al., 2008). A avaliação desta dependência da interação entre os genótipos da planta e os agentes de biocontrole indicará uma possível limitação da ampla adoção de um mesmo isolado para o biocontrole de tombamento por *R. solani* em feijão e soja.

Parte das plântulas de soja e feijão que emergiram nos bioensaios apresentava sintomas necróticos nos cotilédones e na base do caule. A presença dos sintomas resultou em atrasos no desenvolvimento inicial das plantas afetadas, porém, não foram observados tombamento pós-emergência e morte de plântulas durante o período da avaliação. As plântulas que emergiram sobre solo infestado com *R. solani* não se desenvolviam até a formação do segundo par de folhas verdadeiras; já nos tratamentos que receberam os diferentes isolados de *Clonostachys*, as plântulas, após um atraso, continuavam seu desenvolvimento. Assim, caso se a avaliação

continuasse até final do ciclo de cada cultura, a quantidade de plantas sobreviventes provavelmente seria ainda menor no solo infestado com *R. solani*.

Na literatura, o tombamento ocasionado por *Rhizoctonia solani* em diversas culturas como: tomate, pepino, beterraba, pimenta, algodão, soja e feijão, tem valores de incidência entre 60 e 100%, e quando um agente de biocontrole é utilizado, na incorporação do substrato ou por tratamento de sementes, essa incidência pode diminuir consideravelmente (Asaka; Shoda, 1996; Huang et al., 2012; Sadeghi et al., 2009; Huang, et al., 2011; Lewis; Lumsden, 2001; Atwa, 2018; Ferreira et al., 2020). Em ensaios com feijão, o tratamento do solo com diferentes rizobactérias resultou em índices de tombamento entre 30% e 80%, com contraste com 92% na testemunha apenas inoculada com *R. solani*; o índice mais baixo da doença foi resultado da aplicação com *Burkholderia fungorum* e *Rhizobium tropici* (Ferreira et al., 2020). No tratamento de sementes de soja com *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens* e composto de Mycorrhizeen (que contém principalmente endósporos de *Glomus* sp.), aplicados individualmente ou em combinação para o biocontrole sobre *R. solani*, a porcentagem de plantas sobreviventes (avaliando tombamento de pré e pós-emergência) chegou a 92%, no tratamento que continha os três microrganismos, em comparação, no controle não tratado, este índice atingiu 48% (Atwa, 2018).

Neste estudo, foram testados isolados de diferentes espécies do gênero *Clonostachys*, algumas das quais ainda não avaliadas como agentes de biocontrole, até o presente estudo (por exemplo, *Clonostachys* sp. 1 e *Clonostachys* sp. 2, *C. rogersoniana* e *C. candelabrum*). Recentemente, foi mostrado o potencial de outras espécies de *Clonostachys*, além do *C. rosea*, no controle de pinta preta em batata, além da capacidade destes fungos em parasitarem o fitopatógeno em restos culturais (Silva et al., 2021). Três dos isolados de três espécies, selecionados por Silva et al. (2021), foram incluídos neste estudo (*C. chloroleuca*, *C. rhizophaga* e *C. rosea*) e resultaram em efeitos de biocontrole em feijão e soja, em pelo menos uma das execuções dos experimentos. Já o efeito de biocontrole dos isolados de *C. rogersoniana* e *C. candelabrum* em soja era desconhecido. Estas espécies são filogeneticamente mais distantes de *C. rosea* do que as outras espécies que mostraram efeito de biocontrole neste trabalho, sendo compostas por fungos de solo; *C. rogersoniana* é a espécie mais comumente isolada de diferentes locais e biomas no Brasil (Gláucia Moreira, 2021, dados não publicados).

Colonização das raízes por *Clonostachys* spp.

Uma das premissas acerca da biologia dos agentes de biocontrole que atuam no solo e raízes é a sua habilidade de colonizar porções da rizosfera e se manter em populações relativamente constantes durante boa parte do ciclo da planta, característica chamada de rizocompetência. A capacidade dos isolados de *Clonostachys* spp. investigados em colonizar raízes das plantas de feijão e soja foi inferida através da detecção destes em amostras de raízes de plântulas que emergiram nos bioensaios, em duas estratégias de processamento: lavagem seriada das raízes, para o isolamento dos habitantes do rizoplano no primeiro ensaio, e lavagem seguida desinfestação superficial, visando à detecção de isolados endófitos no segundo ensaio. Os resultados deste teste foram contrastados com aqueles de biocontrole, de forma a testar a hipótese de uma relação entre rizocompetência e potencial de biocontrole. Em raízes de feijão, dos cinco isolados com maior frequência de isolamento no rizoplano, três tiveram efeito significativo de controle, e apenas o tratamento com o isolado UCBV 38 resultou em porcentagem de emergência acima de 50%. Desses cinco isolados, quatro foram detectados com maior frequência de isolamento no rizoplano de soja, mas nenhum teve efeito positivo significativo na emergência de plântulas, considerando apenas a primeira execução na qual foi realizada esta análise.

A segunda estratégia de processamento das raízes foi realizada para determinar a capacidade dos isolados de *Clonostachys* spp. em colonizar endofiticamente as plantas. A associação endófito-planta envolve interações complexas, que podem resultar em efeitos positivos para o hospedeiro, como a modulação no seu sistema de defesa (Silva et al., 2019). No feijão, apenas um isolado foi detectado nas raízes com incidência superior a 30% e foi o mesmo isolado que teve relação positiva com rizocompetência e biocontrole (UCBV 38). Na soja dois isolados foram detectados com incidência igual a 30%, e os dois tiveram efeito positivo no biocontrole (igual ou superior a 50 % de emergência).

Os resultados de rizocompetência, a habilidade de colonização na rizosfera dos isolados, não puderam ser relacionados com os resultados de biocontrole na segunda execução do ensaio, onde se observou o aumento do biocontrole da maioria dos isolados. A troca de métodos foi para avaliar se estes isolados poderiam ser endófitos, na tentativa de levantar hipóteses de atuação dos isolados no biocontrole; assim foi possível, mesmo que com uma execução, verificar que alguns isolados podem ser rizocompetentes, mas que nem todos colonizam

endofiticamente a planta. Porém, para confirmar tais resultados são necessárias novas execuções de cada método.

Ensaio na área comercial de soja

A incidência natural de tombamentos e falhas de estande na área de estudo foi baixa e de ocorrência aleatória nas safras 2020/2021, por consequência, não foi possível a avaliação do efeito de biocontrole dos isolados aplicados. Como já evidenciado, este resultado parece ter sido ocasionado pelas drásticas condições climáticas ocorridas na região no segundo semestre, com prováveis efeitos detrimenais ao inóculo presente no campo. Embora não tenha sido evidenciada alta incidência de tombamentos, isolamentos realizados a partir de amostras do solo mostraram a ocorrência de fungos com a morfologia de *Rhizoctonia solani*, que provavelmente é o principal patógeno causador de tombamentos na área em anos mais chuvosos. Outros fungos fitopatogênicos de solo detectados geralmente infectam e causam sintomas em estádios posteriores de desenvolvimento da soja, como *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium* spp. *Trichoderma* spp. e *Clonostachys* spp. também foram comumente isolados do solo investigado, indicando que não é ausência de inimigos naturais, mas talvez a proporção destes em relação às populações patogênicas que determine a ocorrência ou não de epidemias de doenças, como tombamentos. Neste contexto, a aplicação concentrada de agentes de controle biológico no sulco de plantio, como no caso de fungos do gênero *Trichoderma*, teria o papel de aumentar artificialmente a população antagonista frente ao inóculo de *R. solani*. Os resultados dos ensaios em casa de vegetação indicam que esta estratégia também resultará em efeitos positivos quando utilizada com *Clonostachys* spp., o que deverá ser novamente testado em experimentos futuros. Além disso, o sucesso desta estratégia também dependerá de práticas que levem ao incremento dos teores de matéria orgânica no solo.

Foi observado no presente trabalho que, além da espécie *C. rosea*, outras espécies do gênero merecem destaque no biocontrole de fitopatógenos, neste caso no biocontrole de tombamento em pré-emergência por *R. solani* em plântulas de feijão e soja. Além de levantar hipóteses que fomentam a questão de mecanismo de ação específico de cada espécie, saindo do contexto apenas de biocontrole através de micoparasitismo e produção de compostos antagonistas, o presente trabalho também sugere que as espécies de *Clonostachys* interajam de forma diferenciada com o genótipo da planta hospedeira na promoção do biocontrole contra *R. solani*. Na tentativa de elucidar tais hipóteses, são necessárias repetições e modificações dos

bioensaios. A combinação de mais de um método de aplicação dos antagonistas, para evitar ocorrência de plântulas com sintomas pós-emergentes, deve ser considerada nos próximos bioensaios. Além disso, outros bioensaios para avaliar a eficácia dos isolados de *Clonostachys* contra outros fitopatógenos habitantes do solo são de interesse, bem como a análise quantitativa do efeito da cultivar da planta sobre o efeito de biocontrole, avaliado durante todo seu ciclo produtivo.

5. Conclusões

- Seis isolados de cinco espécies de *Clonostachys* tiveram efeito de biocontrole do tombamento em pré-emergência causado por *Rhizoctonia solani* na cultivar de feijão, e oito isolados de sete espécies nas cultivares de soja, resultando em valores de emergência entre 40 e 80%, em contraste com valores entre 0 e 15% em solo apenas infestado com o fitopatógeno;
- Há evidências do efeito da cultivar da planta hospedeira no mecanismo de biocontrole exercido por três isolados de *Clonostachys* spp.
- A relação entre rizocompetência e efeito de biocontrole não foi comprovada na maioria dos tratamentos.

6. Referências

- Abreu, L. M.; Moreira, G. M.; Ferreira, D.; Rodrigues-Filho, E.; Pfenning, L. H. Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry. **Fungal biology**, v. 118, n. 12, p. 1004-1012, 2014.
- Ajayi-Oyetunde, O. O.; Bradley, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, v. 67, n. 1, p. 3-17, 2018.
- Asaka, O; Shoda, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4081-4085, 1996. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.62.11.4081-4085.1996>.
- Atwa, M. Combination of biocontrol agents for controlling soybean damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v. 46, n. 2, p. 15-38, 2018.
- Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.; Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal Of Statistical Software**, v. 67, n. 1, 2015. Foundation for Open Access Statistic. <http://dx.doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Bettiol, W.; Morandi, M. A. B.; Pinto, Z. V.; Paula Júnior, T. J.; Corrêa, E. B.; Moura, A. B.; Lucon, C. M. M.; Costa, J. C. B.; Bezerra, J. L. **Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 155, 2012.
- Bianchini, A.; Maringoni, A. C.; Carneiro, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Ceres, 2005. v.2, p.333-349.
- Bueno, C. J.; Ambrósio, M. M. Q.; Souza, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 47-55, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-54052007000100007>.
- Chatterton, S.; Punja, Z. K. Chitinase and β -1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. **Canadian Journal Of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 356-367, 2009. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/w08-156>.
- 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, n. 4, p. 97-125, 2014.
- David, G. Q.; Chavarro-Mesa, E.; Schurt, D. A.; Ceresini, P. C. *Rhizoctonia* como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In: Lopes, U. P.; Michereff, S. J. (Eds). **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. Recife: Edufrpe, 2018.

Dorrance, A. E.; Kleinhenz, M. D.; McClure, S. A.; Tuttle, N. T. Temperature, Moisture, and Seed Treatment Effects on *Rhizoctonia solani* Root Rot of Soybean. **Plant Disease**, v. 87, n. 5, p. 533-538, 2003. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2003.87.5.533>.

Dubey, S. C.; Bhavani, R.; Singh, B. Integration of soil application and seed treatment formulations of *Trichoderma* species for management of wet root rot of mungbean caused by *Rhizoctonia solani*. **Pest management science**, v. 67, n. 9, p. 1163-1168, 2011.

Ferreira, L. V. M.; Carvalho, F.; Andrade, J. F. C.; Oliveira, D. P.; Medeiros, F. H. V.; Moreira, F. M. S. Co-inoculation of selected nodule endophytic rhizobacterial strains with *Rhizobium tropici* promotes plant growth and controls damping off in common bean. **Pedosphere**, v. 30, n. 1, p. 98-108, 2020. Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60825-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60825-8)

Ghini, R.; Zaroni, M. M. H. Relação entre coberturas vegetais e supressividade de solos a *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 10-15, 2001.

Gräfenhan, T.; Schroers, H. J.; Nirenberg, H. I.; Seifert, K. A An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 79-113, 2011.

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

Huang, X.; Zhang, N.; Yong, X.; Yang, X.; Shen, Q. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 135-143, 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2011.06.002>.

Huang, X.; Chen, L.; Ran, W.; Shen, Q.; Yang, X. *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 741-755, 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3259-6>.

Keijer, J. The initial steps of the infection process in *Rhizoctonia solani*. *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control: **Springer**, p. 149–162, 1996.

Lewis, J. A; Lumsden, R. D. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 20, n. 1, p. 49-56, 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0261-2194\(00\)00052-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0261-2194(00)00052-1).

Lopes, K. B. A.; Carpentieri-Pipolo, V.; Fira, D.; Balatti, P. A.; López, S. M. Y.; Oro, T. H.; ...; Degrassi, G. Screening of bacterial endophytes as potential biocontrol agents against soybean diseases. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1466-1481, 2018.

Lopes, U. P.; Michereff, S. J. Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. **Recife: Edufrpe**, 2018.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **AGROFIT: sistema de agrotóxicos fitossanitários.** Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 12 Fev.2021

Moreira, G. M.; Abreu, L. M.; Carvalho, V. G.; Schroers, H. J.; Pfenning, L. H. Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. **Mycological Progress**, v. 15, n. 10, p. 1031-1039, 2016.

Nechet, K. L.; Halfeld-Vieira, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 505-508, 2006.

Ndiaye, M.; Termorshuizen, A. J.; Van Bruggen, A. H. C. Effects of compost amendment and the biocontrol agent *Clonostachys rosea* on the development of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea. **Journal of Plant Pathology**, p. 173-180, 2010.

Olaya, G.; Buitrago, C.; Pearsaul, D.; Sierotzki, H.; Tally, A. Detection of resistance to QoI fungicides in *Rhizoctonia solani* isolates from rice. **Phytopathology**, v. 102, n. 7, p. 88-88, 2012.

Peng, G.; Mcgregor, L.; Lahlali, R.; Gossen, B. D.; Hwang, S. F.; Adhikari, K. K.; Strelkov, S. E.; McDonald, M. R. Potential biological control of clubroot on canola and crucifer vegetable crops. **Plant Pathology**, v. 60, n. 3, p. 566-574, 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02400.x>.

Pfenning, L. H.; Abreu, L. M. Diversity of microfungi in tropical soils. In: Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O.; Brussaard, L. (ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Cabi, p. 189-191, 2006.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: jun. 2021.

Rahman, M.; Punja, Z. K. Biological control of damping-off on American ginseng (*Panax quinquefolius*) by *Clonostachys rosea* f. *catenulata*(=*Gliocladium catenulatum*). **Canadian Journal Of Plant Pathology**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 203-207, jun. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07060660709507458>.

Roberti, R.; Veronesi, A.; Cesari, A.; Cascone, A.; Berardino, I. D.; Bertini, L.; Caruso, C. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. **Plant Science**, v. 175, n. 3, p. 339-347, 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.003>

Rodríguez, M. A.; Cabrera, G.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Godeas, A. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 5, p. 1177-1186, 2011.

Russell, L. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.1., 2019.

Sadeghi, A.; Hesan, A. R.; Askari, H.; Qomi, D. N.; Farsi, M.; Hervan, E. M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of sugar beet with native *Streptomyces* strains under field conditions. **Biocontrol Science And Technology**, v. 19, n. 9, p. 985-991, 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150902912665>.

Schroers, H. J. A monograph of Bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **Stud Mycol**, v. 46, p. 1-214, 2001.

Schwartz, H. F.; Steadman, J. R.; Hall, R.; Forster, R. L. Compendium of bean diseases. American Phytopathological Society (APS Press), n. 2, 2005.

Silva-Barreto, F. A.; Pereira, W. V.; Ciampi, M. B.; Câmara, M. P. S.; Ceresini, P. C. Associação de *Rhizoctonia solani* Grupo de Anastomose 4 (AG-4 HGI e HGIII) a espécies de plantas invasoras de área de cultivo de batata. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 145-154, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-54052010000200007>.

Silva, H. A. O.; Teixeira, W. D.; Borges, Á. V.; Silva Junior, A. L.; Alves, K. S.; Rodrigues Junior, O. M.; Abreu, L. M. Biocontrol of potato early blight and suppression of *Alternaria grandis* sporulation by *Clonostachys* spp. **Plant Pathology**, 2021.

Silva, N. I.; Brooks, S.; Lumyong, S.; Hyde, K. D. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 133-148, 2019.

Sun, Z. B.; Li, S. D.; Ren, Q.; Xu, J. L.; Lu, X.; Sun, M. H. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 3, p. 486-495, 2020.

Van Kan, J. A. L. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends In Plant Science**, v. 11, n. 5, p. 247-253, 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.005>.

Woo, S. L.; Scala, F.; Ruocco, M.; Lorito, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 181-185, 2006.

7. Dados Suplementares

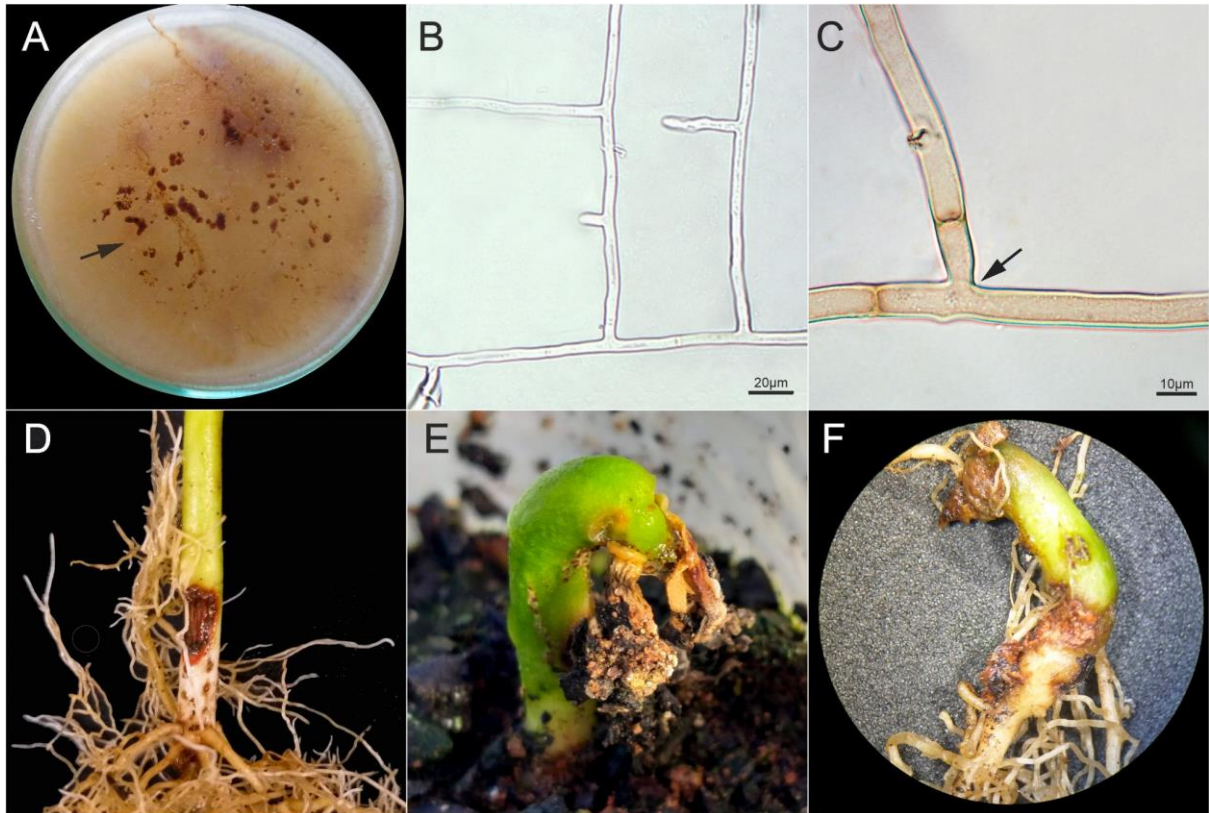


Figura suplementar 1. *Rhizoctonia solani* ocasionando sintomas de pré e pós-emergência em plântulas de feijão. *R. solani* cultivada em meio BDA, produzindo escleródios de formato irregular e coloração marrom (A); hifas novas e hialinas ramificadas em ângulos de 90° (B); hifas maduras e marrons, com destaque para a constrição após o septo e próximo à base da ramificação (C); sintomas de pós-emergência, lesões marrom-avermelhadas na base do colo (D) e má-formação da plântula, sem o desenvolvimento das folhas cotiledonares (E); sintomas de pré-emergência, estrangulamento da interface raiz-caule sem posterior desenvolvimento do caule (F).

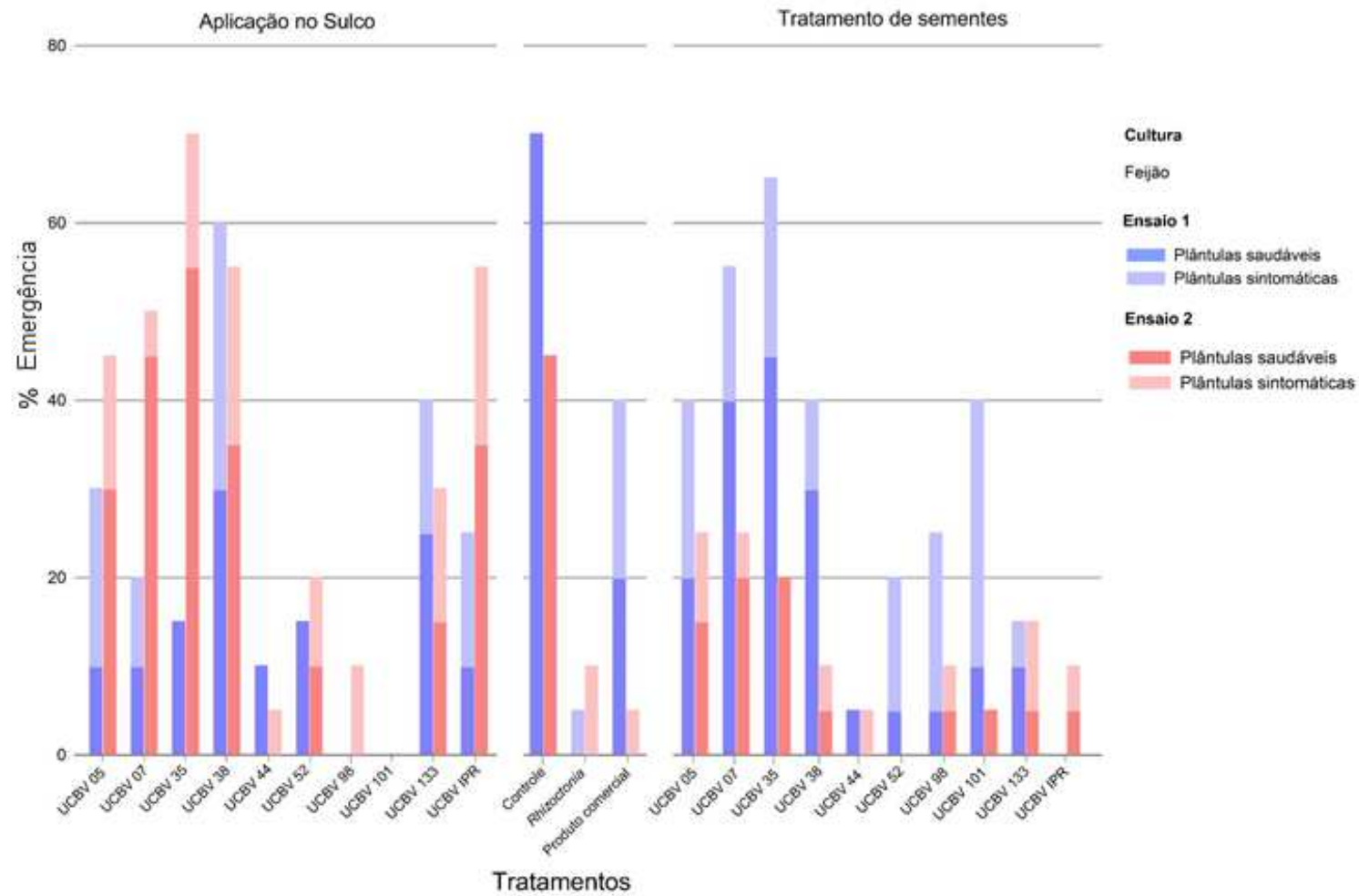


Figura suplementar 2. Emergência de plântulas de feijão, sem e com sintomas ocasionados por *R. solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo e no tratamento de sementes.

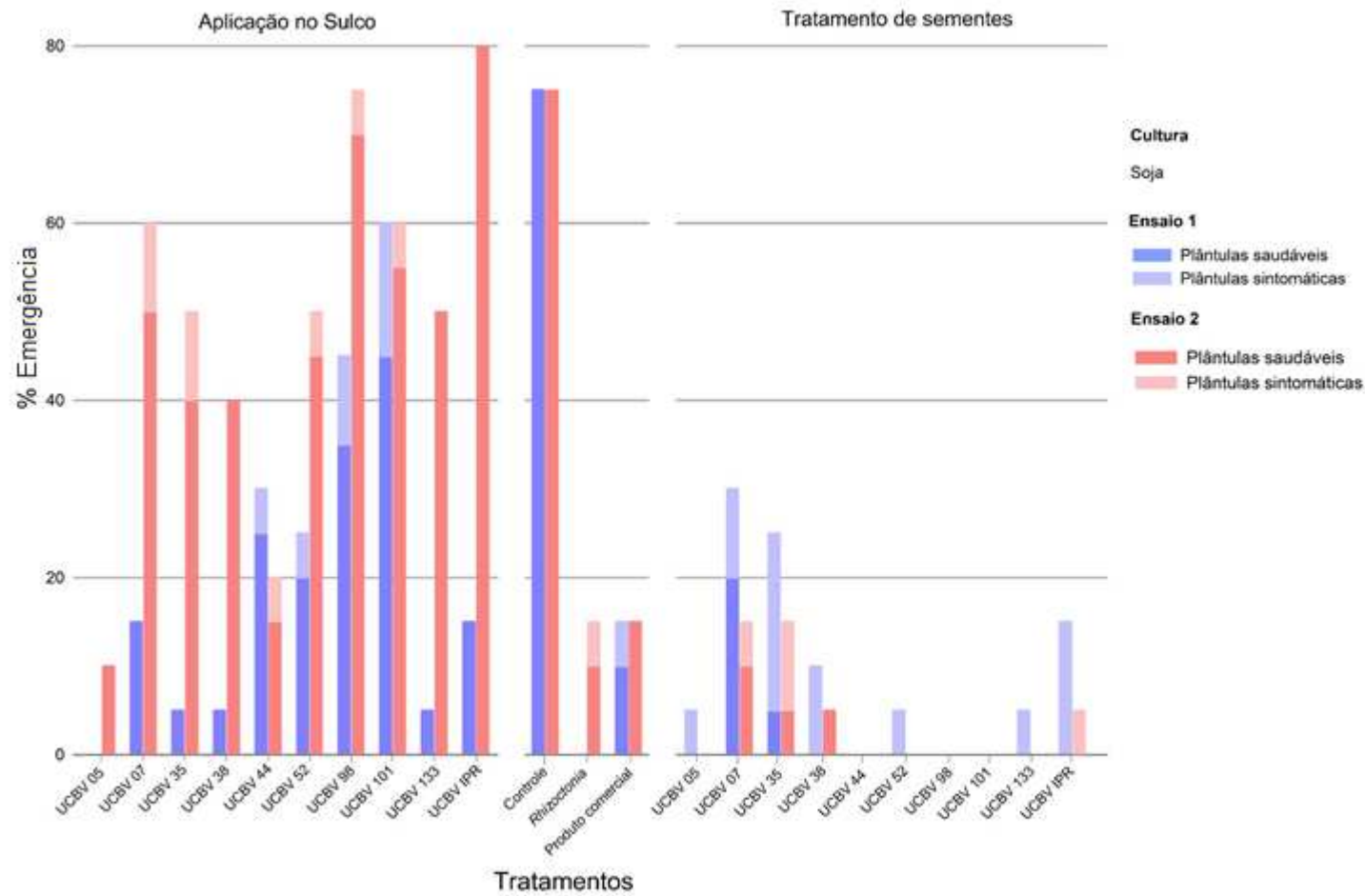


Figura suplementar 3. Emergência de plântulas de soja, sem e com sintomas ocasionados por *R. solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo e no tratamento de sementes.

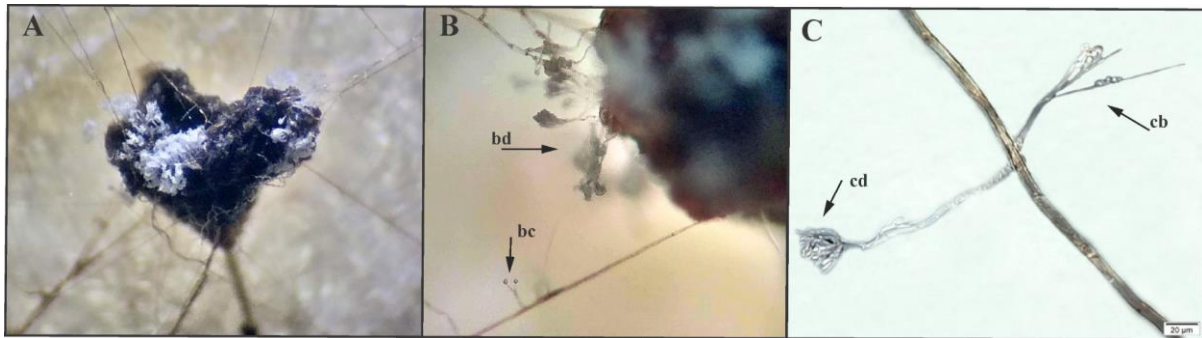


Figura suplementar 4. Micoparasitismo de *Clonostachys* spp. em *Rhizoctonia solani*. Colonização de *C. rhizophaga* (UCBV 38) sobre escleródio de *R. solani* (A); conidióforo verticilado (bc) e penicilado (bd) de *C. rhizophaga* micoparasitando hifa e escleródio de *R. solani*, respectivamente (B); conidióforo verticilado (cb) e penicilado (cd) de *C. chloroleuca* (UCBV 07) sobre hifa de *R. solani*.

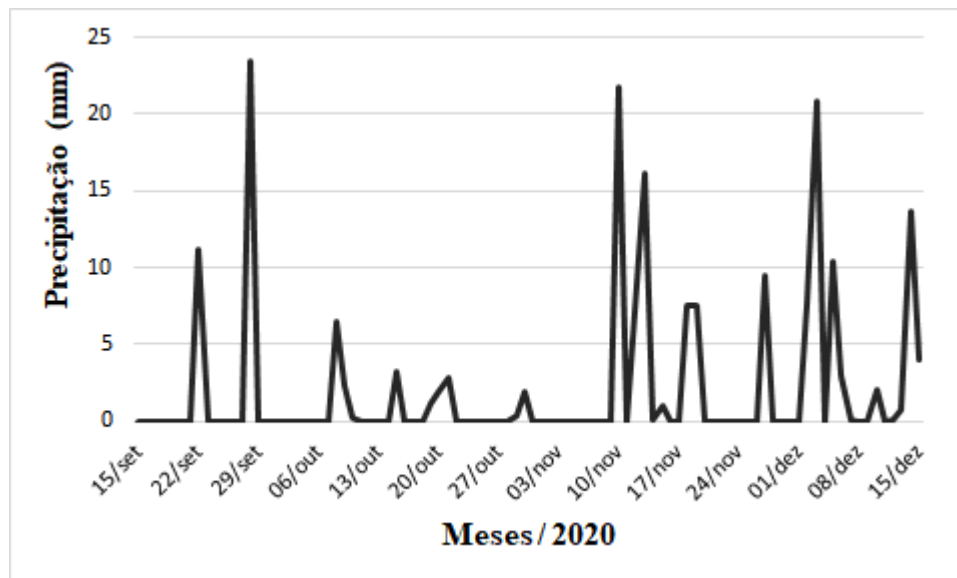


Figura suplementar 5. Precipitação Pluviométrica desde os meses que antecederam a semeadura até o período da avaliação dos sintomas de tombamento - Estação Agrometeorológica da UENP - Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes-Paraná. Cidade situada a um raio de 40 km da cidade do experimento, Cambará-PR.

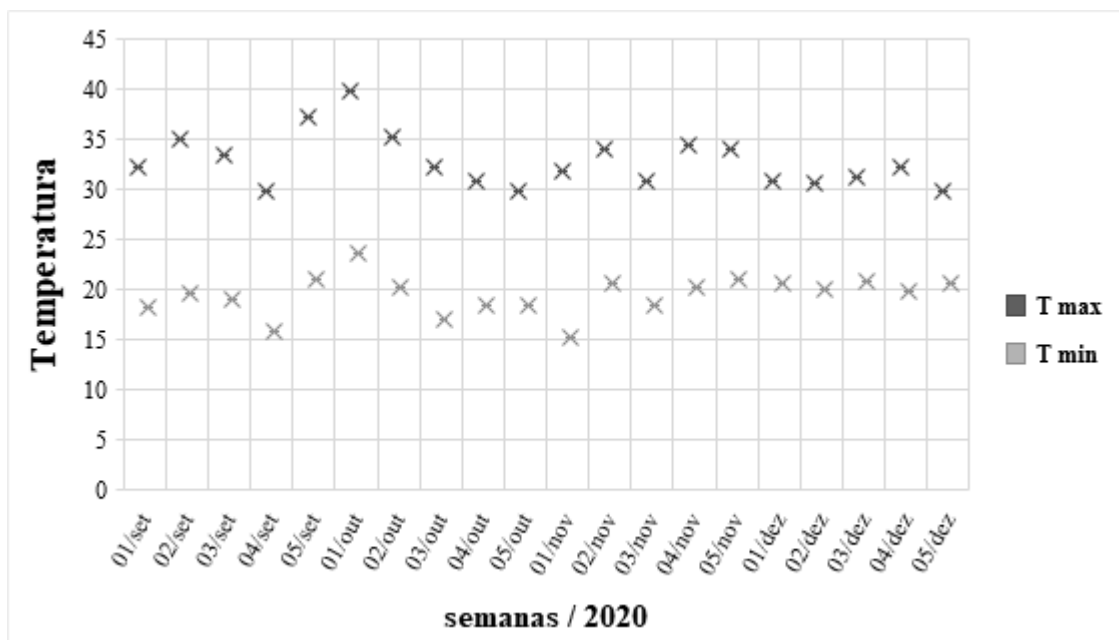


Figura suplementar 6. Temperatura máxima e mínima desde os meses que antecederam a semeadura até o período da avaliação dos sintomas de tombamento. Dados retirados do website "AccuWeather", para a cidade de Cambará-PR.

Tabela suplementar 1. Emergência de plântulas de feijão e probabilidade de emergência de plântulas com sintomas ocasionados por *Rhizoctonia solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo.

Tratamento ¹	Repetição 1*			Repetição 2		
	% Emergência	%Sintomas	E.P ²	% Emergência	%Sintomas	E.P
Testemunha	70b	0	0,102	45ab	0	0,111
<i>Rhizoctonia</i>	5a	100	0,0487	10a	100	0,0671
Pick Up Moss®	40ab	50	0,101	5a	100	0,0487
UCBV 05	30ab	66,6	0,102	45ab	33,3	0,111
UCBV 07	20ab	50	0,0894	50ab	10	0,112
UCBV 35	15ab	0	0,0798	70b	21,4	0,102
UCBV 38	60ab	50	0,110	55ab	36,3	0,111
UCBV 44	10a	0	0,0671	5a	100	0,0487
UCBV 52	15ab	0	0,0798	20ab	50	0,0894
UCBV 98	0a	-	1,26 e ⁻⁰⁵	10a	100	0,0671
UCBV 101	0a	-	1,26 e ⁻⁰⁵	0a	-	3,43 e ⁻⁰⁵
UCBV 133	40ab	37,5	0,110	30ab	50	0,102
UCBV 255	25ab	60	0,0968	55ab	36,3	0,111

*Em cada repetição do bioensaio, valores seguidos pela mesma letra na coluna não se diferem significativamente na análise estatística pelo Teste de Tukey (p<0.05). ²E.P: Erro Padrão, relacionada ao dado da % de emergência.

¹Testemunha: solo não inoculado com *Rhizoctonia solani* e não tratado com *Clonostachys* spp.; *Rhizoctonia*: solo inoculado com *R. solani* mas não tratado com *Clonostachys*; Tratamentos UCBV quando ocorria AS: uma suspensão de 2 x 10⁷ conídios.mL no volume de 12,5 mL por copo era distribuída no solo e TS: 10 mL da solução contendo goma xantana 0,2% (v/m) adicionada a uma suspensão de 2 x 10⁷ conídios.mL era utilizada para cada 100 gramas de sementes

Tabela suplementar 2. Emergência de plântulas de soja e probabilidade de emergência de plântulas com sintomas ocasionados por *Rhizoctonia solani*, após a aplicação de *Clonostachys* spp. no solo.

Tratamento ¹	Repetição 1*			Repetição 2		
	% Emergência	%Sintomas	E.P ²	% Emergência	%Sintomas	E.P
Testemunha	75b	0	0,0968	75bc	0	0,0968
<i>Rhizoctonia</i>	0a	-	1,26 e ⁻⁰⁵	15a	33,3	0,0798
Pick Up Moss®	15a	33,3	0,0798	25abc	0	0,0968
UCBV 05	0a	-	1,26 e ⁻⁰⁵	10a	0	0,0671
UCBV 07	15a	0	0,0798	60abc	0	0,110
UCBV 35	5a	0	0,0487	50abc	20	0,112
UCBV 38	5a	0	0,0487	40abc	0	0,110
UCBV 44	30ab	16,6	0,102	20ab	25	0,0894
UCBV 52	25ab	20	0,0968	50abc	10	0,112
UCBV 98	45ab	22,2	0,111	75bc	13,3	0,0968
UCBV 101	60ab	25	0,110	60abc	8,3	0,110
UCBV 133	5a	0	0,0487	50abc	0	0,112
UCBV 255	15a	0	0,0798	80c	0	0,0894

*Em cada repetição do bioensaio, valores seguidos pela mesma letra na coluna não se diferem significativamente na análise estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$). ²E.P: Erro Padrão, relacionada ao dado da % de emergência.

¹Testesmunha: solo não inoculado com *Rhizoctonia solani* e não tratado com *Clonostachys* spp.; *Rhizoctonia*: solo inoculado com *R. solani* mas não tratado com *Clonostachys*; Tratamentos UCBV quando ocorria AS: uma suspensão de 2×10^7 conídios.mL no volume de 12,5 mL por copo era distribuída no solo e TS: 10 mL da solução contendo goma xantana 0,2% (v/m) adicionada a uma suspensão de 2×10^7 conídios.mL era utilizada para cada 100 gramas de sementes

Tabela suplementar 3. Avaliação da emergência de plântulas e produção estimada de soja do bioensaio da área comercial de Cambará-PR.

Tratamentos	Nº de plantas/linha		Produção estimada	
	1ª avaliação	2ª avaliação	Kg ha ⁻¹	Sacas ha ⁻¹
T1	32	32	4.026	68
T2	29	31	4.341	73
T3	30	31	4.200,00	70
T4	31	33	3.770,37	63
T5	31	32	3.855,56	66
T6	32	33	3.877,78	66
T7	32	34	4.074,07	68
T8	32	34	3.629,63	64

Tabela suplementar 4. Resultado da análise de solo do campo comercial de soja, Cambará-PR.

Gleba	M.O. g kg	pH CaCl ₂	P * mg dm ³	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC 7,0	Al	Ca	Mg	K	Bases
										cmol _c dm ³		% de Saturação			
0-10 cm	10,7	4,6	10,9	0,92	7,7	5,1	0,2	5,3	13,7	19,0	1,4	40,4	26,8	4,8	72,0
Areia	Silte	Argila	Classe textural simplificada												
			%												
2	19	79	Muito argilosa												

*Extrator Mehlich