

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Preparações de taxtomina parcialmente purificada e *Lentinula edodes* no
controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja**

Tainara Menegassi

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2020**

Tainara Menegassi
Engenheira Agrônoma

**Preparações de taxtomina parcialmente purificada e *Lentinula edodes* no controle
de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Menegassi, Tainara

Preparações de taxtomina parcialmente purificada e *Lentinula edodes* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja / Tainara Menegassi - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

82 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Controle alternativo 2. Taxtomina A 3. *Lentinula edodes* 4. *Glycine max* 5. *Sclerotinia sclerotiorum* I. Título

Aos meus pais,

João Luiz Menegassi e Ilair Teresinha Farina Menegassi,

Por todo apoio, dedicação, incentivo e amor. Por sempre me encorajarem a novos desafios. Pelos princípios ensinados que tornaram quem eu sou hoje!

Às minhas irmãs,

Luana Menegassi e Taiane Menegassi,

Pelo amor, companheirismo e por me incentivarem sempre a ser alguém melhor!

Dedico!

“Nós não precisamos de mágica para mudar o mundo. Nós carregamos todo o poder de que precisamos dentro de nós”.

J.K. Rowling

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e Nossa Senhora, por serem meus alicerces e protetores nessa caminhada. Por intercederem sempre pela minha felicidade.

Aos meus pais e irmãs, pelo apoio incondicional, incentivo e amor durante todos os momentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Departamento de Fitopatologia da ESALQ-USP, todos os professores, pelos ensinamentos durante esses dois anos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati, pela paciência, orientação e confiança.

À Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes, agradeço pelo carinho, dedicação, paciência e orientação desde o nosso primeiro contato.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, Sabrina Holz, Wesler Luiz Marcelino, Samuel de Paula, Victor Hugo Moura de Souza, Ruan Carlos Navarro Furtado, Mariana Colli, Daniele Cristina Fontana, Abel Galon Torres, Natália Cataletta, Suzani Paz, Pedro Ozi Furtado, Bruno Marques e Ronaldo José Durigan Dalio pela amizade. Em especial ao Wesler e Sabrina pelo companheirismo e auxílio nas horas que parecia impossível continuar e a Mariana, Pedro e Daniele pela ajuda nos experimentos e companheirismo.

À todos os colegas do departamento, pelo apoio e amizade.

E a todas as pessoas que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, direta ou indiretamente.

À todos, meus agradecimentos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
Referências	13
2. TAXTOMINA PARCIALMENTE PURIFICADA NO CONTROLE DO MOFO BRANCO DA SOJA.....	17
Resumo	17
Abstract.....	18
2.1. Introdução.....	18
2.2. Material e métodos	20
2.2.1. Obtenção das plantas de soja	20
2.2.2. Obtenção e cultivo do isolado de <i>S. sclerotiorum</i>	21
2.2.3. Produção e preparo dos tratamentos utilizados	21
2.2.4. Efeito <i>in vitro</i> da taxtomina parcialmente purificada sobre <i>S. sclerotiorum</i>	22
2.2.5. Efeito <i>in vivo</i> da taxtomina parcialmente purificada sobre <i>S. sclerotiorum</i>	24
2.3. Resultados e discussão.....	27
2.3.1. Crescimento micelial	27
2.3.2. Germinação miceliogênica dos escleródios.....	29
2.3.3. Permeabilidade da membrana plasmática.....	30
2.3.4. Severidade do mofo branco sobre plantas de soja mantidas em casa de vegetação	32
2.3.5. Qualidade sanitária e fisiológica das sementes.....	33
2.3.6. Produção da fitoalexina gliceolina	38
2.4. Conclusões.....	39
Referências	40
3. PREPARAÇÕES DE <i>Lentinula edodes</i> NO CONTROLE DO MOFO BRANCO DA SOJA	47
Resumo	47
Abstract.....	48
3.1. Introdução.....	48
3.2. Material e métodos	51

3.2.1. Obtenção de plantas de soja	51
3.2.2. Obtenção e cultivo do isolado de <i>S. sclerotiorum</i>	52
3.2.3. Obtenção e cultivo do isolado de <i>L. edodes</i>	52
3.2.4. Preparo dos tratamentos utilizados	52
3.2.5. Efeito <i>in vitro</i> dos filtrados de <i>L. edodes</i> sobre <i>S. sclerotiorum</i>	54
3.2.6. Efeito <i>in vivo</i> dos filtrados de <i>L. edodes</i> sobre <i>S. sclerotiorum</i>	57
3.3. Resultados e discussão	60
3.3.1. Crescimento micelial.....	60
3.3.2. Germinação miceliogênica dos escleródios	62
3.3.3. Germinação carpogênica dos escleródios	64
3.3.4. Permeabilidade da membrana plasmática	65
3.3.5. Severidade do mofo branco em plantas de soja mantidas em casa de vegetação ..	68
3.3.6. Qualidade sanitária e fisiológica das sementes	69
3.3.7. Produção da fitoalexina gliceolina.....	73
3.4. Conclusões	75
Referências.....	75

RESUMO

Preparações de taxtomina parcialmente purificada e *Lentinula edodes* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja

A cultura da soja possui grande importância no sistema produtivo mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor do grão. Dentre os fatores que comprometem a produção da cultura, as doenças se destacam e o mofo branco é um dos grandes responsáveis por essas perdas. Devido a isso, faz-se necessário buscar medidas para contribuir no manejo tradicional com fungicidas. Nesse contexto, o controle biológico e/ou a indução de resistência podem ser alternativas para o controle dessa doença. Dentre os indutores, as fitotoxinas e preparações a base de cogumelos possuem potencial como eliciadores de plantas. Com destaque para a fitotoxina taxtomina A produzida por *Streptomyces scabies*, e para o basidiomiceto *Lentinula edodes*. Dessa forma, objetivou-se avaliar o potencial da fitotoxina taxtomina parcialmente purificada (TPP) e de diferentes preparações do cogumelo *L. edodes* como potenciais agentes indutores de resistência em soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. Para verificar o efeito desses potenciais agentes de controle foram realizados ensaios utilizando a TPP e os filtrados de *L. edodes*: filtrado do basidiocarpo (FBASI); filtrado do micélio com 30 dias de idade (FMIC30) e filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade (FSM30). As preparações foram testadas *in vitro*, no crescimento micelial pelo método de incorporação em meio fundente, na germinação miceliogênica e carpogênica dos escleródios, sendo a primeira em placas de Petri contendo meio de cultivo e a última em caixas do tipo gerbox contendo substrato e, na permeabilidade da membrana plasmática de *S. sclerotiorum*. Estudos também foram conduzidos *in vivo* envolvendo a severidade do mofo branco em plantas de soja em casa de vegetação, onde fez-se a aplicação das preparações e depois de 24 horas fez-se a inoculação com *S. sclerotiorum*, sendo posteriormente avaliado o potencial dos compostos na redução da severidade. Como também, na qualidade sanitária e fisiológica de sementes, por meio de testes de sanidade, germinação e emergência de plântulas e na produção da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja. Como resultados, observou-se que a TPP e os filtrados de *L. edodes* exibem efeito de dose, ou seja, com o aumento da concentração ocorre uma redução no índice de velocidade do crescimento micelial e aumento na inibição do crescimento. Tal fato evidencia o efeito direto de TPP e dos filtrados FBASI e FSM30 sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, com inibições de até 60%, 75% e 60%, respectivamente, para as concentrações mais altas testadas. Além disso, ambas as preparações afetaram a permeabilidade da membrana plasmática do fungo, causando a morte celular, constatou-se que os filtrados FBASI e FMIC30 propiciaram um aumento na perda de eletrólitos de 43% e 77%, respectivamente, em relação ao controle. As preparações testadas foram capazes de reduzir em aproximadamente 60% a severidade do mofo branco em soja. Contudo, apesar da TPP e os filtrados de *L. edodes* não apresentarem efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes, esses últimos proporcionaram um aumento no acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja. Conclui-se que a TPP e os filtrados do basidiomiceto *L. edodes* apresentam efeito direto sobre o patógeno e potencial como agentes indutores de resistência em soja contra *S. sclerotiorum*, podendo no futuro contribuírem no controle da doença.

Palavras-chave: Taxtomina A, Shiitake, *Glycine max*, Mofo branco da soja, Indução de resistência

ABSTRACT

Preparations of partially purified thaxtomine and *Lentinula edodes* in the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean

Soybean cultivation has great importance in world production system, with Brazil being the second largest producer of the grain. Among the factors that compromise the production of the crop, diseases stand out and the white mold is one of the main responsible for these losses. Because of this, it is necessary to seek measures to contribute to the traditional management with fungicides. In this context, resistance induction can be alternatives to control this disease. Among the inducers, phytotoxins and preparations based on mushrooms have potential as elicitors in plants, as the phytotoxin thaxtomine A, produced by *Streptomyces scabies*, and the basidiomycete *Lentinula edodes*. Thus, the aim of this work was to evaluate the potential of the partially purified phytotoxin thaxtomine (TPP) and of different preparations of the *L. edodes* mushroom as potential biological control agents and / or inducers of resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum*. To verify the effect of these potential control agents, tests were performed by using the TPP and the *L. edodes* filtrates: basidiocarp filtrate (FBASI); filtrate from 30-day-old mycelium (FMIC30) and filtrate from the 30-day-old mycelial suspension (FSM30). The preparations were tested *in vitro* for their effects on mycelial growth, myceliogenic germination and carpogenic germination of sclerotia. The first one being in Petri dishes containing culture medium and the last one in gerbox type boxes containing substrate. The effects of the preparations were also checked on *S. sclerotiorum* plasma membrane permeability. Studies *in vivo* were also carried out regarding the severity of the white mold in soybean plants in a greenhouse, where the preparations were applied and after 24 hours the plants were inoculated with *S. sclerotiorum*, and the potential of the compounds in reducing the disease was subsequently evaluated. As well as in the sanitary and physiological quality of seeds, by means of health tests, germination and emergence of seedlings and in the production of the phytoalexin gliceolin in soybean cotyledons. As a result, it was observed that TPP and *L. edodes* filtrates exhibit a dose effect, that is, with the increase in concentration, there is a reduction in the mycelial growth rate index an increase in growth inhibition. This fact shows the direct effect of TPP and the FBASI and FSM30 filtrates on the mycelial growth of *S. sclerotiorum*, with inhibition up to 60%, 75% and 60%, respectively, for the highest tested concentrations. In addition, both preparations affected the permeability of the fungal plasma membrane, causing cell death, it was found that the FBASI and FMIC30 filtrates provided an increase in electrolyte loss of 43% and 77%, respectively, in relation to the control. The tested preparations were also able to reduce, approximately in 60%, the severity of the white mold in the soybean plants. However, despite the TPP and *L. edodes* filtrates had no effect on the health quality and physiology of the seeds, the later caused an increase in the accumulation of gliceolin in soybean cotyledons. It is concluded that the TPP and the filtrates of *L. edodes* have a direct effect on the pathogen and exhibit potential as resistance inducers to *S. sclerotiorum*, in soybean plants.

Keywords: Thaxtomine A, Shiitake, *Glycine max*, White mold of soybean, Induced resistance

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de taxtomina parcialmente purificada (TPP) na inibição do crescimento micelial (PIC) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em relação ao controle, após 2 dias de incubação.....	29
Tabela 2. Efeito de preparações de taxtomina parcialmente purificada (TPP) na germinação miceliogênica de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , após 4 dias de incubação.	30
Tabela 3. Efeito dos tratamentos taxtomina parcialmente purificada (TPP) e do indutor de resistência acibenzolar-S-metilíco (ASM) na severidade do mofo branco em plantas de soja em casa de vegetação.....	33
Tabela 4. Efeito de diferentes tratamentos na qualidade sanitária de sementes de soja inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e na produção de escleródios após 8 dias de incubação.	34
Tabela 5. Efeito de diferentes tratamentos (T) nos parâmetros de vigor (primeira contagem da germinação - PCG) e de germinação de sementes de soja não inoculadas (NI) e inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (CI).	36
Tabela 6. Efeito de diferentes tratamentos (T) em plântulas de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	37
Tabela 7. Efeito de diferentes tratamentos (T) na matéria fresca e na matéria seca de plântulas de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	38
Tabela 8. Síntese da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja tratados com água, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , acibenzolar-S-metilíco (ASM) ou taxtomina parcialmente purificada (TPP).	39
Tabela 9. Efeito de filtrados de <i>Lentinula edodes</i> na germinação miceliogênica de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> após 4 dias de incubação.....	64
Tabela 10. Efeito de concentrações do filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade (FSM30) de <i>Lentinula edodes</i> no índice de velocidade de germinação (IVG) e na inibição da germinação carpogênica (IGC) de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	65
Tabela 11. Efeito de diferentes tratamentos na qualidade sanitária de sementes de soja inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e na produção de escleródios após 8 dias de incubação.	70
Tabela 12. Efeito de diferentes tratamentos (T) nos parâmetros de vigor (primeira contagem da germinação - PCG) e de germinação de sementes de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	71
Tabela 13. Efeito de diferentes tratamentos (T) em plântulas de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	71
Tabela 14. Efeito de diferentes tratamentos (T) na matéria fresca e na matéria seca de plântulas de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	72
Tabela 15. Efeito de diferentes tratamentos na síntese da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja.	74

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.), originária da China e pertencente à família Fabaceae, é a oleaginosa mais cultivada no mundo, sendo uma das culturas mais importantes para a segurança alimentar e para o sistema produtivo brasileiro e mundial (JARDINE; BARROS, 2015). A matéria-prima da soja apresenta diversas aplicações em sistemas agroindustriais devido à composição química do seu grão, com alto teor de proteínas e ácidos graxos (GOMES, 1981), com 18-20% de óleo e 79% de farelo (PERKINS, 1995). Além do efeito socioeconômico por seu emprego na indústria química, na agroindústria (produção de farelo de soja, para produção de ração animal e óleo vegetal) e de alimentos e por compor a base da alimentação humana e animal (FREITAS, 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, com participação de 31% da produção mundial, atrás somente dos Estados Unidos da América, e seguido pela Argentina. Na última safra (2018/2019), esses três países foram os responsáveis por mais de 80% da produção mundial dessa oleaginosa (USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2019), sendo que os estados brasileiros que lideraram a produção de soja foram Mato Grosso (28%), Rio Grande do Sul (16%), Paraná (14%) e Goiás (9,9%), de forma que a produção nacional foi de 114,8 milhões de ton (CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019).

Aliado ao incremento da capacidade produtiva da soja tem-se as dificuldades na obtenção de elevadas produtividades, visto que a cultura é afetada por diversos fatores bióticos e, entre eles, destaca-se à ocorrência de doenças como um dos principais limitantes para a máxima exploração do potencial produtivo dessa leguminosa (MAUAD et al., 2010). Há diversas doenças causadas por fungos, bactérias, nematoide ou vírus que podem gerar prejuízos às culturas agrícolas. A expansão da cultura da soja no país tem contribuído para a introdução de novas doenças decorrentes da monocultura, sendo que a importância econômica de cada doença pode variar anualmente e regionalmente conforme o clima, a presença dos patógenos e a suscetibilidade do hospedeiro (EMBRAPA SOJA, 2013).

Dentre as principais doenças da soja está o mofo branco, o qual tem como fontes de inóculo as sementes infectadas pela associação de micélio dormente, estruturas de resistência aderidas ou misturadas ao lote, os escleródios e, por restos culturais infectados (KAWASAKI; MACHADO, 2013; SARAN, 2013). Os sinais do patógeno podem ser observados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sobretudo após a polinização das flores. Inicialmente, surgem lesões aquosas nas plantas, de onde crescem as hifas, dando origem a um micélio branco

cotonoso e na sequência ocorre a formação de escleródios pretos, de tamanho e forma irregulares (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Após a colonização do tecido, as lesões secam e exibem aspecto descolorido e esbranquiçadas (GODOY et al., 2016). O patógeno pode sobreviver por muitos anos no solo na forma de escleródios, os quais garantem sua sobrevivência. Esses podem apresentar germinação miceliogênica, formando hifas, ou carpogênica, gerando pequenos apotécios, onde são desenvolvidos os ascósporos (PAULA JÚNIOR et al., 2010). Esses esporos são ejetados sob condições favoráveis, como abundância de luz e temperaturas entre 10-25 °C e, disseminados, principalmente, pelo vento. A infecção das plantas é estimulada com o fechamento do dossel da cultura e o desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas amenas, próximas a 20 °C e alta umidade do solo e do ar (SARAN, 2013).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, agente causal do mofo branco, é um fungo cosmopolita e inespecífico, podendo infectar uma ampla gama de hospedeiros. Além disso, possui alto potencial de dano na cultura, podendo causar perdas de produtividade de 30% até 100% em condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença (JULIO, 2019; LEITE, 2005; MEYER et al., 2019). Para o controle dessa doença é recomendado a integração de diversas práticas de manejo, pela associação de controle cultural, químico e biológico, por meio da sucessão de culturas não hospedeiras, eliminação de plantas invasoras hospedeiras do fungo, obtenção de cultivares com arquitetura que favoreça boa aeração entre as plantas, uso de microrganismos agentes de controle biológico e fungicidas específicos, aplicados principalmente no início do período da floração (GODOY et al., 2016). Sendo esse último, a forma de controle mais difundida e adotada pelos produtores na maioria das regiões do país. Contudo, o uso do controle químico como exclusiva ferramenta de manejo necessita ser equacionado, por favorecer o surgimento de patógenos resistentes, elevar os custos de produção e também por causar diversos danos ao meio ambiente, ao homem e animais (AGROFIT, 2019; BARDIN; HUANG, 2001; YORINORI; NUNES JUNIOR; LAZZAROTTO, 2004).

Diante dos entraves para o controle do mofo branco é imprescindível a busca por medidas de controle alternativas eficientes. Nesse contexto, pode-se considerar o controle biológico, uma vez que muitos microrganismos possuem potencial para controlar ou inibir o desenvolvimento de patógenos e ainda, induzir a resistência do hospedeiro (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018). Sendo que, essa última, consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes presentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes externos (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; HAMMERSCHIMIDT; DANN, 1997; PASCHOLATI; DALIO, 2018a). Tanto no meio comercial como no científico, estudos

demonstram o potencial do controle biológico e da indução de resistência na redução da incidência e/ou severidade de doenças. Desse modo, compostos e preparações com potencial eliciador ou com capacidade para maximizar a ação de fungicidas devem ser estudados, uma vez que propiciam um manejo mais econômico e eficiente (CAVALCANTI et al., 2006; SUN et al., 2014). Diversos compostos vêm sendo testados para diferentes patossistemas, dentre eles, pode-se citar a fitotoxina taxtomina A, produzida por *Streptomyces scabies* e preparações do cogumelo *Lentinula edodes*.

No que diz respeito a fitotoxina, Paula (2019) averiguou o potencial da taxtomina parcialmente purificada (TPP) na inibição da germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyhizi*, agente causal da ferrugem, com redução de 60% na germinação na concentração de 100 µg equiv. mL⁻¹, em relação ao controle água. Por sua vez, em ensaios com diferentes doses, a concentração de 200 µg equiv. mL⁻¹ inibiu totalmente a germinação dos urediniósporos. Em experimentos *in vivo* com folhas destacadas de soja, a TPP, na concentração de 100 µg equiv. mL⁻¹, apresentou redução de 70% na formação de pústulas cm⁻² do patógeno e conseqüentemente a severidade da ferrugem-asiática e causou aumentos na atividade da enzima guaiacol peroxidase e o acúmulo de fenóis ligados, quando utilizada em combinação com a inoculação do patógeno.

Relatos demonstram o efeito do extrato aquoso do cogumelo Shiitake no controle da antracnose em feijoeiro e a capacidade do mesmo em induzir resistência, aumentando os níveis de atividade de enzimas como peroxidase, catalase e polifenoloxidase 12 e 24 após o tratamento das plantas. Ademais, foi verificado efeito significativo nos componentes de produção, com aumento no número de grãos por vagem e no rendimento (OLIVEIRA et al., 2019).

Apesar do exposto acima, ambos os potenciais indutores ainda não foram estudados quanto a eficiência para o controle do mofo branco em soja. Assim, os objetivos deste estudo foram verificar os efeitos de preparações de *L. edodes* e da taxtomina A: *in vitro* - no crescimento micelial, na germinação miceliogênica e na permeabilidade da membrana plasmática de *S. sclerotiorum*; *in vivo* - na severidade de *S. sclerotiorum* em plantas de soja, na qualidade sanitária e fisiológica de sementes e na produção de gliceolina em cotilédones dessa leguminosa.

Referências

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 5 dez. 2019.

BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n. 1, p. 88–98, 2001.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P. (Ed.). **Indução de resistência em plantas à patógenos e insetos**. 1. ed. Piracicaba, SP: Fealq, 2005. p. 11–28.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatol. Bras**, v. 31, n. 4, p. 372–380, 2006.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Nono levantamento, junho 2019 – safra 2018/2019. **CONAB**, v. 6, n. 9, p. 19, 2019. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v. 7, p. 1–12, 2011.

GODOY, C. V. et al. Doenças da soja. In: AMORIM, L. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. V. 2. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda, 2016. p. 657–675.

GOMES, R. P. **A soja**. 5. ed. São Paulo: Nobel, 1981.

HAMMERSCHIMIDT, D.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL, J. E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 1997. p. 177–179.

JARDINE, J. G.; BARROS, T. D. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em:

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vmz02wx5e00sawqe3vtdl7vi.html>>. Acesso em: 5 dez. 2019.

JULIO, V. A. **Manejo de mofo branco na cultura da soja**. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/blog/119/manejo-de-mofo-branco-na-cultura-da-soja>>.

Acesso em: 22 nov. 2019.

- KAWASAKI, V. H.; MACHADO, J. da C. Establishment of a semi-selective method for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in dry bean and soybean seeds. **Journal of Seed Science**, v. 35, p. 435–442, 2013.
- LEITE, R. M. V. B. de C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Embrapa soja - Comunicado Técnico**, p. 1–3, 2005.
- MAUAD, M. et al. Influência da densidade de semeadura sobre características agronômicas na cultura da soja. **Agrarian**, v. 6, n. 21, p. 175–181, 2010.
- MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, A.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Vol. 1. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres, 2018. p. 261–672.
- MEYER, M. C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2018/19: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos. **Embrapa Soja - Circular Técnica**, v. 152, 2019.
- OLIVEIRA, A. C. et al. *Lentinula edodes* extract in the control and induction of resistance to common bean pathogens. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 14, n. 4, p. 1–6, 2019.
- PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, A.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Vol. 1. 5. ed. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p. 423–452.
- PAULA JÚNIOR, T. J. et al. Mofo branco. In: PRIA, M. D.; SILVA, O. C. (Ed.). **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa - PR: Editora UEPG, 2018. p. 101–106.
- PAULA, S. **Taxtomina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies* na indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi***. 2019. 100p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.
- PERKINS, E. G. Composition of soybeans and soybean products. In: ERICKSON, D. R. (Ed.). **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**. Champaign: Academic Press and AOCS Press, 1995. p. 9–28.
- SARAN, P. E. **Manual de identificação das doenças da soja**. 2013. Coletânea FMC, 2013. p. 200.
- SUN, C. et al. The beneficial fungus *Piriformospora indica* protects Arabidopsis from *Verticillium dahliae* infection by downregulation plant defense responses. **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 264–284, 2014.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World Agricultural Production. p. 33, 2019.

YORINORI, J. T.; NUNES JUNIOR, J.; LAZZAROTTO, J. J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. **Embrapa Soja**, p. 1–36, 2004.

2. TAXTOMINA PARCIALMENTE PURIFICADA NO CONTROLE DO MOFO BRANCO DA SOJA

RESUMO

O mofo branco da soja, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das doenças responsáveis por perdas significativas na cultura da soja. A busca por um manejo eficiente e controle eficaz dessa doença são primordiais para se evitar perdas na produção obtida. Dessa forma, destaca-se a fitotoxina taxtomina A, produzida por *Streptomyces scabies*, a qual é capaz de induzir resistência em plantas, uma vez que pode desencadear mecanismos de defesa das plantas e interferir nos processos metabólicos essenciais. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial da fitotoxina taxtomina parcialmente purificada (TPP) no controle de *S. sclerotiorum* em soja. Também foi verificado o efeito direto de diferentes concentrações de TPP filtrada ou autoclavada, pelo método de incorporação em meio de cultivo fundente, na redução do índice de velocidade do crescimento micelial e na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Assim como, o efeito na germinação miceliogênica de escleródios em placas de Petri contendo meio de cultivo e na permeabilidade da membrana plasmática desse fitopatógeno, por meio da perda de eletrólitos quantificada em condutivímetro. Também foram realizados ensaios com plantas de soja em casa de vegetação, nas quais foram aplicados os indutores e após 24 horas realizada a inoculação com *S. sclerotiorum* e, então, avaliada a severidade foliar do mofo branco pelo uso do software Quant. Foi avaliada também a qualidade sanitária e fisiológica de sementes tratadas com essa fitotoxina, por meio de testes de sanidade, produção de escleródios, vigor, germinação e alterações na massa fresca e seca de plântulas de soja inoculadas com *S. sclerotiorum*, bem como a indução da síntese de gliceolina em cotilédones de soja tratados com TPP. Como resultados, foi possível verificar o efeito direto da TPP filtrada no índice de velocidade e na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, com inibição de 46% e 61% para as concentrações de 20 e 40 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ de taxtomina, respectivamente. Além disso, foi possível demonstrar a característica termolábil dessa fitotoxina. A TPP reduziu em 70% a severidade do mofo branco da soja em plantas mantidas em casa de vegetação. Contudo, a taxtomina A não foi capaz de induzir a síntese de gliceolina em cotilédones de soja e também não afetou a qualidade sanitária e fisiológica das sementes inoculadas com *S. sclerotiorum*. Evidencia-se, assim, o potencial da TPP no controle direto do patógeno, bem como na possível indução de resistência em plantas de soja para o controle do mofo branco.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*; Indução de resistência; Fitotoxina; Taxtomina A; *Glycine max*

ABSTRACT

Partially purified thaxtomine in the control of the white mold of soybean

The white soybean mold, caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, is one of the diseases responsible for significant losses in this crop. The search for efficient management and effective control of this disease is essential to avoid losses in production. The phytotoxin thaxtomine A, produced by *Streptomyces scabies*, is able to induce resistance in plants, since it can trigger plant defense mechanisms and interfere with essential metabolic processes. This study aimed to evaluate the potential of partially purified thaxtomine (TPP) in the control of *S. sclerotiorum* in soybean. The direct *in vitro* effect of different concentrations of filtered and autoclaved TPP was verified in the reduction of the mycelial growth rate index and in the inhibition of the mycelial growth of *S. sclerotiorum* as well as in mycelial germination of sclerotia and on the permeability of the plasma membrane of this phytopathogen. Tests were also carried out with soybean plants in a greenhouse, in which the inducer preparations were applied, and 24 hours later, the plants were inoculated with *S. sclerotiorum* and leaf severity was evaluated by using the Quant software. The health and physiological quality of seeds treated with the phytotoxin preparations was evaluated by means of health tests, sclerotia production, vigor, germination and changes in the fresh and dry mass of soybean seedlings inoculated with *S. sclerotiorum*. The accumulation of the phytoalexin gliceolin in soybean cotyledons treated with TPP was also measured. As a result, it was possible to verify the direct effect of the filtered TPP in the rate index and in the inhibition of the mycelial growth of *S. sclerotiorum*, with 46% and 61% inhibition for the concentrations of 20 and 40 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ of thaxtomine, respectively. In addition, it was possible to verify that this phytotoxin preparation was thermolabile. The TPP reduced in 70% the severity of the white mold in the greenhouse plants. However, the thaxtomine preparation was not able to induce gliceolin synthesis in soybean cotyledons and also did not affect the health and physiological quality of the soybean seeds inoculated with *S. sclerotiorum*. Finally, based upon all the results, it was shown the potential of TPP in the direct control of the pathogen as well as in the resistance induction in soybean plants for the control of the white mold.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*; Resistance induction; Phytotoxine; Thaxtomine A; *Glycine max*

2.1. Introdução

A soja (*Glycine max* (Linnaeus) Merrill) chegou ao Brasil em 1882, na Bahia, mas seu cultivo foi impulsionado nos estados do sul do país, devido principalmente à sucessão de trigo/soja e, então, para a região central do Brasil nas décadas de 70 e 80 (COSTA, 1996; MIYASAKA; MEDINA, 1981). O Brasil mantém o posto de segundo maior produtor de soja no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, e seguido pela Argentina. A produção nacional foi

de 114,8 milhões de toneladas na safra de 2018/2019 (CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019). Reduções na produção do grão de soja ocorrem quando condições climáticas adversas coincidem com determinadas fases críticas de desenvolvimento da cultura. Outro fator limitante para o incremento da produção é a ocorrência de doenças, as quais podem ser responsáveis por perdas de até 100% na produção dessa leguminosa (GODOY et al., 2016). Dentre as principais doenças da cultura, o mofo branco têm causado danos severos na produção sob condições climáticas favoráveis (JULIO, 2019; LEITE, 2005; MEYER et al., 2019).

O mofo branco foi registrado pela primeira vez no Brasil em 1921, em São Paulo, na cultura da batata. Na década de 70 migrou para a região sul do país e tornou-se uma doença preocupante a partir da safra de 2003/2004, afetando muitas lavouras de soja nas regiões Sudoeste, Leste e próximas ao Distrito Federal (MEYER; CAMPOS, 2009). Os sintomas iniciais dessa doença são podridão úmida de cor parda e consistência mole, coberta por micélio branco cotonoso. Com o progresso da doença, esse micélio se converte em escleródios, formados no interior ou na superfície do tecido infectado. Pode-se observar o murchamento das plantas, crestamento e amarelamento das folhas em plantas adultas infectadas (SARAN, 2013).

Em março de 2009, na 3ª Reunião Ordinária da Câmara Setorial da Soja, no Mapa, em Brasília (DF), foi enfatizada a importância do mofo branco da soja e a necessidade de registros de produtos para seu controle em caráter emergencial e de outras medidas de controle para essa doença (MEYER; CAMPOS, 2009). Com os avanços tecnológicos e a crescente busca por métodos de controle eficientes recomenda-se a integração de várias medidas de controle, como o químico, genético, cultural e biológico (GODOY et al., 2016).

O controle biológico consiste no uso de um microrganismo não patogênico para controlar outro microrganismo patogênico. Dessa forma, qualquer influência negativa de um microrganismo no crescimento, infectividade, virulência, agressividade ou demais características do patógeno é considerado como controle biológico. Assim como, pode-se destacar a indução de resistência como uma medida de controle promissora. Cada interação patógeno-hospedeiro pode ser considerada como uma luta entre dois microrganismos pela sobrevivência, em que o patógeno, com suas armas químicas, ataca o hospedeiro e esse último se defende do ataque por meio de mecanismos de defesa estruturais e/ ou bioquímicos (PASCHOLATI; DALIO, 2018b). As plantas que apresentam essa característica de resistência são capazes de resistir ao ataque de patógenos e pragas, devido a ativação de seus mecanismos de defesa em resposta ao tratamento de agentes externos, denominados eliciadores, assim, evitando ou atrasando a colonização e/ou atividade de fitopatógenos no interior do tecido

vegetal (AGRIOS, 2005; HAMMERSCHMIDT, 2007). Essas formas de controle passaram a ser cada vez mais incorporada nas práticas de manejo por serem alternativas para a redução do uso de produtos químicos e, também devido a percepção dos produtores na necessidade de diversificar as medidas de controle de doenças e pelo aumento de registros de produtos eficientes e de qualidade (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Diversas moléculas empregadas no controle biológico e na indução de resistência vêm sendo estudadas por apresentarem redução da incidência e/ou severidade de doenças, as quais possibilitam um manejo mais econômico e eficiente (BRAND, 2016; PASCHOLATI; DALIO, 2018b). A fitotoxina taxtomina A, produzida por *Streptomyces scabies*, apresenta ação como indutora de resistência (BRAND, 2016; GARCIA, 2008). As taxtominas são produzidas por fitopatógenos do gênero *Streptomyces*, principalmente associadas ao agente causal da sarna comum da batata (*S. scabies*) e sua produção *in vitro* foi relatada em diversos trabalhos utilizando-se diferentes meios de cultivo (BABCOCK; ECKWALL; SCHOTTEL, 1993; BEAUSÉJOUR et al., 1999; GOYER; VACHON; BEAULIEU, 1998; LORIA et al., 1995).

As fitotoxinas apresentam propriedades com capacidade de interferir nos processos metabólicos essenciais e, também por atuarem no desencadeamento de mecanismos de defesa das plantas. Ademais, a taxtomina A exige concentrações de $\mu\text{g mL}^{-1}$ para expressar seu potencial e para atuar como eliciadora na expressão dos mecanismos de defesa das plantas tratadas. Contudo, essa fitotoxina ainda não foi testada no controle do mofo branco da soja e, com a crescente demanda por novos métodos alternativos para o controle de doenças se fazem necessário maiores estudos compreendendo esse patossistema e os mecanismos de defesa envolvidos nessa interação (BRAND, 2016; GARCIA, 2008; PASCHOLATI; DALIO, 2018b).

Este trabalho teve como objetivos verificar: a) *in vitro* - o efeito de preparações de taxtomina parcialmente purificada (TPP) no crescimento micelial, germinação miceliogênica e na permeabilidade da membrana celular de *S. sclerotiorum*; b) *in vivo* – o efeito de TPP na severidade do mofo branco em plantas de soja em casa de vegetação, na qualidade sanitária e fisiológica de sementes e na produção de gliceolina em cotilédones dessa leguminosa.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Obtenção das plantas de soja

Vasos plásticos com capacidade de 3 L, contendo substrato (Basaplant: turfa, corretivos, vermiculita, carvão vegetal e casca de *Pinus*), foram semeados com cinco sementes

de soja cultivar DS5916IPRO, com habito de crescimento indeterminado, tolerante ao acamamento e suscetível a *S. sclerotiorum*. Após a emergência, foi realizado desbaste das plântulas, cultivando-as até o estágio V3 de desenvolvimento, em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP), em ambiente e temperatura parcialmente controladas.

2.2.2. Obtenção e cultivo do isolado de *S. sclerotiorum*

O isolado de *S. sclerotiorum* foi obtido junto a micoteca do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ-USP. Para a recuperação do isolado o mesmo foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) em câmaras de crescimento tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a 21 °C e 12 horas de fotoperíodo. Nos experimentos foram utilizadas colônias com quatro dias de idade.

2.2.3. Produção e preparo dos tratamentos utilizados

2.2.3.1. Controle negativo

Foi utilizado água destilada autoclavada como controle negativo.

2.2.3.2. Taxtomina parcialmente purificada

Para a produção e extração da taxtomina parcialmente purificada (TPP) foram adotadas as metodologias propostas por Garcia (2008), com adaptações. O isolado de *S. scabies* foi cultivado em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio aveia, o qual foi preparado pela adição de 40 g de farinha de aveia comercial diluída em 1000 mL de água destilada e, então, aquecidos a 70-80 °C para cocção, durante aproximadamente 10 min, sob agitação. Após o aquecimento, o meio de cultivo foi filtrado em gaze para separação de partículas e o filtrado obtido (pH = 7,2) distribuído no volume de 100 mL em frascos do tipo Erlenmeyer, os quais foram autoclavados (20 min – 121 °C – 1 atm) e, posteriormente, armazenados a -20 °C. Na repicagem, cada frasco recebeu 250 µl de uma suspensão de *S. scabies* previamente cultivada em meio líquido por cinco dias. Após a inoculação, os frascos permaneceram sob agitação durante cinco dias a 28 °C e 225 rpm no escuro. Na sequência, o conteúdo dos frascos foi peneirado para se realizar a separação das partículas e o meio de cultivo obtido foi transferido para um funil de separação e, então, adicionado o solvente acetato de etila, na proporção de 3:5 (v:v). A fração

derivada do acetato de etila foi desidratada com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado. O pó resultante dessa etapa foi ressuspensão em metanol, dando origem a TPP, a qual foi armazenada a -20 °C.

Para a utilização da TPP, o metanol foi evaporado e o conteúdo resultante ressuspensão em água destilada esterilizada. Posteriormente, a TPP foi quantificada em espectrofotômetro a 400 nm, utilizando-se como valor de referência a absorvância de 0,525 correspondente a 143 µg equiv. mL⁻¹ de taxtomina (PASCHOLATI, 2000¹).

2.2.3.3. Acibenzolar-S-metílico

Para o tratamento com acibenzolar-S-metílico (ASM) foi utilizado o indutor de resistência comercial (Bion[®] 50 WG – Syngenta), na concentração de 0,166 g L⁻¹, baseada na recomendação para a cultura do feijão, com volume de calda de 150 L ha⁻¹.

2.2.3.4. Fungicida

O fungicida utilizado foi a iprodiona (500 g L⁻¹ i.a) (Rovral[®] - FMC), na concentração de trabalho de 5 mL L⁻¹, considerando a concentração de 300 L ha⁻¹ e volume de calda de 1,5 L ha⁻¹.

2.2.4. Efeito *in vitro* da taxtomina parcialmente purificada sobre *S. sclerotiorum*

2.2.4.1. Crescimento micelial

Para se verificar o efeito da TPP sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foram incorporadas as preparações em meio de cultivo BDA fundente. Após a solidificação do meio, foram depositados discos miceliais de 2 mm de diâmetro no centro de placas de Petri (50 mm de diâmetro), as quais permaneceram em BOD a 21 °C e 12 horas de fotoperíodo.

As avaliações foram realizadas diariamente, obtendo-se o diâmetro das colônias em duas regiões ortogonais, com o auxílio de um paquímetro digital durante três dias (quando pelo menos uma das colônias atingiu os bordos da placa). Os dados obtidos foram aplicados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial IVCM (mm dia⁻¹), descrito por Oliveira

¹ Comunicação pessoal do Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati (ESALQ/USP).

(1991): $TCMD = \sum(D - D_a) / N$, onde D=diâmetro médio atual da colônia, D_a =diâmetro médio da colônia no dia anterior e N=número de dias.

Os tratamentos utilizados foram taxtomina parcialmente purificada filtrada (TPPF) – em membrana de 0,22 μm , para reter possíveis agentes contaminantes e, a taxtomina parcialmente purificada autoclavada (TPPA) nas concentrações de 0, 5, 10, 20 e 40 μg equiv. mL^{-1} de taxtomina, sendo a dose 0% o meio de cultivo BDA em água destilada esterilizada. O experimento foi realizado duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento. Os dados foram analisados via modelo de regressão linear ($P \leq 0,05$) pelo software R (“R Core Team”, 2019).

2.2.4.1. Permeabilidade da membrana plasmática

Placas de Petri contendo meio de cultivo BDA solidificado foram forradas com papel celofane e sobre esse foram transferidos discos miceliais de *S. sclerotiorum* com quatro dias de idade (item 2.2.2). Para se demonstrar o efeito da TPP na permeabilidade da membrana plasmática, as placas de Petri contendo o fungo receberam 5 mL dos respectivos tratamentos durante 30 min, posteriormente, o micélio foi coletado e transferido para 50 mL de solução de sacarose 0,2 M. Foram realizadas leituras de condutividade elétrica a cada 10 segundos por 360 segundos com auxílio de um condutivímetro (HI 9043, Hanna Instruments), com o objetivo de se verificar a perda de eletrólitos por parte das hifas tratadas. Os resultados foram expressos em mS.g micélio^{-1} .

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos, controle água destilada esterilizada e TPP (100 μg equiv. mL^{-1} de taxtomina) e quatro repetições. Os dados obtidos foram analisados via modelos mistos ($P \leq 0,05$) no software Statistical Analysis System (SAS®) (“SAS User’s Guide”, 2001).

2.2.4.2. Germinação miceliogênica dos escleródios

Os escleródios foram produzidos a partir de colônias de *S. sclerotiorum* (item 2.2.2), onde dois discos miceliais de 0,5 mm de diâmetro dessas colônias foram transferidos para frascos contendo 100 g de cenoura picada autoclavada, os quais foram mantidos a 21 °C e 12 horas de fotoperíodo (COSTA; COSTA, 2006; ZAZZERINI; TOSI, 1985). Decorridos 30 dias, os escleródios produzidos foram coletados, lavados em água destilada esterilizada, secos em

câmara de fluxo e padronizados em tamanho utilizando peneira de 0,20 mesh, com abertura de 0,841mm.

Os escleródios foram desinfestados superficialmente em álcool 70% por 30 seg, hipoclorito de sódio 2% por 3 min e tríplice lavagem em água destilada esterilizada e, finalmente, secos em papel filtro esterilizado. Na sequência, os escleródios permaneceram submersos nas preparações por 24 h e, então, foram coletados, secos em papel de filtro esterilizado e desinfestados novamente. Foram transferidos 6 escleródios de cada tratamento por placa de Petri contendo meio de cultivo BDA, as quais foram incubadas a 21 °C e fotoperíodo de 12h luz. Após 4 dias, foi avaliado o número de escleródios germinados (ELSHERBINY; TAHER, 2018).

Os tratamentos utilizados foram TPP a 100 e 150 µg equiv. mL⁻¹ de taxtomina e o controle água destilada esterilizada. O experimento foi repetido duas vezes, em delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e cinco repetições. Os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) pelo software R (“R Core Team”, 2019).

2.2.5. Efeito *in vivo* da taxtomina parcialmente purificada sobre *S. sclerotiorum*

2.2.5.1. Severidade do mofo branco em plantas de soja mantidas em casa de vegetação

Para se verificar o efeito da TPP na severidade de *S. sclerotiorum* em plantas de soja, foram utilizados os tratamentos: água destilada (controle), TPP a 100 µg equiv. mL⁻¹ de taxtomina e ASM (0,166 g L⁻¹). As preparações foram aplicadas até o ponto de escorrimento (*item 2.2.4*) em plantas de soja, cultivadas conforme descrito em 2.2.1, em estágio V3 de desenvolvimento. A inoculação do patógeno foi realizada 24h após a aplicação das preparações, por meio de discos miceliais (5 mm de diâmetro) de colônias de *S. sclerotiorum* de quatro dias de idade, os quais foram depositados no centro do segundo trifólio de cada planta, permanecendo em câmara úmida por seis dias. Na sequência, foi realizada a quantificação da severidade da doença pelo software QUANT, de modo que foi escaneado o folíolo central do segundo trifólio de cada planta, sendo a imagem calibrada em 300 DPI de resolução e efetuada a redução de 32 cores (LIBERATO, 2003; VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo essa composta por um vaso contendo três plantas de soja. O

experimento foi repetido duas vezes e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias ao teste de Tukey ($P \leq 0,05$) no software R (“R Core Team”, 2019).

2.2.5.2. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes

As sementes de soja utilizadas neste ensaio (cv TMG 7062 IPRO), foram previamente submetidas a teste de sanidade para confirmar a ausência de *S. sclerotiorum*. Foi realizada a assepsia superficial das sementes, submetendo-as ao tratamento com NaClO (1%) por 3 min e secagem por 24 horas.

As sementes foram inoculadas com *S. sclerotiorum* utilizando a técnica de restrição hídrica, com meio BDA + Manitol -1,0 MPa (COSTA et al., 2003). Colônias do patógeno de quatro dias de idade foram cultivadas em placas de Petri com meio de cultivo BDA acrescido de Manitol, em BOD a 21 °C com 12 horas de fotoperíodo. Após três dias, quando a colônia atingiu toda a superfície do meio de cultivo, as sementes de soja foram espalhadas em camada única sobre as colônias e as placas mantidas a 21 °C e 12 horas de fotoperíodo por 24 horas. Em seguida, as sementes foram retiradas das placas e realizada a secagem em superfície asséptica por 24 horas. A testemunha consistiu de placas com meio BDA acrescidas de Manitol sem o fungo. Para a realização dos ensaios foram utilizadas amostras de sementes com 50% de incidência do fungo e amostras sem o fungo (testemunha), as quais receberam os respectivos tratamentos (MORAES, 2020²).

Para se verificar o efeito da TPP na qualidade sanitária e fisiológica, as sementes foram tratadas com TPP (100 µg equiv. mL⁻¹ de taxtomina), acibenzolar-S-metílico (0,166 g L⁻¹), Casboxina+Tiram (Vitamax thiram 200 SC[®]) (0,5 mL para 100 g de semente) e água destilada esterilizada como controle negativo. O tratamento foi realizado em sacos plásticos, com volume de calda de 0,5% do peso das sementes, sendo as amostras agitadas manualmente até a completa homogeneização.

A qualidade sanitária das sementes foi verificada utilizando-se o método do papel de filtro (BRASIL, 2009). Foram forradas placas de Petri de 90 mm de diâmetro com três folhas de papel de filtro, umedecidas com água destilada, e então, transferidas 5 sementes previamente tratadas. As placas foram incubadas a ±21 °C no escuro durante aproximadamente oito dias. As avaliações de sanidade foram realizadas a cada dois dias e no último dia foi quantificado o

² Comunicação pessoal da Dra. Heloísa Duarte de Moraes (ESALQ/USP).

número de escleródios produzidos por placa. O experimento consistiu de 4 repetições por tratamento e cada uma foi composta por seis placas contendo cinco sementes.

A germinação das sementes foi avaliada pelo método do rolo de germinação, baseada nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), de forma que folhas de papel toalha foram umedecidas 2,5 vezes o seu peso seco com água destilada esterilizada e transferidas 25 sementes sobre cada conjunto, com 2 folhas de papel, os quais foram incubados em posição vertical em germinador a 25 °C. Foram realizadas avaliações de vigor por meio da primeira contagem de germinação (PCG) aos 5 dias e parâmetros de germinação aos 8 dias após a instalação do experimento, obtendo-se a porcentagem de plântulas normais. O experimento foi composto com oito rolos por tratamento, sendo considerada a média de dois rolos uma repetição, totalizando quatro repetições por tratamento.

Para se verificar o índice de velocidade de emergência (IVE), estande final e sobrevivência de plântulas foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 50 sementes. As sementes inoculadas e não inoculadas, foram semeadas em caixas plásticas de 21 x 48 x 12 cm (largura x comprimento x altura), contendo substrato Basaplant. A velocidade de emergência foi realizada pelo número de plântulas emergidas diariamente, considerando as plântulas com os cotilédones acima do nível do solo como emergidas. A avaliação foi encerrada quando houve a estabilização do número das plântulas por três contagens consecutivas. O IVE foi determinado pelo cálculo proposto por Maguire (1962a): $IVE = N1 / D1 + N2 / D2 + \dots + Nn / Dn$, onde: IVE = índice de velocidade de emergência de plântulas; N= número de plântulas emergidas do dia anterior até o dia da contagem atual; D = número de dias da semeadura da primeira à última contagem. Na última contagem realizada, após a estabilização do número de plântulas, foi registrada a porcentagem de sobrevivência das plântulas e as mesmas foram coletadas para determinação da matéria fresca e seca.

Os respectivos ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias ao teste de Tukey ($P \leq 0,05$) pelo software R (“R Core Team”, 2019).

2.2.5.3. Produção da fitoalexina gliceolina

Para a determinação da gliceolina (HAHN; ALBERSHEIM, 1978; LABANCA, 2002), sementes de soja foram semeadas em bandejas contendo areia autoclavada e mantidas em casa de vegetação a ± 25 °C. Após 10 dias, os cotilédones foram coletados, lavados em água

destilada esterilizada e feito um corte superficial de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro na face abaxial, sobre o qual foi depositada uma alíquota de 75 μL das preparações. Placas de Petri foram forradas com papéis de filtro umedecidos com água destilada esterilizada e depositados sobre os mesmos seis cotilédones, sendo essas mantidas em BOD a 25 °C por 20h no escuro. Os cotilédones foram então, transferidos para tubos contendo 10 mL de água destilada esterilizada e mantidos sob agitação por 1h, sendo a absorbância determinada em espectrofotômetro a 285 nm.

Os tratamentos utilizados foram TPP a 100 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ de taxtomina, acibenzolar-S-metílico (0,166 g L^{-1}), controle positivo *Saccharomyces cerevisiae* (0,007 g L^{-1}) e o controle negativo água destilada esterilizada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Utilizou-se para análise de variância a transformação pela metodologia $\text{box cox} = \text{dados}^{\{0.5\}}$ e as médias foram submetidas ao teste de Tukey ($P \leq 0,01$) pelo software R (“R Core Team”, 2019).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Crescimento micelial

A taxtomina parcialmente purificada filtrada (TPPF) apresentou efeito de doses significativo para o IVCN e PIC, comprovando seu efeito direto na redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (Figura 1; Tabela 1). Enquanto que, a taxtomina parcialmente purificada autoclavada (TPPA) não foi capaz de inibir o crescimento do fungo nas concentrações testadas, tal fato indica um comportamento termolábil dessa fitotoxina, ou seja, quando esta é exposta a elevadas temperaturas, como o processo de autoclavagem, ocorre a perda de suas propriedades.

Na Figura 1 pode-se observar o efeito de doses de TPPF, ou seja, quanto maior a concentração menor a velocidade do crescimento micelial do fungo. O mesmo ocorre para o PIC (Tabela 1), em que as concentrações de 20 e 40 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ de taxtomina apresentaram 46% e 61% inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* em relação ao controle, respectivamente. A ação direta da taxtomina A sobre microrganismos ainda não foi completamente esclarecida, contudo, há vários modos de ação de diferentes compostos, com potencial de controle, como os inibidores de mitose, síntese de ácidos nucleicos, síntese de proteínas, respiração, metabolismo de fosfato, síntese de ergosterol, disruptores da função da membrana plasmática e inibidores de síntese de parede celular (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001).

Em relação a ação direta de taxtomina A sobre patógenos, verificou-se que essa fitotoxina foi capaz de reduzir o crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios de *Colletotrichum sublineolum* (GARCIA, 2008). Tal efeito também foi constatado na redução do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer* (PINTO, 2014) e redução da germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* em relação ao controle água (PAULA, 2019). Além disso, quando realizado um estudo com essa fitotoxina autoclavada e não autoclavada ($100 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ de taxtomina), houve inibição da germinação dos conídios de *Colletotrichum truncatum*, ou seja, a taxtomina autoclavada não perdeu sua atividade biológica na inibição da germinação de conídios e, ainda, apresentou comportamento estatisticamente semelhante ao fungicida azoxistrobina+ciproconazole (MARCELINO, 2019).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com a literatura, demonstrando o potencial de preparações da fitotoxina taxtomina A no efeito direto contra fitopatógenos, além de ativador de defesa de plantas (GARCIA, 2008). Contudo, esse efeito pode sofrer alterações em função do microrganismo, planta e das concentrações utilizadas (BRAND, 2016).

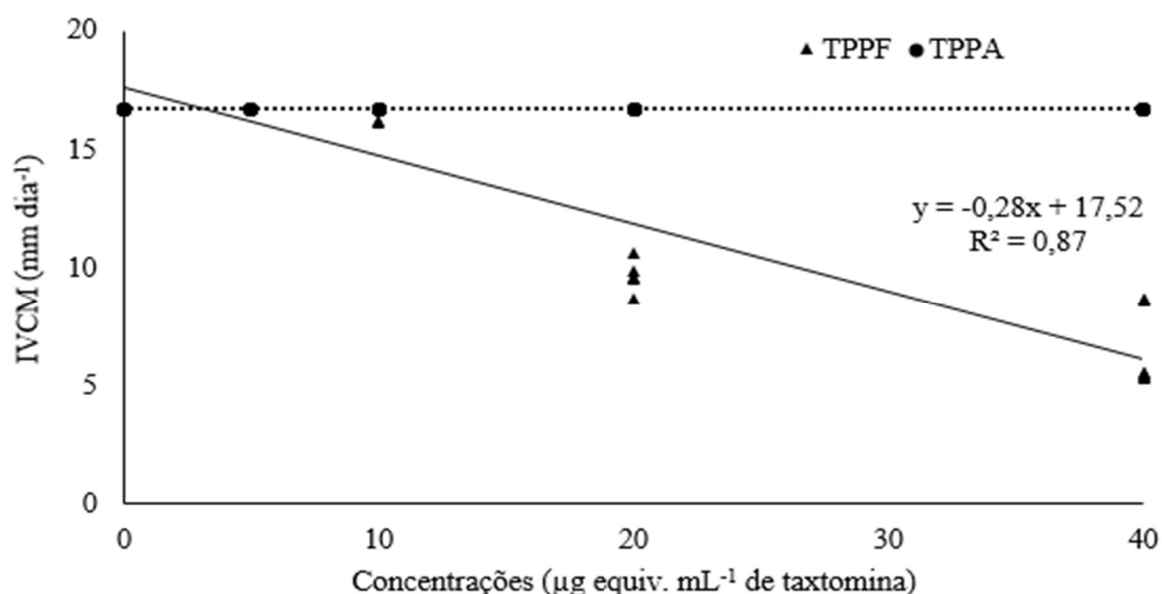


Figura 1: Efeito de diferentes concentrações de taxtomina parcialmente purificada filtrada (TPPF) e taxtomina parcialmente purificada autoclavada (TPPA) no índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de taxtomina parcialmente purificada (TPP) na inibição do crescimento micelial (PIC) de *Sclerotinia sclerotiorum* em relação ao controle, após 2 dias de incubação.

Tratamentos	Concentrações ($\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ de taxtomina)	PIC (%)
TPPF	5	0*
	10	1,0 \pm 1,6
	20	46,1 \pm 10,8
	40	61,0 \pm 10,0
CV(%)		27,52
TPPA	5	0
	10	0
	20	0
	40	0
CV(%)		0

* Equação de regressão: $y = -0,05x^2 + 4,60x - 27,93$. $R^2 = 0,93$; $\bar{x} \pm DP$; TPPF: Taxtomina parcialmente purificada filtrada; TPPA: Taxtomina parcialmente purificada autoclavada.

2.3.2. Germinação miceliogênica dos escleródios

Para o ensaio com escleródios de *S. sclerotiorum*, apenas a concentração mais alta (150 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ de taxtomina) foi capaz de inibir significativamente a germinação miceliogênica, com uma redução de 40% em relação a testemunha (Tabela 2). Esse efeito direto da TPP na germinação dessas estruturas pode estar relacionado ao tempo de exposição dos escleródios aos tratamentos, uma vez que, nesse ensaio os escleródios foram expostos durante 24 horas. Dessa forma, altas concentrações da fitotoxina e maior período de exposição dos escleródios podem estar correlacionados a efeitos promissores na inibição da germinação dessas estruturas de sobrevivência.

As estruturas de sobrevivência podem apresentar formas e origens distintas, mas exercem a mesma função de promover a sobrevivência do microrganismo em condições adversas ao seu desenvolvimento. Patógenos de solo como a *S. sclerotiorum* desenvolvem escleródios para sobrevivência, uma estrutura rígida, formada de agregados compactos de hifas somáticas. A germinação dos escleródios pode ser através da emissão de hifas (germinação miceliogênica), com a formação de esporos (esporogênica) ou com a formação de corpos de frutificação (carpogênica) (AMORIM; PASCHOLATI, 2018). Na germinação miceliogênica as hifas podem infectar os tecidos diretamente, contudo, apesar de sua capacidade de causar infecções importantes, as hifas geralmente infectam plantas próximas aos escleródios (BARDIN; HUANG, 2001; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Para verificar o efeito de óleos essenciais na inibição da germinação miceliogênica de escleródios, Graf Junior (2018) aumentou o período de exposição dos escleródios aos

tratamentos, para isso adicionou uma alíquota dos óleos essenciais sobre o meio de cultivo ágar-água solidificado e então, depositou os escleródios sobre o meio contendo os tratamentos. Os óleos essenciais de capim-limão e cravo apresentaram inibição de 94% e 100%, respectivamente, da germinação dos escleródios após 45 dias.

Em ensaios realizados durante três safras consecutivas (2012/2015), utilizando biofungicidas de diferentes espécies de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., não foram verificados incrementos na redução da germinação miceliogênica dos escleródios, independentemente do número de aplicações e tão pouco ganho de produtividade nos ensaios com esses biofungicidas, evidenciando-se a capacidade de sobrevivência destas estruturas, mesmo após a colonização por antagonistas (MEYER et al., 2016). Entretanto, os biofungicidas foram capazes de reduzir a germinação carpogênica em até 24% na safra 2012/13, 63% na safra 2013/14 e 89% na safra 2014/15, demonstrando o potencial de ação desses produtos sobre os escleródios de *S. sclerotiorum*. Uma vez que, a infecção das plantas por *S. sclerotiorum* ocorre principalmente por meio da germinação carpogênica, o efeito desses antagonistas na inibição da germinação dos escleródios é vital para a redução do inóculo na área (MEYER et al., 2016).

Dessa forma, estudos devem ser realizados com maiores concentrações dessa fitotoxina e maior período de exposição dos escleródios a TPP, por se tratarem de estruturas com alto poder de sobrevivência. Além disso, deve-se verificar se essa fitotoxina apresenta efeito fungicida ou fungistático e também os mecanismos de ação envolvidos, uma vez que existem poucos estudos sobre o seu efeito no controle de *S. sclerotiorum*.

Tabela 2. Efeito de preparações de taxtomina parcialmente purificada (TPP) na germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, após 4 dias de incubação.

Tratamento	Germinação (%)
Água (testemunha)	100,0±0 a*
TPP (100 µg equiv. mL ⁻¹ de taxtomina)	100,0±0 a
TPP (150 µg equiv. mL ⁻¹ de taxtomina)	66,6±33 b
CV(%)	28,9

*Dados transformados (dados^{3.5}); Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$.

2.3.3. Permeabilidade da membrana plasmática

Foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos quanto à perda de eletrólitos do micélio de *S. sclerotiorum* tratados com a fitotoxina taxtomina A, em relação ao controle água destilada esterilizada, assim como, também houve efeito significativo para o fator

tempo (Figura 2). Nesse ensaio, o micélio tratado com a fitotoxina apresentou um incremento na perda de eletrólitos, a partir de 90 segundos, com uma condutividade média de $42 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}$ de micélio fresco aos 360 segundos. Enquanto que, nesse mesmo período, o controle permaneceu constante com uma condutividade média de $38 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}$ de micélio fresco. O micélio de *S. sclerotiorum* se mostrou mais sensível a perda de eletrólitos quando tratado com TPP, pois apresentou valores superiores de condutividade elétrica. Tal fato indica que a TPP causa danos à membrana plasmática alterando a permeabilidade seletiva, o que causa à morte celular. Resultados semelhantes foram obtidos por Duan et al. (2013) e Xu et al. (2014) com fungicidas.

Garcia (2008) comprovou o efeito da taxtomina A na alteração da permeabilidade seletiva das membranas celulares por meio do aumento significativo da condutividade elétrica de mesocótilos de sorgo tratados com essa fitotoxina. O fato da taxtomina A interferir na permeabilidade seletiva das membranas plasmáticas pode ser relacionado a sua capacidade de alterar o fluxo de íons, como Ca^{++} e H^+ (TEGG et al., 2005). Além disso, Scheible et al. (2003) relataram que o principal sitio de ação dessa fitotoxina envolve o bloqueio da biossíntese de celulose.

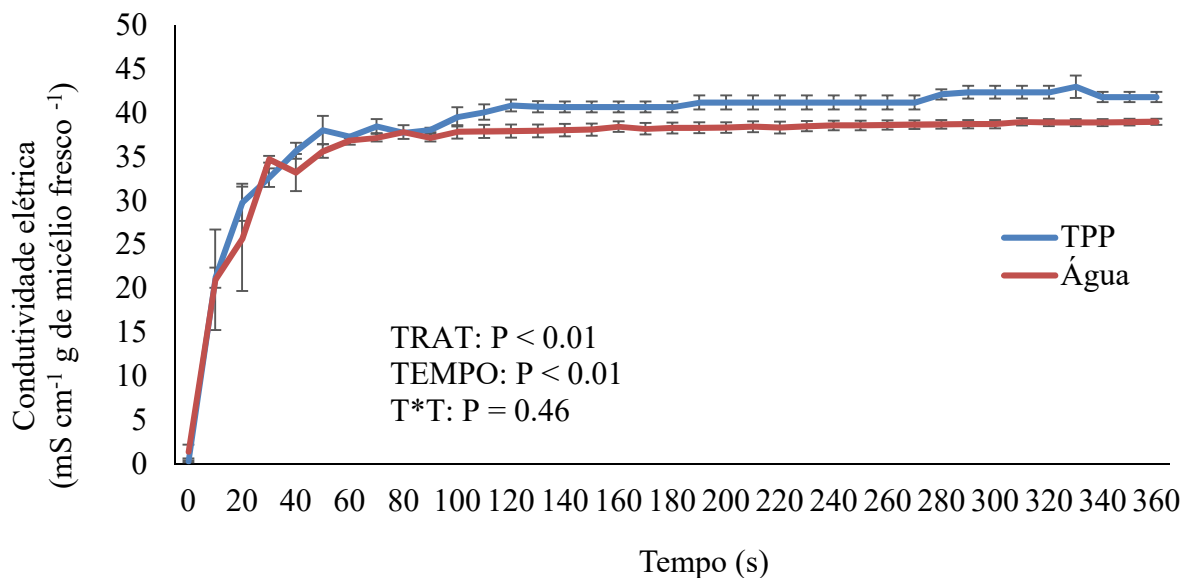


Figura 2: Condutividade elétrica resultante do micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* tratado com taxtomina parcialmente purificada (TPP) a $100 \mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ de taxtomina ou água (controle). Os resultados representam a média \pm erro padrão.

2.3.4. Severidade do mofo branco sobre plantas de soja mantidas em casa de vegetação

Os tratamentos ASM e TPP apresentaram diferença significativa na redução da severidade do mofo branco da soja em relação ao controle água em plantas mantidas em casa de vegetação. Como demonstra a Tabela 3, a TPP e ASM apresentaram redução de 70% e 44%, respectivamente, na severidade da doença em relação ao controle água, no entanto, apesar de diferirem do controle estes tratamentos não apresentaram diferença estatística entre si. O acibenzolar-S-metílico é um produto químico, análogo fisiológico do ácido salicílico, utilizado como ativador de plantas com a finalidade de proteção, por meio da indução dos mecanismos de defesa, ativando, por exemplo, genes de regulação de níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e outras espécies reativas de oxigênio (GOELLNER; CONRATH, 2008; KATZ; THULKE; CONRATH, 1998; KOHLER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002; TOKUNAGA; KEON; HARGREAVES, 1998). A sua eficácia no controle de doenças já é consolidada para vários patossistemas (ISHIGA et al., 2020; PAULA, 2019; SANTOS et al., 2018; SIQUEIRA et al., 2019), com redução de pústulas de *P. pachyrhizi* em soja, na severidade de antracnose em feijão caupi e no incremento de enzimas relacionadas a defesa de plantas.

Os mecanismos de ação da taxtomina parcialmente purificada, a qual apresentou redução da severidade da doença estatisticamente semelhante ao indutor comercial acibenzolar-S-metílico, ainda não foram totalmente esclarecidos. Entretanto, diversos estudos relatam a ação da TPP como indutor de resistência para diferentes patossistemas, contudo mais estudos são necessários para a interação entre soja e *S. sclerotiorum* (GARCIA, 2008; JOGLEKAR et al., 2018; LERAT et al., 2009; MARCELINO, 2019; PAULA, 2019; PINTO, 2014). Ressaltando que a eficácia dessa fitotoxina pode variar em função da planta, concentração e as condições testadas. Em ensaios com plântulas de citros, constatou-se que ambos os tratamentos com TPP e ASM aumentaram a atividade da enzima β -1,3 glucanase em folhas e apresentaram um possível efeito sistêmico de defesa nas plantas (BRAND, 2016). Ademais, Paula (2019) demonstrou a capacidade de ação de TPP e ASM como potenciais indutores de resistência no controle de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas de soja, apresentando reduções significativas na formação de pústulas de aproximadamente 30% em relação ao controle água.

Com base na literatura disponível, pode-se considerar que a redução da severidade do mofo branco da soja é possivelmente em decorrência da ativação de mecanismos de defesa por meio da aplicação da TPP. Uma vez que, essa fitotoxina pode interferir na velocidade de ocorrência de influxo de Ca²⁺, o qual pode ser um mensageiro chave no processo de infecção

de fitopatógenos por contribuir na deposição de calose, regulação da produção de fitoalexinas, estabilidade de membranas, integridade celular e ativação de enzimas de defesa (ERRAKHI et al., 2008; RESENDE et al., 2006; TEGG et al., 2005).

Tabela 3. Efeito dos tratamentos taxtomina parcialmente purificada (TPP) e do indutor de resistência acibenzolar-S-metílico (ASM) na severidade do mofo branco em plantas de soja em casa de vegetação.

Tratamento	Severidade (%)
Água (testemunha)	77,9±19 a*
ASM	43,7±12 b
TPP (100 µg equiv. mL ⁻¹ de taxtomina)	23,1±16 b
CV(%)	33,4

*Dados transformados ($\text{dados}^{-1,97}$); Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$.

2.3.5. Qualidade sanitária e fisiológica das sementes

Na análise da qualidade sanitária de sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum* apenas o tratamento Casboxina+Tiram foi capaz de controlar esse patógeno, tanto na sanidade de sementes como na produção de escleródios (Tabela 4). As amostras com os demais tratamentos apresentaram um percentual de infecção de aproximadamente 65%, não diferindo estatisticamente da testemunha água. Tal fato pode ser explicado pela inoculação artificial do fungo ser muito mais severa quando comparado as condições naturais, salientando que a porcentagem de sementes infectadas por *S. sclerotiorum* no tratamento testemunha foi superior a lotes de amostras provenientes de infestações naturais. Nesse último, dificilmente encontram-se índices superiores a 2% de incidência do fungo, uma vez que esse percentual já pode ser responsável por ocasionar graves epidemias de mofo branco (SOUZA; LOBO JUNIOR; SOARES, 2008). Para a comercialização de sementes, a portaria N° 47, de 26 de fevereiro de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento determina como zero o nível de tolerância de *S. sclerotiorum* em sementes de soja (MAPA, 2009).

Portanto, o produto com melhor capacidade para controlar o patógeno nesse ensaio, foi um fungicida sistêmico e de contato do grupo químico Carboxanilida (inibidor da succinato desidrogenase) e Dimetilditiocarbamato (um multissítio com atividade protetora) (JUNIOR; BEHLAU, 2018). Em relação ao efeito de fungicidas na incidência de *S. sclerotiorum*, estudos demonstram que produtos à base de tiofanato metílico+fluazinam, carbedazin+thiram, piraclostrobina+tiofanato metílico+fipronil e carboxina+thiram possuem a capacidade de erradicar o fungo presente nas sementes (PRANDO, 2014).

O tratamento com TPP não apresentou controle na incidência de *S. sclerotiorum* em sementes, o que pode ter ocorrido devido a inoculação artificial, a qual foi realizada por um período de contato de 24 horas. Além da alta incidência do fungo nas sementes (60% no tratamento testemunha), a severidade também foi elevada, uma vez que, o tempo de contato de 24 horas permitiu que o fungo penetrasse na semente, dificultando o possível controle por parte da TPP. Isso pode estar relacionado ao efeito dessa fitotoxina *in vitro*, visto que esta não foi capaz de inibir totalmente o crescimento do fungo, apresentando 60% de inibição do crescimento micelial (item 2.3.1). Apesar disso, a TPP apresentou reduções significativas no desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* desse fitopatógeno.

A agressividade do patógeno pode estar ligada com o tempo de contato com a semente. Em trabalhos realizados por Botelho et al. (2013), com inoculação de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, os autores verificaram que após 36 horas do fungo estar em contato com as sementes não houve redução no estande final de plantas, entretanto, quando se aumentou o período de contato para 72 horas, foi observada uma redução de 71% no estande. Tal fato demonstra a importância do tratamento de sementes com produtos eficientes, pois mesmo que a presença de fungos nas sementes não cause redução na qualidade fisiológica, esta associação é capaz de atuar na sobrevivência e disseminação do patógeno (VENTUROSO et al., 2015).

Tabela 4. Efeito de diferentes tratamentos na qualidade sanitária de sementes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* e na produção de escleródios após 8 dias de incubação.

Tratamento	Sanidade (%)	Produção de escleródios
Água (testemunha)	60,0±19 a*	5,9±2 a*
Casboxina+Tiram	0,0 b	0,0 b
ASM	68,3±10 a	5,4±2 a
TPP	68,2±13 a	4,0±2 a
CV (%)	25,8	46,9

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$; Casboxina+Tiram (0,5 mL para 100 g de semente), ASM - acibenzolar-S-metílico (0,166 g L⁻¹), TPP – taxtomina parcialmente purificada (100 µg equiv. mL⁻¹ de taxtomina).

Nos parâmetros de vigor (PCG) e de germinação foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras inoculadas e não inoculadas, demonstrando o efeito prejudicial do patógeno no processo germinativo de sementes de soja (Tabela 5). Esses resultados corroboram com a literatura, visto que Botelho (2011) verificou que a presença de *S. sclerotiorum* em sementes de soja afetou a germinação proporcionalmente a quantidade de inóculo do fungo, acarretando em 85% de redução da mesma. No entanto, os tratamentos testados não

apresentaram diferença estatística do controle água nas amostras não inoculadas para esses índices (Tabela 5).

Para as amostras inoculadas com *S. sclerotiorum*, tanto para PCG como para germinação, houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5). Os melhores índices para esses parâmetros foram verificados para a amostra tratada com o fungicida Casboxina+Tiram, com aproximadamente 75% de germinação. Enquanto que, as amostras inoculadas e tratadas com TPP e ASM apresentaram reduções em relação a testemunha água de aproximadamente 46% e 54%, respectivamente, nos percentuais de PCG e de germinação (Tabela 5). A combinação da inoculação do fungo somada a esses produtos pode ser prejudicial a germinação das sementes, visto que, os tratamentos ASM e TPP afetaram o vigor das sementes inoculadas, apresentando redução nos percentuais de PCG e germinação, o que não ocorreu nas amostras não inoculadas. Uma possível explicação para esse fato é que a inoculação do fungo na semente pode causar alterações no tegumento e influenciar a permeabilidade do mesmo, favorecendo a penetração mais rápida dos produtos ao interior da semente, acarretando em efeito prejudicial ao embrião. O eixo embrionário é a estrutura mais importante das sementes e, juntamente com os cotilédones, dá origem ao embrião. Os cotilédones são estruturas seminais, ligados ao eixo embrionário, que atuam como tecido de reserva com função de absorver e reservar alimentos do endosperma e/ou perisperma, usados durante a germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; MARCOS FILHO, 2005). O uso de sementes de má qualidade ou infectadas por fitopatógenos pode gerar problemas desde a germinação até a colheita, afetando o vigor e o desempenho das mesmas.

Estudos anteriores já vêm associando a qualidade fisiológica e sanitária das sementes e os aspectos anatômicos do tegumento. Em análises de células ultraestruturais, Botelho (2011) observou o efeito negativo de *S. sclerotiorum* nas células do eixo embrionário, nas camadas de células paliçádicas, nas células em ampulheta e no parênquima lacunoso em sementes de soja infectadas com esse patógeno. O autor também constatou alterações na parede celular com o aumento da incidência de *S. sclerotiorum*, além de verificar altos valores de condutividade elétrica e redução do volume celular, o que pode estar correlacionado com a ruptura da membrana celular e conseqüente lixiviação do conteúdo citoplasmático.

De acordo com Bewley; Black (1994), as sementes danificadas possuem a absorção de água mais rápida, o que pode ser associado a maior permeabilidade das membranas. Tal fato sugere que os efeitos prejudiciais do patógeno na semente somado ao tratamento com a fitotoxina taxtamina A pode ser a causa da redução do potencial germinativo das sementes de

soja. Estudos relatam que sementes de soja com menor qualidade fisiológica apresentam maior absorção de água (COSTA et al., 2002; SILVA; VILLELA, 2011).

Na literatura, trabalhos expõem o aumento na suscetibilidade de sementes de baixo vigor a toxicidade dos produtos químicos empregados no tratamento de sementes, podendo ocasionar redução no percentual de plântulas normais (BRZEZINSKI et al., 2015). Ademais, Brzezinski et al. (2017) verificaram que sementes de soja tratadas quimicamente exibiram menor crescimento de raízes e parte aérea.

Tabela 5. Efeito de diferentes tratamentos (T) nos parâmetros de vigor (primeira contagem da germinação - PCG) e de germinação de sementes de soja não inoculadas (NI) e inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* (CI).

T	PCG (%)			Germinação (%)		
	NI	CI	$\bar{x}T$	NI	CI	$\bar{x}T$
Água	89±2 A a*	63±7 B b*	76,5 b*	91±1 A a*	64±6 B b*	77,5 b*
C+T	90±2 A a	75±4 B a	82,5 a	92±2 A a	77±5 B a	84,5 a
ASM	90±4 A a	29±3 B c	59,5 d	95±2 A a	29±3 B c	61,7 c
TPP	95±2 A a	34±3 B c	64,5 c	95±2 A a	34±3 B c	64,7 c
$\bar{x}I$	91,1 A	50,2 B		93,2 A	51,0 B	
CV (%)		4,7			4,97	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$; C+T: Casboxina+Tiram (0,5 mL para 100 g de semente); ASM - acibenzolar-S-metílico (0,166 g L⁻¹), TPP – taxtomina purificada parcialmente (100 µg equiv. mL⁻¹ de taxtomina); $\bar{x}T$: médias dos tratamentos; $\bar{x}I$: médias das amostras não inoculadas e inoculadas.

Para os parâmetros de emergência, sobrevivência e IVE das plântulas de soja foi verificado efeito significativo entre as amostras inoculadas e não inoculadas com *S. sclerotiorum* (Tabela 6). Para esses dois primeiros, os tratamentos não apresentaram diferença estatística do controle água, em nenhuma das amostras, ou seja, o fator tratamento não foi significativo. Além disso, não houve interação significativa entre os fatores presença do fungo e tratamentos para nenhum dos parâmetros analisados.

Para o índice de velocidade de emergência houve efeito significativo entre os tratamentos aplicados. O tratamento das sementes com TPP apresentou o maior índice, diferindo estatisticamente de Casboxina+Tiram e ASM. Para matéria fresca não houve diferença estatística em relação ao fator presença de patógeno na amostra e tão pouco quanto aos tratamentos aplicados. Enquanto que, o índice de matéria seca demonstrou efeito significativo entre as amostras inoculadas e não inoculadas com *S. sclerotiorum*, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 7).

A presença de fitopatógenos restringe o potencial fisiológico e a qualidade sanitária de sementes. Além disso, sua ocorrência pode ser associada a redução do poder germinativo e menor desenvolvimento de plântulas ou ainda, causar a morte das sementes antes dessas iniciarem o processo germinativo (BARBOSA et al., 2013; MUNIZ et al., 2004; VENTUROSIO et al., 2015). Na literatura há diversos trabalhos que relatam o efeito negativo de fitopatógenos na qualidade sanitária e fisiológica de sementes (BOTELHO et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2017; HADDAD et al., 2017; VENTUROSIO et al., 2015). Com isso, recomenda-se o uso de sementes tratadas com agentes de biocontrole, com a finalidade de reduzir a transmissão de doenças via sementes, permitindo a germinação uniforme das sementes e o estabelecimento das plântulas. Para a cultura da soja, estes fatores interferem na uniformidade e densidade de plantas no campo, afetando diretamente a produtividade final (CORRÊA et al., 2008; MOSHTAGHI-KHAVARAN; KHOMARI; ZARE, 2014; SINGH; ALI; CHAUHAN, 2009).

Tabela 6. Efeito de diferentes tratamentos (T) em plântulas de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com *Sclerotinia sclerotiorum*.

T	Emergência (%)			Sobrevivência (%)			IVE		
	NI	CI	$\bar{x}T$	NI	CI	$\bar{x}T$	NI	CI	$\bar{x}T$
Água	93±3	75±13	83* ^{ns}	92±4	75±13	84* ^{ns}	34±1	21±7	28 * ^{ab}
C+T	87±6	79±12	83	87±8	79±12	83	30±4	22±5	25 b
ASM	85±6	73±7	79	85±6	73±7	83	28±4	23±3	26 b
TPP	91±7	87±4	89	91±6	87±4	79	34±4	30±2	32 a
$\bar{x}I$	89 A	78 B		89 A	77 B		31 A	24 B	
CV (%)		9,5			9,7			15,3	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$; C+T: Casboxina+Tiram (0,5 mL para 100 g de semente); ASM: Acibenzolar-S-metílico (0,166 g L⁻¹), TPP – taxtomina parcialmente purificada (100 µg equiv. mL⁻¹ de taxtomina); $\bar{x}T$: médias dos tratamentos; $\bar{x}I$: médias das amostras não inoculadas e inoculadas.

Tabela 7. Efeito de diferentes tratamentos (T) na matéria fresca e na matéria seca de plântulas de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com *Sclerotinia sclerotiorum*.

T	Matéria fresca (g)			Matéria seca (g)		
	NI	CI	$\bar{x}T$	NI	CI	$\bar{x}T$
Água	2,2±3	2,0±13	2,1* ^{ns}	0,16±4	0,16±13	0,16* ^{ns}
C+T	2,0±6	2,0±12	2,0	0,15±8	0,15±12	0,17
ASM	2,0±6	2,0±7	2,0	0,16±6	0,16±7	0,17
TPP	2,3±7	2,1±4	2,2	0,15±6	0,17±4	0,16
$\bar{x}I$	2,1* ^{ns}	2,0		0,17 A	0,16 B	
CV (%)		10,9			9,7	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$; C+T: Casboxina+Tiram (0,5 mL para 100 g de semente); ASM: Acibenzolar-S-metílico (0,166 g L⁻¹), TPP – taxtomina parcialmente purificada (100 µg equiv. mL⁻¹ de taxtomina); $\bar{x}T$: médias dos tratamentos; $\bar{x}I$: médias das amostras não inoculadas e inoculadas.

As sementes de soja não inoculadas apresentaram os melhores resultados para os percentuais de germinação, emergência, sobrevivência, IVE e matéria seca em relação as amostras inoculadas com *S. sclerotiorum*. O tratamento com o fungicida Casboxina+Tiram apresentou o menor percentual de incidência e maior percentual de germinação em sementes inoculadas com o patógeno, no entanto, não houve diferença para os demais parâmetros analisados. As sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com TPP não diferiram da testemunha para os parâmetros de sanidade, vigor, germinação, emergência, sobrevivência, matéria seca e fresca. Entretanto, as sementes tratadas com TPP apresentaram velocidade de emergência superior ao tratamento com fungicida.

2.3.6. Produção da fitoalexina gliceolina

Em soja, a fitotoxina taxtomina A e o produto comercial Bion® não foram capazes de induzir a produção de fitoalexinas em relação ao controle água, ou seja, ambos os tratamentos não apresentam diferença estatística quando comparados ao controle negativo (Tabela 8). Ademais, todos os tratamentos diferiram do controle positivo *S. cerevisiae*, o qual apresentou um incremento de aproximadamente 98% na produção de gliceolina em relação a água.

Os resultados demonstram que a TPP não apresentou indução da síntese de gliceolina, no entanto, essa fitotoxina pode ser capaz de ativar outros mecanismos de defesa que podem explicar seu efeito contra agentes patogênicos. Dentre os mecanismos pós-formados tem-se as espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), sendo que cada interação planta-patógeno pode apresentar uma participação menor ou maior de

determinadas respostas de defesa, variando com a idade e a condição de desenvolvimento da planta (PASCHOLATI; DALIO, 2018b).

A produção de fitoalexinas é um mecanismo de defesa das plantas, ausente ou presente em concentrações muito baixas antes da infecção. São metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixa massa molecular e sintetizadas pelas plantas devido a estresses físicos, químicos ou biológicos, com potencial de reduzir ou inibir a atividade de fitopatógenos. Esses compostos atuam por meio da granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas extracelulares microbianas (PASCHOLATI; DALIO, 2018b).

Em trabalhos realizados por Garcia (2008) verificou-se atividades elevadas das enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase em plantas de sorgo e maior acúmulo de fitoalexinas, após o tratamento com a taxtomina A. Portanto, a ativação desses mecanismos de defesa indicam o potencial da fitotoxina taxtomina A como um agente eliciador de resistência nas plantas.

Tabela 8. Síntese da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja tratados com água, *Saccharomyces cerevisiae*, acibenzolar-S-metilíco (ASM) ou taxtomina parcialmente purificada (TPP).

Tratamento	Gliceolina (Abs ⁻¹ g massa fresca)
Água (testemunha)	0,6±0,2 b*
<i>S. cerevisiae</i>	2,1±0,02 a
ASM	0,5±0,2 b
TPP	0,6±0,1 b
CV(%)	16,02

*Dados transformados ($\text{dados}^{\wedge}\{0.5\}$); Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com 1% de significância; $\bar{x} \pm DP$.

2.4. Conclusões

As diferentes concentrações de taxtomina parcialmente purificada filtrada (TPPF) causam reduções significativas no IVCm e PIC, com inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* de 46% e 61%, para as concentrações de 20 e 40 $\mu\text{g equiv. mL}^{-1}$ de taxtomina, respectivamente. Ademais, é possível confirmar o comportamento termolábil dessa fitotoxina.

A TPP ocasiona 70% de redução na severidade do mofo branco em relação ao controle água em plantas de soja mantidas em casa de vegetação. No entanto, essa fitotoxina não é capaz de induzir a produção de fitoalexina em cotilédones de soja e também não apresenta efeito

significativo na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum*.

Referências

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier: Academic Press, 2005. p. 922.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. V. 1. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda., 2018. p. 46–68.
- BABCOCK, M. J.; ECKWALL, E. C.; SCHOTTEL, J. L. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1579–1586, 1993.
- BARBOSA, R. M. et al. Chemical control of pathogens and the physiological performance of peanut seeds. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 11, n. 2, p. 322–326, 2013.
- BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n. 1, p. 88–98, 2001.
- BEAUSÉJOUR, J. et al. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. **Can J Microbiol**, v. 45, p. 764–768, 1999.
- BEWLEY, J.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. p. 445.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- BOTELHO, L. da S. et al. Desempenho de sementes de feijão infectadas pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p. 153–160, 2013.
- BOTELHO, L. S. **Deteção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. 156p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- BRAND, S. C. **Taxtomina A e *Piriformospora indica* no controle de *Phytophthora nicotianae* em citros e *Phytophthora plurivora* em faia (*Fagus sylvatica*)**. 2016. 137p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009.

- BRZEZINSKI, C. R. et al. Seeds treatment times in the establishment and yield performance of soybean crops. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 2, p. 147–153, 2015.
- BRZEZINSKI, C. R. et al. Spray volumes in the industrial treatment on the physiological quality of soybean seeds with different levels of vigor. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 2, p. 174–181, 2017.
- CARLILE, M. L.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. Fungal cells and vegetative grow. In: CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. (Ed.). **The Fungi**. 2. ed. London: Academic Press, 2001. p. 85–184.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes - Ciência, Tecnologia e Produção**. 5. ed. Jaboticabal, SP: Funesp, 2012. p. 590.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Nono levantamento, junho 2019 – safra 2018/2019. **CONAB**, v. 6, n. 9, p. 19, 2019. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>.
- CORRÊA, B. O. et al. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 156–163, 2008.
- COSTA, G. R.; COSTA, L. J. S. Influência do solo e de substratos para a produção de escleródios na germinação carpopogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 2, p. 83–87, 2006.
- COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO), 1996. p.233.
- COSTA, J. A. et al. Soybean varieties differ in the velocity of water absorption. **Scientia Agraria**, v. 3, n. 1, p. 91–96, 2002.
- COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1023–1030, 2003.
- DUAN, Y. et al. Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 1–2, p. 61–67, 2013.
- ELSHARBINY, E. A.; TAHER, M. A. Silicon induces resistance to postharvest rot of carrot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and the possible of defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v. 140, p. 11–17, 2018.
- ERRAKHI, R. et al. An early Ca^{2+} influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 15, p. 4259–4270, 2008.

- GARCIA, E. O. **Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo (*Sorghum bicolor*): aspectos bioquímicos e ultraestruturais**. 2008. 93p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- GODOY, C. V. et al. Doenças da soja. In: AMORIM, L. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. V. 2. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda, 2016. p. 810.
- GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. **Eur J Plant Pathol**, v. 121, p. 233–242, 2008.
- GOYER, C.; VACHON, J.; BEAULIEU, C. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. **Phytopathology**, v. 88, n. 5, p. 442–445, 1998.
- GUIMARÃES, M. D. R. F. et al. Evaluation of inoculum potential of pathogens in seeds: relation to physiological quality and DNA quantification by qPCR. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 3, p. 224–233, 2017.
- HADDAD, P. E. et al. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesq. agropec. bras**, v. 52, n. 12, p. 1140–1148, 2017.
- HAHN, M. G.; ALBERSHEIM, P. Host-Pathogen Interactions. **Plant Physiol**, v. 62, p. 107–111, 1978.
- HAMMERSCHMIDT, R. Introduction: definitions and some history. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced Resistance for Plant Defence**. 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p. 269.
- ISHIGA, T. et al. Acibenzolar-S-methyl activates stomatal-based defense against *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* in cabbage. **Journal of General Plant Pathology**, v. 86, n. 1, p. 48–54, 2020.
- JOGLEKAR, S. et al. Chemical activation of EDS1/PAD4 signaling leading to pathogen resistance in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 8, p. 1592–1607, 2018.
- JULIO, V. A. **Manejo de mofo branco na cultura da soja**. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/blog/119/manejo-de-mofo-branco-na-cultura-da-soja>>. Acesso em: 22 nov. 2019.
- JUNIOR, G. J. S.; BEHLAU, F. Controle Químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino - MG: Agronômica Ceres Ltda., 2018. p. 239–120.

- JUNIOR GRAF, A. L. **Uso de óleos essenciais como controle alternativo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary**. 2018. 42p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia). Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2018.
- KATZ, V. A.; THULKE, O. U.; CONRATH, U. A Benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. **Plant Physiology**, v. 117, n. 4, p. 1333–1339, 1998.
- KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 1046–1056, 2002.
- LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e na síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 118p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- LEITE, R. M. V. B. de C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Embrapa soja - Comunicado Técnico**, p. 1–3, 2005.
- LERAT, S. et al. *Streptomyces scabies* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Rep**, v. 28, p. 1895–1903, 2009.
- LIBERATO, J. R. **Desenvolvimento e avaliação do software Quant para quantificação de doenças de plantas por análises de imagens**. 2003. 126p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.
- LORIA, R. et al. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces species* *in vitro*. **Phytopathology**, v. 85, n. 5, p. 537–541, 1995.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176–177, 1962.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Lista de pragas não-quarentenárias regulamentadas por cultura. **Portaria N° 47, de 26 de fevereiro de 2009**, p. Anexo I, 2009.
- MARCELINO, W. L. **Potencial da taxtomina parcialmente purificada no controle de *Colletotrichum truncatum* e reação de cultivares de soja ao patógeno**. 2019. 75p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba -SP: FEALQ, 2005. p. 495.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, A.; REZENDE, J. A. M.; BERMAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. V. 1. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p. 261–272.

MEYER, M. C. et al. Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo-branco na cultura da soja - safras 2012 a 2015. **Embrapa Soja**, v. 368, n. 2176–2937, p. 1–49, 2016.

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

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D. Guerra ao mofo. **Revista Cultivar**, p. 16–18, 2009. Disponível em: <www.revistacultivar.com.br>.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. 1981.

MOSHTAGHI-KHAVARAN, A.; KHOMARI, S.; ZARE, N. Soybean seed germination and seedling growth in response to deterioration and priming: effect of seed size. **Plant Breed Seed Sci**, v. 70, p. 55–67, 2014.

MUNIZ, M. F. B. et al. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 144–149, 2004.

OLIVERIA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 1991. 131p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. V.1. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p. 424–450.

PAULA, S. **Taxtomina parcialmente purificada e preparações de *Streptomyces scabies* na indução de resistência em soja à *Phakopsora pachyrhizi***. 2019. 100p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

PINTO, L. R. **Taxtomina A no controle dos vírus do mosaico do pepino e do mosaico amarelo em abobrinha de moita e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em uva**. 2014. 63p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

- PRANDO, M. B. **Efeito do tratamento químico na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum***. 2014. 68p. Dissertação (Mestrado em Proteção de plantas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu 2014.
- R Core Team**. Vienna, Austria, 2019. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.
- RESENDE, M. L. V. et al. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra fitopatógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 14, p. 129–198, 2006.
- SANTOS, H. A. A. et al. Phosphites and acibenzolar-S-methyl alone and combined with fungicides for the control of biotrophic pathogens of wheat. **Summa Phytopathol**, v. 44, n. 2, p. 132–136, 2018.
- SARAN, P. E. **Manual de identificação das doenças da soja**. 2013. Coletânea FMC, 2013. p. 200.
- SAS User’s Guide**. North CarolinaCary: SAS Institute Inc, 2001.
- SCHEIBLE, W.-R. et al. An Arabidopsis mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1781–1794, 2003.
- SILVA, K. R. G.; VILLELA, F. A. Pré-hidratação e avaliação do potencial fisiológico de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 2, p. 331–345, 2011.
- SINGH, N. I.; ALI, S.; CHAUHAN, J. S. Effect of seed size on quality within seed lot of pea and correlation of standard germination, vigour with field emergence test. **Nat Sci**, v. 7, p. 72–78, 2009.
- SIQUEIRA, I. T. D. et al. Indução de resistência por acibenzolar-S-metil em feijão caupi no controle da antracnose. **Summa Phytopathol**, v. 45, n. 1, p. 76–82, 2019.
- SOUZA, R. C. P.; LOBO JUNIOR, M.; SOARES, G. C. M. Efeito de fungicidas para controle de mofo branco em sementes de feijão para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Documentos, IAC, Campinas**, v. 85, p. 769–771, 2008.
- TEGG, R. S. et al. Plant cell growth and ion flux responses to the Streptomyceete phytotoxin thaxtomin A: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 4, p. 638–648, 2005.
- TOKUNAGA, Y.; KEON, J. P. R.; HARGREAVES, J. A. Benzothiadiazole-actived defence gene expression and disease resistance in barley. In: LYR, H.; RUSSEL, P. E. H. W.; SISLER, D. H. D. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds II: 12th International Reinhardsbrunn Symposium**. Friedrichroda, Thuringia, Germany: Intercept, 1998. p. 403–409.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. Quant-A software for plant disease severity assessment. In: 8.18, Christchurch, New Zealand. **Anais...** Christchurch, New Zealand: Congress of Plant Pathology, 2003.

VENTUROSOSO, L. R. et al. Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 788–793, 2015.

XU, C. et al. Activity of a novel strobilurin fungicide benzothiofostrobilin against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 32–38, 2014.

ZAZZERINI, A.; TOSI, L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 415–421, 1985.

3. PREPARAÇÕES DE *Lentinula edodes* NO CONTROLE DO MOFO BRANCO DA SOJA

RESUMO

O mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das doenças que tem causado perdas significativas na cultura da soja. Estudar compostos com potencial no controle alternativo é de suma importância no manejo da doença. Dentre esses, pode-se destacar o cogumelo *Lentinula edodes* como potencial agente de controle biológico e/ou indutor de resistência de plantas. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de filtrados de *L. edodes*: filtrado do basidiocarpo (FBASI); filtrado do micélio de 30 dias de idade (FMIC30) e filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade no controle de *S. sclerotiorum* em soja. Essas preparações foram testadas *in vitro*, na redução do índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e no percentual de inibição do crescimento micelial (PIC), pelo método de incorporação em meio fundente. Na germinação miceliogênica e carpogênica dos escleródios, sendo essa primeira em placas de Petri contendo meio de cultivo e a última em caixas do tipo gerbox contendo substrato e na permeabilidade da membrana plasmática de *S. sclerotiorum*, por meio da condutividade elétrica do micélio tratado. Estudos também foram conduzidos *in vivo* na severidade do mofo branco em plantas de soja em casa de vegetação, onde realizou-se a aplicação das preparações e após 24 horas fez-se a inoculação com *S. sclerotiorum*, sendo posteriormente avaliado o potencial dos filtrados na redução da severidade. Assim como, foi verificado seu efeito na qualidade sanitária e fisiológica de sementes, por meio de testes de sanidade, germinação e emergência de plântulas e na produção da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja. Como resultado, observou-se que os filtrados FBASI e FSM30 possuem efeito direto sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, com inibições de até 75% e 60%, respectivamente, para as concentrações mais altas. Os filtrados FBASI, FMIC30 e FSM30 proporcionaram um aumento na condutividade elétrica das hifas do patógeno em 43%, 77% e 57%, respectivamente, aos 360 segundos em relação ao controle água, indicando uma possível alteração da permeabilidade seletiva da membrana plasmática. Além disso, foram capazes de reduzir aproximadamente em 60% a severidade do mofo branco em soja e proporcionaram um aumento na síntese de gliceolina em cotilédones de soja. Contudo, os filtrados de *L. edodes* não apresentaram efeito na qualidade sanitária e fisiológica de sementes. Conclui-se que os filtrados do basidiomiceto *L. edodes* apresentam efeito direto sobre o patógeno *S. sclerotiorum* e potencial como agentes de controle alternativo, possibilitando um manejo mais eficiente da doença.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*; Shiitake; *Glycine max*; Indução de resistência

ABSTRACT

***Lentinula edodes* preparations in the control of white soybean mold**

White mold, caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, is one of the diseases that has caused significant losses in soybean. Studying compounds with potential for alternative control is of importance in the management of the disease. Among these, the *Lentinula edodes* mushroom can be pointed out as a potential biological control agent and / or inducer of plant resistance. This study aimed to evaluate the potential of *L. edodes* filtrates: basidiocarp filtrates (FBASI); filtrates from the 30-day-old mycelium (FMIC30) and filtrates from the 30-day-old mycelial suspension in the control of *S. sclerotiorum* in soybean. These preparations were tested *in vitro*, in the reduction of the mycelial growth rate index (MGRI) and in the percentage of mycelial growth inhibition (MGI), by the melt incorporation method. In myceliogenic germination and sclerotia carpogenicity, the former in Petri dishes containing culture medium and the latter in gerbox type boxes containing substrate and in the permeability of the *S. sclerotiorum* plasma membrane, through the electrical conductivity of the treated mycelia. Studies were also carried out *in vivo* on the severity of white mold in soybean plants in a greenhouse, where the treatments were applied and after 24 hours, inoculation with *S. sclerotiorum* was carried out, and the potential of the filtrates to reduce the severity was subsequently evaluated. As well as their effects on the sanitary and physiological quality of seeds, through tests of sanity, germination and emergence of platelets and on the production of the phytoalexin gliceolin in soybean cotyledons. As a result, it was observed that the FBASI and FSM30 filtrates had a direct effect on the mycelial growth of *S. sclerotiorum*, with inhibition up to 75% and 60%, respectively, at the highest concentrations. The filtrates FBASI, FMIC30 and FSM30 provided an increase in the electrical conductivity of the pathogen mycelium around 43%, 77% and 57%, respectively, in relation to the water control, at 360 seconds, indicating a possible change in plasma membrane permeability. In addition, they were able to reduce approximately 60% of the severity of white mold in soybeans and provided an increase in the synthesis of gliceolin in soybean cotyledons. However, *L. edodes* filtrates had no effect on seed health and physiology. It is concluded that the filtrates of the basidiomycete *L. edodes* have a direct effect on the pathogen *S. sclerotiorum* and exhibit potential as alternative control agents, enabling a more efficient management of the disease.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*; Shiitake; *Glycine max*; Induced resistance

3.1. Introdução

A cultura da soja (*Glycine max* (Linnaeus) Merrill) possui grande importância no agronegócio mundial e, sobretudo, para a economia brasileira, uma vez que o Brasil é o segundo maior produtor do grão (USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE,

2019). Reduções significativas na produtividade decorrem principalmente das doenças, as quais resultam em perdas de até 100% da produção. Dentre as doenças da cultura da soja, o mofo branco têm apresentado perdas consideráveis quando as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento da doença (JULIO, 2019; LEITE, 2005; MEYER et al., 2019).

O mofo branco pode afetar a cultura da soja no estágio vegetativo e reprodutivo. Inicialmente são observadas lesões aquosas nas plantas, onde crescem as hifas, as quais dão origem a um micélio branco e posterior formação de escleródios (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). O controle do mofo branco da soja é realizado, sobretudo, por meio da aplicação de fungicidas específicos, aplicados principalmente no início do período de floração (GODOY et al., 2016). Contudo, o uso exclusivo do controle químico como forma de controle favorece o surgimento de patógenos resistentes, eleva os custos de produção e também pode causar diversos danos ao meio ambiente, ao homem e animais (AGROFIT, 2019; BARDIN; HUANG, 2001; YORINORI; NUNES JUNIOR; LAZZAROTTO, 2004).

Diante das complicações do controle químico se faz necessário medidas de controle alternativas que sejam eficientes. O tratamento com diversos indutores como microrganismos, fragmentos de células, extratos de plantas, óleos essenciais ou compostos químicos, vêm sendo empregado no controle de doenças, uma vez que podem possuir substâncias em sua composição química com potencial fungicida ou fungistático, além de moléculas eliciadoras (GARCIA et al., 2012).

Dentre as estratégias de controle promissoras pode-se destacar a indução de resistência e o controle biológico. O primeiro é caracterizado pela capacidade de determinada planta atrasar ou evitar a colonização e atividade do patógeno em seu tecido por meio da ativação de mecanismos de defesa latentes presentes nas plantas, como uma resposta ao tratamento de agentes externos, denominados eliciadores. Essas moléculas possuem capacidade de proteção contra infecções subsequentes por patógenos, podendo ser agentes de origem biótica ou abiótica (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; HAMMERSCHMIDT, 2007; PASCHOLATI; DALIO, 2018b). Em resposta aos eliciadores, as plantas podem expressar respostas fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, as quais interferem no desenvolvimento da infecção causada pelo patógeno (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; DALIO, 2018b). Já o controle biológico é caracterizado pela redução da doença por meio de um ou mais microrganismos. O processo doença é resultado da interação entre hospedeiro, patógeno e microrganismos não patogênicos presentes no sítio de infecção. Esses últimos possuem potencial para controlar ou inibir a atividade de patógenos e até mesmo, induzir a resistência do hospedeiro (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Diversos estudos demonstram a eficiência da indução de resistência e do controle biológico na redução da incidência e/ou severidade de doenças. Desse modo, compostos com potencial eliciador vem sendo estudados, dentre eles, os extratos e/ou filtrados de basidiomicetos, os quais podem ser uma alternativa promissora no controle de doenças de plantas devido a produção de diversos metabólitos secundários, os quais apresentam potencial influência em atividades metabólicas como antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, nematocida ou como reguladores de crescimento vegetal (BRIZUELA et al., 1998; HAHN et al., 2019; JARDINE; BARROS, 2015; KAUR et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2019; OYETAYO, 2009; WILLE et al., 2019).

O basidiomiceto *Lentinula edodes* (Berk) Pegler, família Tricholomataceae e ordem Agaricales é um dos 11 cogumelos mais comuns e utilizados em finalidades medicinais, sendo conhecido a mais de mil anos pelo seu alto valor nutricional e sua importância terapêutica (BREENE, 1990; NAPPI, 1998; OOI, 2000; WASSER; WEIS, 1999). Esse cogumelo é cultivado em diversos países e no Japão recebeu o nome popular de “Shiitake”, o qual possui em sua composição aproximadamente 90% de água, 15% de proteínas (matéria seca), 35% de aminoácidos totais (CRISAN; SANDS, 1978) e 83% de carboidratos (matéria seca), dos quais 13% são fibras (BREENE, 1990). Além de produzir compostos fenólicos, como o ácido benzoico e flavonas (LOBANOK et al., 2003). Dentre os componentes do cogumelo, a lentionina, composto sulfatado, presente no basidiocarpo e na biomassa micelial produzida em cultura submersa, pode ser destacada por apresentar forte atividade antibacteriana e antifúngica (DI PIERO, 2003; HATVANI, 2001; ISHIKAWA, KAZUE; KASUYA; VANETTI, 2001). Ademais, outro componente promissor é a lentinana, proteína com ação antifúngica, presente a partir do cultivo líquido de *L. edodes* (NGAI; NG, 2003).

O uso crescente de preparações do cogumelo *L. edodes* no controle de doenças de plantas vem sendo comprovada, tanto por sua ação direta como também por meio da indução de resistência. Tolaine et al. (2010) estudaram o potencial de *L. edodes* no incremento do biocontrole da levedura *Cryptococcus laurentii* no controle de *Penicillium expansum* em pós-colheita de maçãs. Foi constatado que os filtrados de *L. edodes* apresentam efeito significativo no crescimento da levedura e na atividade de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX). Ademais, o filtrado do cogumelo apresentou efeito na germinação de conídios de *P. expansum* e, quando utilizado em conjunto com a levedura demonstrou maior inibição do crescimento do patógeno e da produção de patulina em maçãs feridas. Em demais trabalhos foi comprovado o efeito significativo de preparações de *L. edodes* no manejo de doenças. Wang et al. (2013) observaram que o uso desse cogumelo foi eficaz na inibição da

podridão do mofo azul em frutos de maçã e a sua combinação com a levedura *Pichia membranefaciens* resultou em menor diâmetro da lesão e incidência da doença.

Filtrados de *L. edodes* possuem compostos com atividade antioxidante, principalmente polissacarídeos, tais como β -glucana. Há relatos que demonstram o efeito desses filtrados no controle de micotoxinas cujas biossíntese está relacionada ao estresse oxidativo. Foi verificado que esses compostos apresentam tanto atividade antioxidante, como capacidade de estimular a atividade de CAT, SOD e GPX de *Aspergillus parasiticus*, fungo produtor de aflatoxina (REVERBERI et al., 2005).

Extratos aquosos do basidiocarpo do cogumelo *L. edodes* reduziram o crescimento micelial e afetaram negativamente a germinação de esporos de *Exserohilum turcicum* e *Colletotrichum sublineolum*. Assim como, o extrato e o composto lentinana reduziram parcialmente a severidade das doenças causadas por esses patógenos em sorgo (PICCININ; DI PIERO; PASCHOLATI, 2010).

Este trabalho teve como objetivos verificar: a) *in vitro* - o efeito de preparações de *L. edodes* no crescimento micelial e na germinação miceliogênica; b) *in vivo* – o efeito de preparações de *L. edodes* na severidade do mofo branco em plantas de soja em casa de vegetação, na qualidade sanitária e fisiológica de sementes e na produção de gliceolina em cotilédones dessa leguminosa.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Obtenção de plantas de soja

Sementes de soja foram semeadas em vasos com capacidade de 3 L, contendo substrato (Basaplant: turfa, corretivos, vermiculita, carvão vegetal e casca de *Pinus*). Foram mantidas três plantas por vaso em estágio V3 de desenvolvimento, as quais permaneceram em casa de vegetação no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP), em ambiente e temperatura parcialmente controladas. A cultivar utilizada foi a DS5916IPRO, com habito de crescimento indeterminado, grupo de maturação de 6.1, tolerante ao acamamento e suscetível a *S. sclerotiorum*.

3.2.2. Obtenção e cultivo do isolado de *S. sclerotiorum*

O isolado de *S. sclerotiorum* utilizado foi obtido da micoteca do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ-USP. O isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) em câmaras de crescimento tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a 21 °C e fotoperíodo de 12 horas luz. Colônias de quatro dias de idade foram utilizadas nos experimentos.

3.2.3. Obtenção e cultivo do isolado de *L. edodes*

O isolado de *L. edodes* (LE9622) foi obtido da micoteca do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ-USP. O isolado foi cultivado em meio BDA e incubado em B.O.D a 21 °C no escuro. Foram utilizadas colônias de 14 dias de idade nos ensaios realizados.

Os basidiocarpos de *L. edodes* foram produzidos por uma produtora comercial, cuja propriedade situa-se no município de São Pedro – SP, em parceria com o Professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati. Nesse caso foi utilizado o isolado da própria produtora (FL019), o qual foi cultivado em mistura pronta de pó de cerra de *Eucalypto* sp., farelo de trigo, calcário e carvão em pó. Após sua produção, os cogumelos foram colhidos, secos a 65 °C, moídos em moinho de laminas, marca Marconi - modelo TE9400 e peneira com crivos de 1 mm.

3.2.4. Preparo dos tratamentos utilizados

3.2.4.1. Controle negativo

Foi utilizado água destilada autoclavada como controle negativo.

3.2.4.2. Meio GPL sem *L. edodes*

O meio GPL (Glicose-Peptona-Extrato de levedura) foi composto por 20 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de peptona e 2 g L⁻¹ de extrato de levedura.

3.2.4.3. Filtrado da suspensão micelial de *L. edodes* (FSM30)

Para a obtenção do FSM, foram depositados 4 discos miceliais de *L. edodes* do isolado LE9622 de 5 mm de diâmetro em frascos contendo 50 mL de meio GPL. Esses permaneceram em agitação durante 30 dias a ± 25 °C no escuro. Posteriormente, a suspensão micelial foi submetida ao método de separação de misturas a vácuo em funil de Buchner com filtro de 0,40 μm para realizar a filtração. O sobrenadante obtido passou por uma nova filtração em membrana tipo Millipore de 0,22 μm , o qual foi armazenado a -6 °C em condições assépticas. Nos experimentos realizados utilizando-se o filtrado FSM30 será adotado o meio GPL como controle (*item 2.2.4.2*).

3.2.4.4. Filtrado do micélio de *L. edodes* (FMIC30)

O micélio resultante da suspensão micelial de *L. edodes* de 30 dias de idade (*item 2.2.4.3*) foi conservado em temperatura ambiente por 96 horas até atingir peso constante. A biomassa fúngica resultante foi triturada em almofariz e N₂ líquido, sendo que o pó resultante foi suspenso na proporção de 1 g para 14 mL de água destilada esterilizada e incubado por 24 horas a 4 °C no escuro (DI PIERO, 2003). Posteriormente, o material foi submetido ao método de separação de misturas a vácuo em funil de Buchner com filtro de 0,40 μm e o sobrenadante obtido passado em membrana tipo Millipore de 0,22 μm . O filtrado (FMIC30) resultante desse processo foi armazenado a -6 °C em condições assépticas.

3.2.4.5. Filtrado do basidiocarpo de *L. edodes* (FBASI)

Para a obtenção do filtrado do basidiocarpo, o pó seco do basidiocarpo, obtido conforme o *item 2.2.3*, foi hidratado na proporção de 1:14 (p:v) e incubado no escuro a 4 °C. Após 24 horas, o material foi centrifugado a 12.000 g por 20 min e o sobrenadante submetido ao método de separação de misturas a vácuo em funil de Buchner com filtro de 0,40 μm , sendo realizado uma nova filtração em membrana tipo Millipore de 0,22 μm e mantido em condições assépticas.

3.2.4.6. Acibenzolar-S-metílico

Para o tratamento com acibenzolar-S-metílico utilizou-se o indutor de resistência comercial (Bion[®] 50 WG – Syngenta), na concentração de trabalho de 0,166 g L⁻¹. Sendo essa baseada na recomendação para a cultura do feijão, com volume de calda de 150 L ha⁻¹.

3.2.4.7. Fungicida

Para o tratamento com fungicida foi utilizado a iprodiona (500 g L⁻¹ i.a) (Rovral[®] - FMC), na concentração de trabalho de 5 mL L⁻¹, considerando a concentração de 300 L ha⁻¹ e volume de calda de 1,5 L ha⁻¹.

3.2.5. Efeito *in vitro* dos filtrados de *L. edodes* sobre *S. sclerotiorum*

3.2.5.1. Crescimento micelial

Para verificar o efeito do cogumelo sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, foram incorporadas as preparações em meio de cultivo BDA fundente. Após a solidificação do meio, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram transferidos para o centro de placas de Petri (90 mm de diâmetro), as quais foram mantidas em BOD a 21 °C e fotoperíodo de 12h luz.

Foram realizadas medições diárias do diâmetro das colônias em duas regiões ortogonais, com o auxílio de um paquímetro digital durante dois dias (quando pelo menos uma das colônias alcançou os bordos da placa). As médias obtidas foram aplicadas no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial IVCM (mm dia⁻¹), descrita por Oliveira (1991): $TCMD = \sum(D - D_a) / N$, onde D=diâmetro médio atual da colônia, D_a=diâmetro médio da colônia no dia anterior e N=número de dias.

Os tratamentos utilizados foram os filtrados do cogumelo FBASI e FMIC30 nas concentrações 0, 5, 10, 20, 40 e 80%, o filtrado FSM30 e o meio GPL como controle desse último, ambos nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 40 e 80%, sendo a dose 0% apenas o meio de cultivo BDA em água destilada esterilizada. Os ensaios foram repetidos duas vezes em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento e, os resultados obtidos analisados via modelo de regressão ($P \leq 0,05$) pelo software R (“R Core Team”, 2019).

3.2.5.2. Permeabilidade da membrana plasmática

Para o presente ensaio foram utilizadas colônias de *S. sclerotiorum* de quatro dias de idade, onde placas de Petri contendo meio de cultivo foram cobertas com papel celofane e sobre este foram transferidos discos miceliais do patógeno (*item 2.2.2*). Para verificar o efeito dos filtrados sobre a permeabilidade da membrana celular as colônias do fungo foram expostas aos respectivos tratamentos durante 30 min, sendo que após esse período o micélio foi coletado e transferido para Becker contendo 50 mL de solução de sacarose 0,2 M. As leituras de condutividade elétrica foram realizadas a cada 10 segundos durante 360 segundos com auxílio de condutivímetro (HI 9043, Hanna Instruments), com o intuito de detectar a perda de eletrólitos dos micélios tratados. Os resultados foram expressos em mS.g micélio⁻¹.

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os tratamentos utilizados foram o controle água destilada esterilizada, FBASI 80%, FSM30 80% e por fim o meio GPL 80%, como controle para esse último filtrado. Os dados obtidos foram analisados via modelos mistos ($P \leq 0,05$) no software Statistical Analysis System (SAS®) (“SAS User’s Guide”, 2001).

3.2.5.3. Germinação miceliogênica dos escleródios

Para a produção de escleródios, o isolado de *S. sclerotiorum* foi cultivado conforme o *item 2.2.2.*, sendo posteriormente transferidos dois discos miceliais de 0,5 mm de diâmetro para 100 g de cenoura picada, autoclavada em Erlenmeyers, mantendo-os a 21 °C e fotoperíodo de 12h luz (COSTA; COSTA, 2006; ZAZZERINI; TOSI, 1985). Após 30 dias, os escleródios produzidos foram lavados em água destilada esterilizada, secos em câmara de fluxo e passados em peneira de 0,20 mesh, com abertura de 0,841mm para padronização.

Os escleródios foram desinfestados superficialmente em álcool 70% por 30 seg, hipoclorito de sódio 2% por 3 min, lavados três vezes em água destilada esterilizada e secos em papel filtro esterilizado. Os escleródios permaneceram submersos nos tratamentos durante 24 h, posteriormente os escleródios dos respectivos tratamentos foram coletados, secos em papel filtro esterilizado e desinfestados novamente, como descrito acima e, então, foram transferidos 6 escleródios por placa de Petri contendo meio de cultivo BDA. Após quatro dias de incubação a 21 °C e fotoperíodo de 12h luz foi verificado o número de escleródios germinados.

Para verificar o efeito de preparações do cogumelo na germinação miceliogênica foram utilizados os filtrados concentrados FSM30, FMIC30, FBASI, água destilada esterilizada

e o meio de cultivo GPL, como controle para o FSM30. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e cinco repetições. Os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) no software R (“R Core Team”, 2019).

3.2.5.4. Germinação carpogênica dos escleródios

Os escleródios de *S. sclerotiorum* foram produzidos e desinfestados conforme descrito no item 2.2.2.5.3. Para se verificar o efeito de *L. edodes* na germinação carpogênica dos escleródios foram utilizadas as concentrações 0, 5, 10, 20 e 40% de FSM30. Em caixas do tipo gerbox foram colocados 100g de substrato Basaplant autoclavado, umedecido, sendo que na sequência foram enterrados 20 escleródios - a 1 cm de profundidade – de maneira equidistantes e incubados em BOD a 21 °C e fotoperíodo de 12h luz. O tratamento foi realizado semanalmente por meio da aplicação de 10 mL das diferentes concentrações.

A germinação foi determinada pela contagem, em intervalos de 5 dias, dos escleródios que emitiram apotécios. A avaliação foi realizada até a estabilização do número de estruturas germinadas, aos 60 dias após a instalação do experimento. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado pelo cálculo: $IVG = N1 / D1 + N2 / D2 + \dots + Nn / Dn$, onde: IVE = índice de velocidade de germinação de escleródios; N= número de escleródios germinados do dia anterior até o dia da contagem atual; D = número de dias da instalação do ensaio da primeira à última contagem. A porcentagem de inibição da germinação foi registrada na última contagem, após a estabilização do número de escleródios germinados, pelo cálculo: $IGC (\%) = 100 - (G \times 100 / C)$, onde G= número de escleródios germinados carpogênicamente nos tratamentos, C= número de escleródios germinados carpogênicamente no controle (ELSHERBINY; TAHER, 2018).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 2 tratamentos, cada um com 5 concentrações e cinco repetições. Os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA), analisados via modelo de regressão e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) no software R (“R Core Team”, 2019).

3.2.6. Efeito *in vivo* dos filtrados de *L. edodes* sobre *S. sclerotiorum*

3.2.6.1. Severidade do mofo branco em plantas de soja mantidas em casa de vegetação

Para se verificar o efeito de preparações do cogumelo na severidade de *S. sclerotiorum*, plantas de soja foram cultivadas conforme descrito em 2.2.1., sendo que, no estágio V3 de desenvolvimento foi realizada a aplicação dos tratamentos (item 2.2.4.), até o ponto de escorrimento. Os tratamentos foram os filtrados FSM30, FBASI e meio GPL nas concentrações de 0, 5, 10, 20 e 40%, a dose 0% consistiu de apenas água destilada esterilizada.

Após 24h foi realizada a inoculação do patógeno utilizando-se discos miceliais de 5 mm de diâmetro de colônias de *S. sclerotiorum* de quatro dias de idade, os quais foram depositados no centro do segundo trifólio de cada planta de soja. As plantas de soja tratadas e inoculadas permaneceram em câmara úmida por seis dias. Em seguida, foi realizada a quantificação da severidade da doença pelo software QUANT, para tal o folíolo central do segundo trifólio de cada planta foi escaneado, a imagem calibrada em 300 DPI de resolução e efetuada a redução de 32 cores (LIBERATO, 2003; VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003).

O experimento foi realizado duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, composta por um vaso com três plantas de soja. Os dados foram analisados via modelo de regressão ($P \leq 0,05$) no software R (“R Core Team”, 2019).

3.2.6.2. Qualidade sanitária e fisiológica das sementes

Sementes de soja da cv TMG 7062 IPRO utilizadas neste ensaio foram previamente submetidas a teste de sanidade para confirmar a ausência de *S. sclerotiorum*. Na sequência, foi realizada a assepsia superficial das sementes com NaClO (1%) por 3 min e secagem em superfície asséptica por 24 horas.

Para realizar a inoculação do patógeno nas sementes foi aplicada a técnica de restrição hídrica, com meio BDA + Manitol -1,0 MPa (COSTA et al., 2003). Colônias de *S. sclerotiorum* de quatro dias de idade foram transferidas para placas de Petri com meio BDA acrescido de Manitol, as quais permaneceram em BOD a 21 °C com fotoperíodo de 12h luz. Após a colonização total da superfície do meio, as sementes de soja foram espalhadas em camada única sobre a colônia fúngica e, então, foram incubadas durante 24 horas a 21 °C e fotoperíodo de 12

horas luz. Decorrido o período de inoculação pelo contato, as sementes foram retiradas das placas e distribuídas em superfície asséptica, durante 24 horas, para secagem. Placas com meio BDA acrescidas de Manitol sem o fungo foram usadas como testemunha. Para a realização dos ensaios foi utilizada uma amostra testemunha, sem o patógeno, e uma amostra com 50% de incidência do fungo nas sementes, ambas as amostras foram tratadas com os respectivos tratamentos.

Para se verificar o efeito de preparações do cogumelo na qualidade sanitária e fisiológica, as sementes foram tratadas com os filtrados brutos FSM30, FMIC30, FBASI, meio GPL, acibenzolar-S-metílico ($0,166 \text{ g L}^{-1}$), Casboxina+Tiram (Vitamax thiram 200 SC[®]) (0,5 mL para 100 g de semente) e água destilada esterilizada como controle negativo. O tratamento das sementes foi realizado utilizando um volume de calda de 0,5% do peso das sementes. De forma que, as amostras de sementes receberam os respectivos tratamentos dentro de sacos plásticos, agitando-as manualmente até ocorrer à homogeneização dos tratamentos sobre as sementes (MORAES, 2020³).

A qualidade sanitária das sementes foi avaliada pelo método do papel de filtro (BRASIL, 2009). Placas de Petri de 90 mm de diâmetro foram forradas com três folhas de papel de filtro, umedecidas com água destilada, e, sobre estas, foram distribuídas 5 sementes. As placas permaneceram em câmara de incubação durante aproximadamente oito dias a $\pm 21 \text{ }^\circ\text{C}$ no escuro. Foram realizadas avaliações a cada dois dias e na última avaliação foi realizado a quantificação do número de escleródios produzidos por placa. O experimento foi realizado com 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por seis placas com cinco sementes cada.

O teste de germinação foi realizado pelo método do rolo de germinação, com base nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), para tal o papel toalha foi umedecido 2,5 vezes o seu peso seco com água destilada e foram distribuídas 25 sementes sobre cada conjunto de papeis, contendo 2 folhas, os quais permaneceram em posição vertical em germinador a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram realizadas avaliações aos cinco e oito dias após a instalação do experimento, para obtenção de porcentagem de plântulas normais (parâmetro de vigor) e (parâmetro de germinação), respectivamente. O experimento foi realizado com oito rolos por tratamento, sendo a média de dois rolos considerada uma repetição, totalizando quatro repetições por tratamento.

³ Comunicação pessoal da Dra. Heloísa Duarte de Moraes (ESALQ/USP).

Para o índice de velocidade de emergência (IVE), estande final e sobrevivência de plântulas, as sementes, inoculadas e não inoculadas, foram distribuídas em caixas plásticas de 21 x 48 x 12 cm (largura x comprimento x altura), contendo substrato Basaplant, totalizando quatro repetições, por tratamento, de 50 sementes. A velocidade de emergência foi determinada pela contagem diária de plântulas emergidas, sendo consideradas emergidas as plântulas com os cotilédones acima do nível do solo. A avaliação foi realizada até a estabilização do número das plântulas por três contagens consecutivas. O IVE foi determinado pelo cálculo descrito por Maguire (1962b): $IVE = N1 / D1 + N2 / D2 + \dots + Nn / Dn$, onde: IVE = índice de velocidade de emergência de plântulas; N= número de plântulas emergidas do dia anterior até o dia da contagem atual; D = número de dias da semeadura da primeira à última contagem. A porcentagem de sobrevivência foi registrada na última contagem, após a estabilização do número de plântulas, no dia em que essas foram coletadas para a determinação da matéria fresca e seca.

Os ensaios acima foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial, com quatro repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias ao teste de Tukey ($P \leq 0,05$) pelo software R (“R Core Team”, 2019).

3.2.6.3. Produção da fitoalexina gliceolina

Para a determinação da gliceolina (HAHN; ALBERSHEIM, 1978; LABANCA, 2002), sementes de soja foram semeadas em bandejas contendo areia autoclavada e mantidas em casa de vegetação a ± 25 °C durante 10 dias. Na sequência, os cotilédones foram retirados das plântulas, lavados em água destilada esterilizada e realizado corte superficial de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro na face abaxial. Seis cotilédones foram transferidos para cada placa de Petri, sendo estas forradas com três discos de papel de filtro umedecidos com água destilada esterilizada e, sobre os cotilédones foi depositada uma alíquota de 75 μ L das preparações. As placas permaneceram em BOD a 25 °C por 20h no escuro. Posteriormente, os cotilédones foram transferidos para tubos contendo 10 mL de água destilada esterilizada e mantidos sob agitação por 1h. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 285 nm.

Para verificar o efeito de preparações de *L. edodes* na produção da gliceolina foram utilizados os filtrados FSM30, FMIC30, FBASI na concentração de 20%, meio GPL, acibenzolar-S-metílico (0,166 g L⁻¹), controle positivo *Saccharomyces cerevisiae* (0,007 g L⁻¹) e o controle negativo água destilada esterilizada. O experimento foi repetido duas vezes com

delineamento estatístico inteiramente casualizado, com seis repetições. Os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias ao teste de Tukey ($P \leq 0,05$) pelo software R (“R Core Team”, 2019).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Crescimento micelial

O crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi afetado negativamente pelo uso dos filtrados de *L. edodes* no meio de cultivo BDA (Figura 3). Para o filtrado do basidiocarpo houve efeito linear das concentrações utilizadas sobre o IVC. Resultado semelhante foi observado para o filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade, com um efeito quadrático em função das concentrações de FSM30 para essa mesma variável. Além disso, pode-se observar na Figura 3C, que o meio de cultivo GPL não apresentou efeito sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, ou seja, mesmo que o FSM30 contenha o meio GPL em sua composição, esse não tem influência sobre o micélio do patógeno, confirmando que o efeito negativo é exclusivamente causado pelos metabólitos do cogumelo presentes no meio. Apesar do FMIC30 apresentar efeito quadrático significativo das concentrações testadas, a redução do IVC foi menor do que as encontradas para os filtrados FBASI e FSM30, mesmo nas maiores concentrações (Figura 3B).

O teste *in vitro* de inibição do crescimento micelial (PIC) dos filtrados de *L. edodes* sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* indicou a elevada influência desses filtrados no desenvolvimento desse patógeno em condições artificiais. Com o aumento das concentrações houve o aumento significativo da inibição do crescimento micelial do fungo para todos os filtrados testados. Podendo-se destacar o FBASI e FSM30 na concentração de 80%, os quais apresentaram uma inibição de 75% e 60%, respectivamente, em relação ao controle água (Figuras 3 – D e F). Esse efeito direto dos filtrados de *L. edodes* sobre *S. sclerotiorum* pode ser explicado pela presença de alguns dos seus componentes, como por exemplo, a lentionina, presente no basidiocarpo e no micélio e, a lentina, presente a partir do seu cultivo líquido, as quais possuem forte atividade antibacteriana e antifúngica (DI PIERO, 2003; HATVANI, 2001; ISHIKAWA, KAZUE; KASUYA; VANETTI, 2001; NGAI; NG, 2003).

Resultados semelhantes foram obtidos por Tonucci (2004) no controle de *Colletotrichum sublineolum*, visto que o extrato aquoso do basidiocarpo de *L. edodes* na concentração de 20% foi capaz de inibir o crescimento micelial, a formação de apressórios e a

germinação de conídios do patógeno. Piccinin et al. (2010) também verificou que extratos do basidiocarpo, do píleo e da estirpe de *L. edodes* reduziram significativamente o crescimento micelial e inibiram a germinação de esporos de *Exserohilum turcicum* e *C. sublineolum* a partir da concentração de 1%, com atividade fungistática e termolábil. Assim como, foi constatado que o extrato de píleo foi bacteriostático, enquanto que, o extrato da estirpe e o filtrado do crescimento micelial foram bactericidas sobre *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (PICCININ, 2000). O efeito do extrato desse cogumelo também foi observado por Carvalho (2007) na inibição do crescimento de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* e ação antibiótica sobre *Escherichia coli*.

Testando o efeito de cogumelos no controle de fitopatógenos, Garcia et al. (2019) verificaram efeito quadrático significativo em função das doses da suspensão micelial de *Agaricus brasiliensis* no IVCM de *Pseudocercospora vitis*, sendo que a dose de 10% reduziu em 16% esse índice. Outros estudos também relataram redução de 90% na germinação de esporângios de *P. viticola* utilizando 10% de preparações de *A. brasiliensis* (GARCIA et al., 2018). Assim como, Owaid (2017) constatou interação significativa entre o cogumelo *Coriolus versicolor* no crescimento micelial de *Verticillium* sp. e *Pythium* sp., com uma inibição de 67% e 65%, respectivamente.

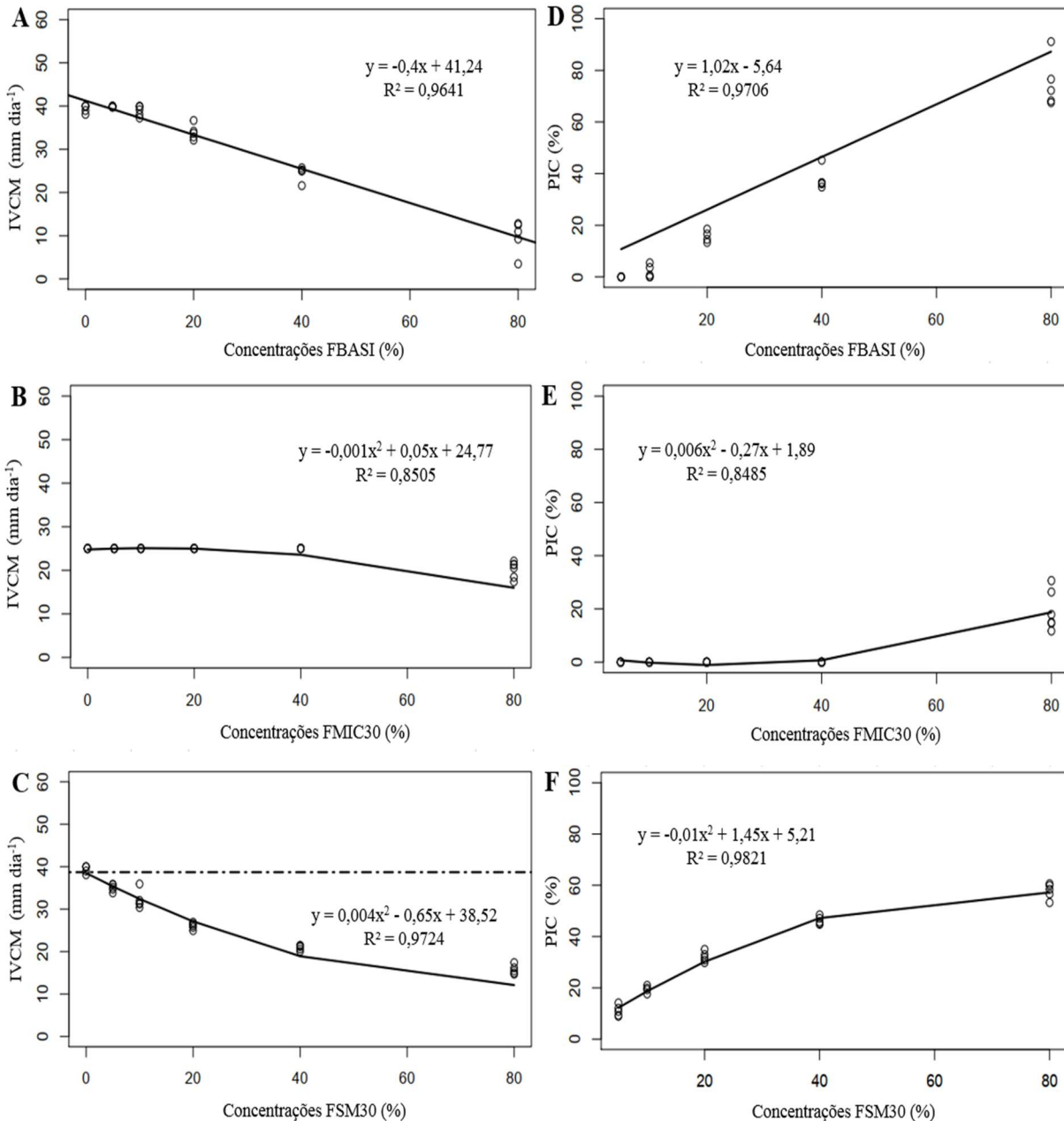


Figura 3: Efeito de diferentes concentrações de filtrados de *Lentinula edodes* no índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de *Sclerotinia sclerotiorum* - A: Filtrado do basidiocarpo (FBASI); B: Filtrado do micélio de 30 dias de idade (FMIC30); C: Filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade (FSM30). E na porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) – D: FBASI; E: FMIC30; F: FSM30.

3.3.2. Germinação miceliogênica dos escleródios

Como pode-se observar na Tabela 9, detectou-se diferença estatística entre os tratamentos para a germinação miceliogênica dos escleródios. Quanto as preparações de *L. edodes*, o FBASI apresentou o menor percentual de germinação com uma redução de 62%, em relação a testemunha. Enquanto que, o FSM30 foi estatisticamente igual ao FBASI, além de

não diferir do seu controle, meio GPL, e nem da testemunha, evidenciando que o filtrado do basidiocarpo foi mais eficiente em inibir a germinação miceliogênica dos escleródios, em relação aos demais tratamentos, exibindo efeito direto sobre essas estruturas de sobrevivência. Uma alternativa para potencializar ainda mais esse efeito na germinação dos escleródios pode ser o aumento do período de exposição dos escleródios ao filtrado do cogumelo.

Estudos relatam que os óleos essenciais de hortelã, eucalipto e alecrim inibiram a germinação de escleródios até o 15^o, 7^o e 5^o dia, respectivamente. Enquanto que, o tratamento com o fungicida fluzinam inibiu até o 12^o dia e, a partir disso, apresentou 50% de inibição na germinação dos escleródios. Os óleos mais promissores na inibição da germinação dos escleródios foram o capim limão (24^o dia) e cravo da índia, (45^o dia), com inibição de 94% e 100%, respectivamente, após 45 dias. Na avaliação da viabilidade dos escleródios pelo teste Trifenil Cloreto de Tetrazólio, observou-se que o óleo de cravo da índia e capim limão inativaram 100% e 50%, respectivamente, a viabilidade dessas estruturas (JUNIOR GRAF, 2018).

A germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* foi afetada quando utilizado óleo essencial de *Aloysia citriodora*, com efeito linear decrescente nas doses mais altas, atingindo 100% de inibição da germinação de escleródios (FREDDO et al., 2016). Coser (2018) também testou o efeito de óleos essenciais na germinação de escleródios de *Sclerotinia rolfsii* e observou que os óleos de capim limão e cravo da índia na concentração de 5000 ppm inibiram a germinação dos escleródios durante 40 dias e foram eficientes na inativação dos mesmos. Diferentes concentrações de Si também inibiram significativamente a germinação miceliogênica e carpogênica de *S. sclerotiorum*, com 90% e 80% de inibição, respectivamente, na concentração de 10 mM de Si. Além disso, houve uma relação positiva entre as concentrações testadas e o efeito inibitório (ELSHERBINY; TAHER, 2018).

Em ensaios com fungicidas, verificou-se que o tiofanato metílico reduziu 75% a germinação miceliogênica, enquanto que, procymidone e vinclozolin apresentaram 60% de redução, após 15 dias de incubação. E mesmo os fungicidas benomyl, fluzainan e iprodione não apresentaram diferença estatística na germinação dessas estruturas, em relação ao controle (COSTA; COSTA, 2004). Como os escleródios são estruturas de sobrevivência, desenvolvidos para garantir a manutenção do fungo em condições adversas, é de suma importância a descoberta de produtos com capacidade de causar alterações na viabilidade dessas estruturas (AMORIM; PASCHOLATI, 2018).

Tabela 9. Efeito de filtrados de *Lentinula edodes* na germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* após 4 dias de incubação.

Tratamento	Germinação (%)
Água (testemunha)	89,9±9 a*
FBASI	56,6±15 b
FMIC30	93,3±15 a
FSM30	80,0±22 ab
GPL	83,3±16 ab
CV (%)	19,8

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$; GPL: meio de cultivo; Filtrados de *L. edodes* – FBASI: filtrado do basidiocarpo; FMIC30: filtrado do micélio de 30 de idade; FSM30: filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade; GPL é o controle para o FSM30.

3.3.3. Germinação carpogênica dos escleródios

A germinação carpogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum* foi negativamente afetada em função das concentrações do FSM30 (Tabela 10). O filtrado foi significativo tanto para a redução do índice de velocidade de germinação (IVG), quanto para o percentual de inibição da germinação carpogênica (IGC). Nesse primeiro parâmetro, houve efeito quadrático em função das concentrações de FSM30, além de que, todas as concentrações do filtrado diferiram estatisticamente da dose 0%. Houve efeito direto do filtrado no IGC, visto que, o melhor percentual de inibição da germinação dos escleródios foi verificado para a concentração de 40% de FSM30, com 100% de inibição. As concentrações de FSM30 afetaram o IVG e IGC dos escleródios de *S. sclerotiorum*, com menor velocidade de germinação, quando comparado com 0%, assim como, para o percentual de inibição, o qual reduziu em 100% a germinação.

Assim como foi constatado no presente trabalho, Zanella et al. (2015) verificaram que os extratos de folhas de *Annona cacans*, *Geophila repens*, *Palicourea crocea* e as frações clorofórmica e acetato de etila de *A. cacans* inibiram a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* em 75%, 100%, 100%, 100% e 94%, respectivamente. Tal fato evidencia a atividade antifúngica de extratos vegetais na germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*. Em estudos com óleos essenciais, foi verificado que os 17 óleos testados inibiram a germinação carpogênica de escleródios, em relação ao controle (SIEGA et al., 2018). Esses estudos corroboram com o presente trabalho, expondo o elevado potencial de produtos alternativos no controle dessas estruturas, uma vez que, como a principal forma de infecção do patógeno ocorre pela germinação carpogênica dos escleródios é de grande valia a descoberta de novos produtos

com efeito prejudicial sobre as estruturas de resistência de *S. sclerotiorum* (YOUNG; WERNER, 2012).

Tabela 10. Efeito de concentrações do filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade (FSM30) de *Lentinula edodes* no índice de velocidade de germinação (IVG) e na inibição da germinação carpogênica (IGC) de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

Tratamento	IVG	IGC (%)
FSM30 – 0% **	2,0±0,2 a*	-
FSM30 – 5%	0,7±0,5 b	48,4±3 b*
FSM30 – 10%	0,6±0,3 b	54,7±24 b
FSM30 – 20%	0,4±0,3 b	48,4±34 b
FSM30 – 40%	0 b	100±0 a
CV (%)	45,6	33,5

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$;

**Equação quadrática ($P \leq 0,05$): $0,001x^2 - 0,118x + 1,656$; $R^2 = 0,65$.

3.3.4. Permeabilidade da membrana plasmática

Verificou-se que o micélio de *S. sclerotiorum* tratado com os filtrados FBASI, FMIC30 e FSM30 de *L. edodes* proporcionaram aumento na condutividade elétrica ao longo do tempo, a qual foi significativamente maior do que o controle água (Figura 4). O micélio do fungo tratado com FBASI apresentou incremento na perda de eletrólitos, a partir dos 20 segundos, sendo que aos 360 segundos, registou-se condutividade média de $56 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}$, em comparação ao controle água com $39 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}$ (Figura 4-A). Dados semelhantes foram observados para o FMIC30, o qual diferiu do controle água aos 20 segundos e apresentou condutividade média de $80 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}$, em relação ao seu controle com $45 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}$, aos 360 segundos (Figura 4-B). Com isso, constatou-se que o FBASI e FMIC30 propiciaram, aos 360 segundos, um aumento na perda de eletrólitos de 43% e 77%, respectivamente, em relação ao controle. Já o FSM30 apresentou incremento a partir dos 10 segundos, tanto em relação ao controle água, como também quando comparado com o seu controle com meio de cultivo GPL. Ademais, esse filtrado apresentou um aumento na condutividade de 57% e 50% em relação ao controle água e ao GPL, respectivamente (Figura 4-C).

O tratamento com os filtrados de *L. edodes* proporcionaram um aumento na perda de eletrólitos por parte do micélio de *S. sclerotiorum*, uma vez que, observou-se valores superiores de condutividade elétrica em relação ao controle. O presente ensaio indica o potencial de filtrados de *L. edodes* em causar danos à membrana plasmática e aumento no vazamento de componentes intracelulares, resultando na morte celular. O cogumelo *L. edodes* contém

metabolitos secundários, como compostos fenólicos, dentre os quais o ácido gálico que pode ser encontrado em elevadas concentrações (BACH et al., 2018). Segundo Borges et al. (2013) esse ácido é um dos potenciais agentes antibacterianos presentes no cogumelo, uma vez que, causou alterações irreversíveis nas propriedades da membrana celular de bactérias gram-positivas e negativas, resultando em mudanças de hidrofobicidade, redução da carga negativa superficial e ruptura ou formação de poros nas membranas celulares, com consequente perda dos constituintes intracelulares.

Resultados semelhantes aos verificados nesse trabalho foram relatados por Xu et al. (2014) com ácido cumérico, visto que, o micélio de *S. sclerotiorum* tratado com esse ácido apresentou aumento na condutividade relativa ao longo do tempo, maior do que o controle. Assim como Duan et al. (2013) verificaram ao testar fungicidas.

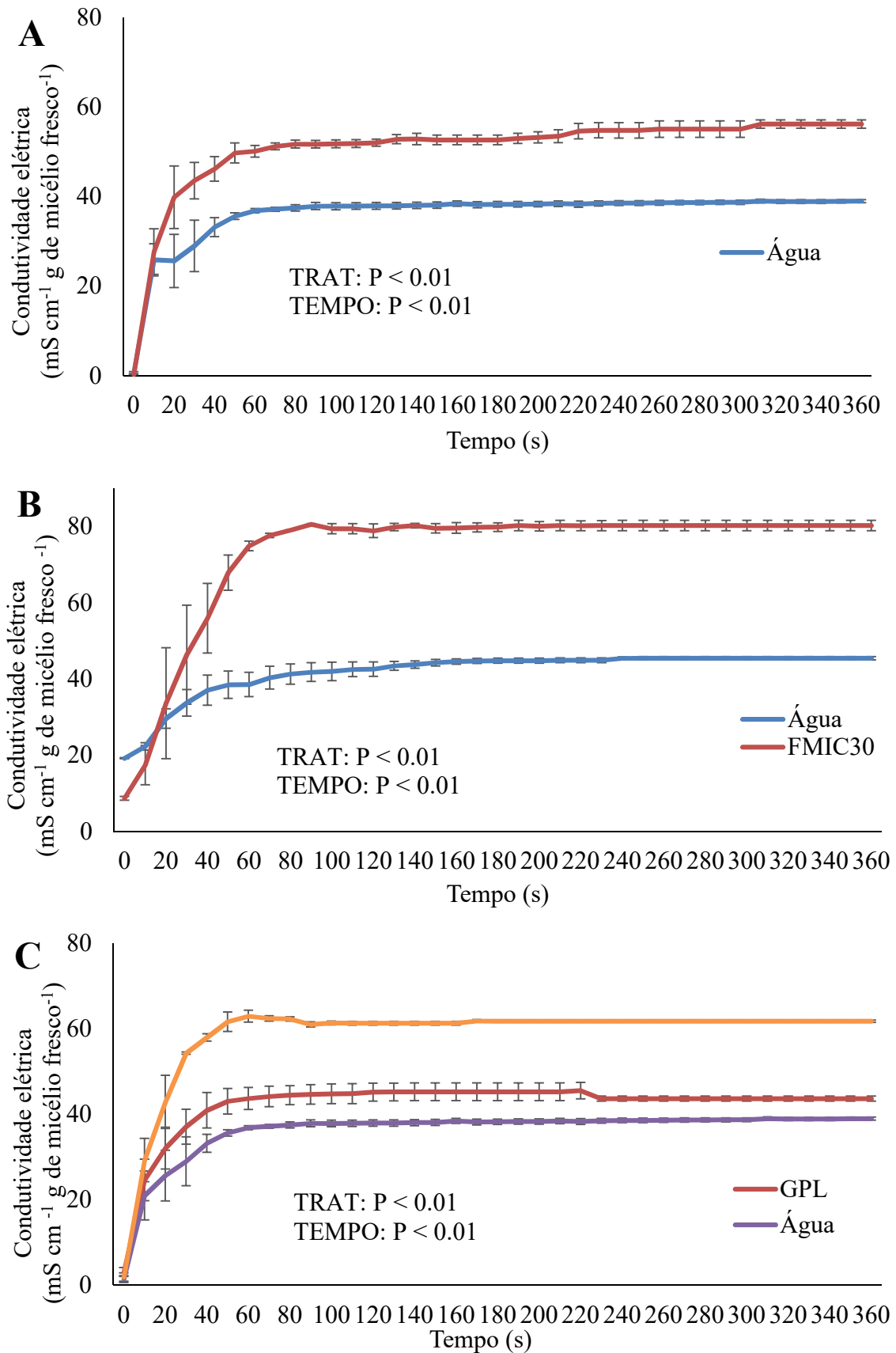


Figura 4: Condutividade elétrica do micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* tratado com preparações de *Lentinula edodes* e água. A: Filtrado do basidiocarpo (FBASI); B: Filtrado do micélio de 30 dias de idade (FMIC30); C: Filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade (FSM30) e o seu controle meio de cultivo GPL. Os resultados representam a média \pm erro padrão.

3.3.5. Severidade do mofo branco em plantas de soja mantidas em casa de vegetação

As preparações do cogumelo *L. edodes* apresentaram um efeito quadrático significativo, em função da concentração, na severidade do mofo branco em plantas de soja em casa de vegetação. Tanto para o FSM30 como para o FBASI, a concentração de 20% causou a menor severidade da doença, com uma redução de 83% e 78% em relação ao controle, respectivamente (Figura 5). Esse controle observado com o uso dos filtrados de *L. edodes* pode ser associado à composição desse cogumelo, o qual é rico em metabólitos bioativos, como polissacarídeos, com ação antimicrobiana (SHARMA; KHANNA; KAPOOR, 2016). Um exemplo disso, é a lenthionina, composto sulfatado, presente no basidiocarpo e na biomassa micelial produzida em cultura submersa e a lentina, proteína com ação antifúngica, presente a partir do cultivo líquido de *L. edodes*. Ambos os compostos possuem forte efeito antibacteriano e antifúngico (DI PIERO, 2003; HATVANI, 2001; ISHIKAWA, KAZUE; KASUYA; VANETTI, 2001; NGAI; NG, 2003).

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al. (2019), que ao testar o extrato aquoso de *L. edodes* no controle da antracnose do feijoeiro, obtiveram 58% e 37% de redução na área abaixo da curva do progresso da doença, para as concentrações de 1% e 5%, respectivamente, em relação ao controle. Além disso, essas doses não apresentaram diferença estatística do indutor comercial ASM e do fungicida piraclostrobin. Assim como, Piccinin et al. (2010) verificaram o controle de *Exserohilum tursicum* e *Colletotrichum sublineolum* quando aplicado a concentração de 2% de extrato aquoso do basidiocarpo de *L. edodes*, reduzindo a severidade de doenças foliares do sorgo. Tais resultados evidenciam a ação destes filtrados no controle de doenças em plantas.

Diversos estudos relatam o potencial do cogumelo *L. edodes* como indutor de resistência para diferentes patossistemas. Esta indução pode ser por meio da ativação de mecanismos de defesa bioquímicos, como compostos fenólicos, alcaloides, fototoxinas, entre outros, bem como pelos mecanismos que compreendem as espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas e proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP) (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Reverberi et al. (2005) constatou que filtrados do cogumelo *L. edodes* proporcionaram aumentos na atividade de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX) de *Aspergillus parasiticus*. Oliveira et al. (2019) também obtiveram resultados significativos para peroxidase (POX), CAT e polifenoloxidase (PPO), com a aplicação do extrato aquoso do cogumelo no controle da antracnose em feijoeiro, sendo que para a

concentração de 20% do extrato aquoso, a resposta a atividade de todas as enzimas avaliadas ultrapassou o valor máximo obtido nas demais concentrações, com um pico as 12 e 24 horas após a aplicação.

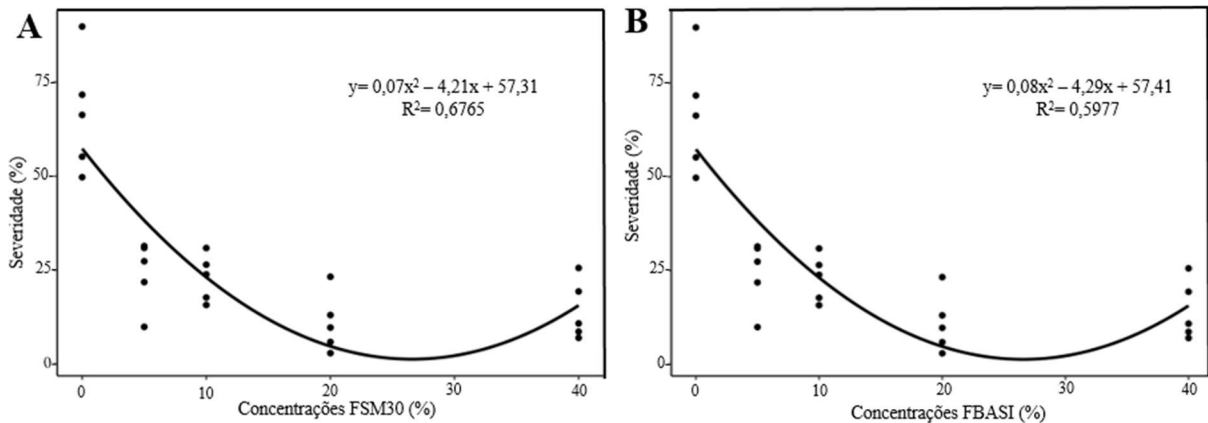


Figura 5: Efeito de diferentes concentrações de filtrados de *Lentinula edodes* na severidade de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja em casa de vegetação. A: filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade (FSM30); B: filtrado do basidiocarpo (FBASI).

3.3.6. Qualidade sanitária e fisiológica das sementes

No ensaio da qualidade sanitária de sementes de soja apenas o tratamento Casboxina+Tiram apresentou controle significativo na incidência de *S. sclerotiorum*. As amostras tratadas com as demais preparações exibiram 62% de infecção, aproximadamente. Logo, os filtrados de *L. edodes* não diferiram estatisticamente do controle, ou seja, não foram capazes de controlar o patógeno presente nas sementes (Tabela 11). Entretanto, para a produção de escleródios de *S. sclerotiorum*, o filtrado FBASI proporcionou redução na produção dessas estruturas, o qual foi estatisticamente igual ao tratamento com fungicida.

Para os parâmetros de vigor (PCG) e de germinação foi observado diferença significativa entre as amostras inoculadas e não inoculadas, comprovando o efeito prejudicial do fungo no desenvolvimento de plântulas de soja. As amostras não inoculadas não exibiram diferença estatística entre os tratamentos, enquanto que, as amostras inoculadas com *S. sclerotiorum*, apresentaram diferença significativa entre os tratamentos para PCG e germinação. Sendo que, nessa última, o fungicida Casboxina+Tiram teve o melhor percentual de germinação, aproximadamente 83%, entretando, foi estatisticamente igual a FBASI, FMIC30 e ao controle água. O filtrado FSM30 não diferiu estatisticamente do seu controle meio GPL, os quais apresentaram menor percentual de PCG e de germinação, em relação ao controle água. No entanto, esses tratamentos não exibiram diferença estatística do controle água nas

amostras não inoculadas com o patógeno, para os índices de PCG e de germinação. Esses resultados sugerem uma relação entre os tratamentos e a presença de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, uma vez que, nas amostras sem o patógeno não houve efeito de tratamentos (Tabela 12).

Para os parâmetros de emergência, sobrevivência e IVE de plântulas de soja foi constatado diferença significativa entre as amostras inoculadas e não inoculadas com *S. sclerotiorum*. Porém, não houve efeito significativo dos tratamentos e, também não foi observado interação significativa entre os fatores presença do fungo e os tratamentos, para nenhum dos parâmetros, ou seja, o fator tratamento não foi significativo (Tabela 13). Resultado semelhante foi verificado para o índice de massa seca, o qual foi significativo entre as amostras inoculadas e não inoculadas com o fungo, mas não exibiu diferença estatística entre os tratamentos. O índice de massa fresca não foi significativo para nenhum dos fatores, presença do fungo ou tratamentos testados (Tabela 14).

Tabela 11. Efeito de diferentes tratamentos na qualidade sanitária de sementes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* e na produção de escleródios após 8 dias de incubação.

Tratamento	Incidência (%)	Produção de escleródios
Água (testemunha)	60±19 a*	6±2 a*
Casboxina+Tiram	0 b	0 b
Acibenzolar-S-metílico	68±10 a	5±2 a
FBASI	56±10 a	2±1 ab
FMIC30	61±11 a	5±1 a
FSM30	70±3 a	5±2 a
GPL	58±18 a	5±2 a
CV (%)	23,3	39,1

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$; C+T: Casboxina+Tiram; ASM: Acibenzolar-S-metílico; GPL: meio de cultivo; Filtrados de *L. edodes* – FBASI: filtrado do basidiocarpo; FMIC30: filtrado do micélio de 30 de idade; FSM30: filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade; GPL é o controle para o FSM30.

Tabela 12. Efeito de diferentes tratamentos (T) nos parâmetros de vigor (primeira contagem da germinação - PCG) e de germinação de sementes de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com *Sclerotinia sclerotiorum*.

T	PCG (%)			Germinação (%)		
	NI	CI	$\bar{x}T$	NI	CI	$\bar{x}T$
Água	89±2 A a*	63±7 B ab*	77 ab*	91±1 A a*	64±6 B ab*	77 ab*
C+T	90±2 A a	73±7 B a	83 a	92±2 A a	76±6 B a	84 a
ASM	90±4 A a	27±6 B d	58 d	95±2 A a	27±6 B d	60 d
FBASI	95±3 A a	52±4 B ab	73 ab	95±2 A a	52±4 B bc	74 bc
FMIC30	97±1 A a	59±13 B ab	78 ab	97±1 A a	59±13 B ab	78 ab
FSM30	90±4 A a	39±5 B cd	66 cd	92±3 A a	39±5 B cd	66 cd
GPL	89±6 A a	53±4 B bc	71 bc	91±6 A a	53±4 B bc	72 bc
$\bar{x}I$	91,6 A	52,3 B		93,4 A	52,9 B	
CV (%)		7,7			7,5	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$; C+T: Casboxina+Tiram; ASM: Acibenzolar-S-metílico; GPL: meio de cultivo; Filtrados de *L. edodes* – FBASI: filtrado do basidiocarpo; FMIC30: filtrado do micélio de 30 de idade; FSM30: filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade; $\bar{x}T$: médias dos tratamentos; $\bar{x}I$: médias das amostras não inoculadas e inoculadas; GPL é o controle para o FSM30.

Tabela 13. Efeito de diferentes tratamentos (T) em plântulas de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com *Sclerotinia sclerotiorum*.

T	Emergência (%)			Sobrevivência (%)			IVE		
	NI	CI	$\bar{x}T$	NI	CI	$\bar{x}T$	NI	CI	$\bar{x}T$
Água	93±4	76±10	84* ^{ns}	92±4	75±13	83* ^{ns}	31±1	21±7	26* ^{ns}
C+T	87±6	79±11	83	87±8	79±12	83	25±4	23±5	24
ASM	85±6	73±4	79	85±6	73 ±7	79	27±4	22±3	24
FBASI	91±5	82±6	87	91±5	81±7	87	31±1	25±3	28
FMIC	89±5	79±8	84	88±5	79±8	84	26±7	23±6	24
FSM	89±7	79±5	83	89±7	77±5	83	27±4	21 ±2	24
GPL	89±3	79±6	84	89±3	77±5	83	29±2	23±3	26
$\bar{x}I$	89 A	78 B		89 A	77 B		28 A	22 B	
CV (%)		7,7			8,7			16,5	

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$; C+T: Casboxina+Tiram; ASM: Acibenzolar-S-metílico; GPL: meio de cultivo; Filtrados de *L. edodes* – FBASI: filtrado do basidiocarpo; FMIC: filtrado do micélio de 30 de idade; FSM: filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade; $\bar{x}T$: médias dos tratamentos; $\bar{x}I$: médias das amostras não inoculadas e inoculadas; GPL é o controle para o FSM30.

Tabela 14. Efeito de diferentes tratamentos (T) na matéria fresca e na matéria seca de plântulas de soja não inoculadas (NI) e inoculadas (CI) com *Sclerotinia sclerotiorum*.

T	Matéria fresca (g)			Matéria seca (g)		
	NI	CI	$\bar{x}T$	NI	CI	$\bar{x}T$
Água	2,2±0,2	2,1±0,3	2,1* ^{ns}	0,16±0,01	0,17±0,03	0,17* ^{ns}
C+T	2,0±0,2	1,9±0,1	2,0	0,16±0,01	0,18±0,01	0,17
ASM	2,1±0,2	2,0±0,3	2,0	0,16±0,01	0,18±0,02	0,17
FBASI	2,2±0,1	2,1±0,3	2,1	0,15±0,02	0,19±0,02	0,16
FMIC30	2,1±0,2	1,8±0,2	2,0	0,16±0,00	0,18±0,02	0,18
FSM30	2,1±0,2	2,0±0,2	2,0	0,16±0,01	0,17±0,01	0,17
GPL	2,2±0,2	2,1±0,2	2,1	0,17±0,02	0,18±0,01	0,17
$\bar{x}I$	2,1* ^{ns}	2,0		0,16 B	0,18 A	
CV (%)		10,3			9,1	

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm DP$; C+T: Casboxina+Tiram; ASM: Acibenzolar-S-metílico; GPL: meio de cultivo; Filtrados de *L. edodes* – FBASI: filtrado do basidiocarpo; FMIC30: filtrado do micélio de 30 de idade; FSM30: filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade; $\bar{x}T$: médias dos tratamentos; $\bar{x}I$: médias das amostras não inoculadas e inoculadas; GPL é o controle para o FSM30.

Os melhores resultados de germinação, emergência, sobrevivência, IVE e matéria seca foram verificados para as sementes de soja não inoculadas. Porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos testados para essa amostra. O tratamento com o FBASI foi estatisticamente igual ao fungicida Casboxina+Tiram para o índice de produção de escleródios na análise de qualidade sanitária das sementes. Resultado semelhante ao fungicida também foi verificado com os filtrados FBASI e FMIC30, para os percentuais de PCG e de germinação, sendo que o tratamento com fungicida apresentou a melhor germinação em sementes inoculadas com *S. sclerotiorum*. Os tratamentos testados não apresentaram diferença estatística significativa nas amostras inoculadas com *S. sclerotiorum* para os parâmetros de emergência, sobrevivência, IVE, matéria fresca e seca.

Apesar de os filtrados de *L. edodes* não apresentarem efeito na incidência de *S. sclerotiorum* e no posterior desenvolvimento de plântulas de soja, estudos demonstram o potencial de produtos alternativos no controle de patógenos de sementes. Sementes de soja tratadas com óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus*, *Eucalyptus globulus* e *Baccharis trimera* apresentaram redução de 52% na incidência de *Fusarium* sp., com menor teor de micotoxinas e aumento no rendimento de grãos em relação ao controle, para todos os óleos testados (DARONCO et al., 2015). Assim, como, Vicenço et al. (2017) verificaram que o óleo essencial de *Lippia alba* reduziu a incidência de *Cercospora kikuchii* em plântulas de soja, com um controle estatisticamente semelhante ao do fungicida carbedazim. Além de inibir 100% do crescimento micelial desse patógeno. Também foi avaliado o controle biológico de

fitopatógenos da soja por meio da microbiolização de sementes com diferentes espécies de *Bacillus* spp. e constataram redução significativa da incidência fúngica para as sementes tratadas com *Bacillus* spp em comparação com as não tratadas. As espécies *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus* apresentaram percentuais de aproximadamente 99% de controle de fitopatógenos em sementes de soja (BEZERRA; MACEDO; AGUIAR, 2013).

O fungicida foi o tratamento mais eficaz no controle do patógeno, o qual consiste de uma combinação dos grupos químicos Carboxanilida (sistêmico) e Dimetilditiocarbamato (protetor) (JUNIOR; BEHLAU, 2018). A dificuldade dos demais tratamentos em controlar o fungo está relacionada a alta incidência do patógeno nas sementes (60% no tratamento testemunha), visto que, foi realizada a inoculação artificial durante 24 horas. Além disso, o alto período de contato das sementes com o patógeno possibilitou o incremento na severidade, dificultando ainda mais o seu controle. Vale ressaltar que, em condição de infestação natural, raramente verificasse incidência superior a 2% do fungo, a qual já é capaz de causar severas epidemias (SOUZA; LOBO JUNIOR; SOARES, 2008).

A ocorrência de fitopatógenos afeta a qualidade sanitária e fisiológica de sementes, causando redução do potencial germinativo, subdesenvolvimento de plântulas ou até a morte das sementes (BARBOSA et al., 2013; MUNIZ et al., 2004; VENTUROSOSO et al., 2015). Com isso, recomenda-se o uso de sementes tratadas com agentes de biocontrole, com o intuito de evitar os possíveis efeitos deletérios, assim como, a sobrevivência e disseminação de patógenos via sementes (VENTUROSOSO et al., 2015). O tratamento das sementes pode proporcionar o incremento no rendimento final de grãos de soja, visto que, permite germinação uniforme das sementes e o estabelecimento das plântulas (CORRÊA et al., 2008; MOSHTAGHI-KHAVARAN; KHOMARI; ZARE, 2014; SINGH; ALI; CHAUHAN, 2009).

3.3.7. Produção da fitoalexina gliceolina

As preparações de *L. edodes* foram significativas na síntese de gliceolina em cotilédones de soja. Os filtrados FBASI e FMIC30 foram estatisticamente iguais ao controle positivo com a levedura *S. cerevisiae*, sendo que, esse ultimo filtrado foi estatisticamente igual ao FSM30 (Tabela 15). Todos os filtrados do cogumelo apresentaram acúmulo de gliceolina superior ao tratamento testemunha e ao indutor comercial ASM, tal fato demonstra o potencial de preparações de *L. edodes* na ativação de mecanismos de defesa. Analisando o efeito dos fungos sapróbios *Curvularia inaequalis*, *Pseudobitritis terrestres*, *Memnomiella echinata* e *Curvularia eragrotidis* na indução de fitoalexinas, Solino et al. (2017) observou que filtrados

dos três primeiros fungos promoveram maior síntese de faseolina em relação ao indutor comercial ASM e, quando comparado com a água, maior acúmulo das fitoalexinas faseolina, gliceolina e deoxiantocianidinas para todos os filtrados de fungos sapróbios testados.

Oliveira (2015) verificou que o extrato aquoso de *L. edodes* proporcionou um acúmulo significativo de faseolinas em feijão, desoxiantocianidinas em sorgo e gliceolina em soja, além disso também observou um aumento dessas fitoalexinas em função das doses do extrato aquoso do cogumelo. Em estudos realizados constatou-se que extratos dos cogumelos *Agaricus blazei*, *Pycnoporus sanguineus* e *L. edodes* apresentaram um efeito dose dependente no acúmulo de gliceolina, ou seja, houve maior acúmulo dessa fitoalexina com o aumento da concentração dos extratos aquosos. Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com a literatura, evidenciando o efeito eliciador de preparações de *L. edodes* na ativação de mecanismos de defesa latentes das plantas (ARRUDA et al., 2012; FIORI-TUTIDA, 2003; PICCININ, 2000).

O tratamento com meio GPL, utilizado como controle para o FSM30, apresentou níveis elevados de gliceolina, isso se deve a presença de extrato de levedura em sua composição. Na literatura, estudos relatam o potencial das leveduras *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* como indutoras de resistência, visto que essas são capazes de induzir a síntese de fitoalexinas em soja e/ou sorgo (SOUZA et al., 2019; STANGARLIN et al., 2010). Além de proporcionarem redução no progresso de doença causada por *Colletotrichum musae* em bananas (HELING et al., 2017). Ademais, verificou-se o potencial das leveduras *Candida albicans*, *Pichia pini* como indutoras de resistência, as quais afetaram os teores de lignina, fenóis totais e proteínas totais em plantas de beterraba com cercosporiose (HELING, 2019).

Tabela 15. Efeito de diferentes tratamentos na síntese da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja.

Tratamento	Gliceolina ($\text{Abs}_{285\text{nm}}^{-1} \text{ g massa fresca}$)
Água (testemunha)	0,58±0,2 d*
<i>S. cerevisiae</i>	0,90±0,1 ab
Acibenzolar-S-metilico	0,57±0,1 d
FBASI	0,95±0,1 ab
FMIC30	0,95±0,2 bc
FSM30	0,82±0,1 c
GPL	1,0±0,4 a
CV(%)	14,49

*Dados transformados ($\text{dados}^{\{0.5\}}$); Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); $\bar{x} \pm \text{DP}$; *S. cerevisiae* (0,007 g L⁻¹) Acibenzolar-S-metilico (0,166 g L⁻¹); filtrados FBASI: filtrado do basidiocarpo, FMIC30: filtrado do micélio de 30 dias de idade, FSM30: filtrado da suspensão micelial de 30 dias de idade de *Lentinula edodes*; GPL: meio de cultivo, usado como controle para o FSM30.

3.4. Conclusões

Os filtrados FBASI e FSM30 do cogumelo *L. edodes* apresentam efeito direto significativo, por meio da redução do índice de velocidade de crescimento micelial e aumento do percentual de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, com inibição de 75% e 60%, respectivamente, na concentração de 80%. Esse efeito pode ser relacionado com alterações na permeabilidade seletiva da membrana plasmática das hifas do fungo tratado com os filtrados, visto que, esse proporciona um aumento na perda de eletrólitos de 43%, 57% e 77% para FBASI, FMIC30 e FSM30, respectivamente.

As preparações de *L. edodes* proporcionam uma redução significativa na severidade do mofo branco em plantas de soja em casa de vegetação. A concentração com maior percentual de redução da doença é de 20%, tanto para FSM30 como para FBASI, com uma redução de 83% e 78% em relação ao controle, respectivamente. Além disso, todos os filtrados do cogumelo exibem acúmulo de gliceolina superior ao tratamento testemunha e ao indutor comercial ASM. Tais resultados demonstram o potencial de preparações de *L. edodes* no controle *in vitro* e *in vivo* do mofo branco e a ativação de possíveis mecanismos de defesa.

Referências

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier: Academic Press, 2005. p. 922.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 5 dez. 2019.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. V. 1. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda., 2018. p. 46–68.
- ARRUDA, R. S. et al. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Biosci. J**, v. 28, n. 2, p. 164–172, 2012.
- BACH, F. et al. **Atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato de *Lentinula edodes***. **IV Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos, 2018**. Guarapuava-PR. 2018
- BARBOSA, R. M. et al. Chemical control of pathogens and the physiological performance of peanut seeds. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 11, n. 2, p. 322–326, 2013.
- BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n. 1, p. 88–98, 2001.

- BEZERRA, A.; MACEDO, G.; AGUIAR, D. Use of *Bacillus* spp. no control pathogens in soybean seed variety BRS valuable RR. **AgroecossistemaS**, v. 5, n. 1, p. 68–73, 2013.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P. (Eds.). **Indução de resistência em plantas à patógenos e insetos**. 1. ed. Piracicaba, SP: Fealq, 2005. p. 11–28.
- BORGES, A. et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, p. 256–265, 2013.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009.
- BREENE, W. M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 10, p. 883–894, 1990.
- BRIZUELA, M. A. et al. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundários. **Rev Iberoam Micol**, v. 15, p. 69–74, 1998.
- CARVALHO, M. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Lentinus cintrus*, *Amauroderma* sp. e *Pycnoporus sanguineus***. 2007. 102p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- CORRÊA, B. O. et al. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 156–163, 2008.
- COSER, E. **Potencial de óleos essenciais no controle do fungo *Sclerotium rolfii* in vitro e em plantas de tomate**. 2018. 39p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia). Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2018.
- COSTA, G. R.; COSTA, L. J. S. Influência do solo e de substratos para a produção de escleródios na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 2, p. 83–87, 2006.
- COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1023–1030, 2003.
- CRISAN, E. V; SANDS, A. Nutritional value. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. (Eds.). **The biology and cultivation of edible fungi**. 1. ed. New York: Academic Press, 1978. p. 842.

- DARONCO, M. V. et al. Effectiveness evaluation of essential oils on soybean seed treatment. **Ciência Agrícola**, v. 13, n. 1, p. 49–58, 2015.
- DI PIERO, R. M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos**. 2003. 171p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- DUAN, Y. et al. Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 1–2, p. 61–67, 2013.
- ELSHARBINY, E. A.; TAHER, M. A. Silicon induces resistance to postharvest rot of carrot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and the possible of defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v. 140, p. 11–17, 2018.
- FIORI-TUTIDA, A. C. G. **Uso de extratos de cogumelos comestíveis e medicinais no controle da ferrugem da folha e helmintosporiose em trigo**. 2003. 112p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá 2003.
- FREDDO, A. R. et al. Óleo essencial de *Aloysia citriodora* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em pepino e atividade antifúngica *in vitro*. **Cultura Agrônômica**, v. 25, n. 4, p. 373–386, 2016.
- GARCIA, C. et al. Antimicrobial activity of *Agaricus brasiliensis* on *Plasmopara viticola* and its effect on the induction of resistance to the control of downy mildew on ‘Isabel Precoce’. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1–8, 2018.
- GARCIA, C. et al. Atividade antimicrobiana de *Agaricus brasiliensis* sobre o crescimento micelial e esporulação de *Pseudocercospora vitis*. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 18, n. 1, p. 48–52, 2019.
- GARCIA, R. Á. et al. Atividade antifúngica de óleos e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 48–57, 2012.
- GODOY, C. V. et al. Doenças da soja. In: AMORIM, L. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agrônômica Ceres Ltda, 2016. p. 810.
- HAHN, M. G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. **Plant Physiol**, v. 62, p. 107–111, 1978.
- HAHN, M. H. et al. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. **Biological Control**, v. 138, p. 1–9, 2019.

HAMMERSCHMIDT, R. Introduction: definitions and some history. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Eds.). . **Induced Resistance for Plant Defence**. 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p. 269.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 1, p. 71–74, 2001.

HELING, A. L. et al. Controle biológico de antracnose em pós-colheita de banana “Maçã” com *Saccharomyces* spp. **Summa Phytopathol**, v. 43, n. 1, p. 49–51, 2017.

HELING, A. L. **Seleção, avaliação do crescimento e alterações bioquímicas em plantas de beterraba tratadas com leveduras para controle de cercosporiose**. 2019. 84p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2019.

ISHIKAWA, KAZUE, N.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 206–210, 2001.

JARDINE, J. G.; BARROS, T. D. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em:

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fb123vmz02wx5eo0sawqe3vtdl7vi.html>>. Acesso em: 5 dez. 2019.

JULIO, V. A. **Manejo de mofo branco na cultura da soja**. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/blog/119/manejo-de-mofo-branco-na-cultura-da-soja>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

JUNIOR, G. J. S.; BEHLAU, F. Controle Químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). . **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. V. 2. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda., 2018. p. 239–120.

JUNIOR GRAF, A. L. **Uso de óleos essenciais como controle alternativo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary**. 2018. 42p. Trabalho de conclusão de curso (Grauação em Agronomia). Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2018.

KAUR, H. et al. Assessment of the antimicrobial activity of *Lentinula edodes* against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Crop Protection**, v. 89, p. 284–288, 2016.

KUHN, H.; PANSTRUGA, R. Introduction to a *Virtual Special Issue* on phytopathogen effector proteins. **New Phytologist**, v. 202, n. 3, p. 727–730, 2014.

- LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e na síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*).** 2002. 118p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- LEITE, R. M. V. B. DE C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Embrapa soja - Comunicado Técnico**, p. 1–3, 2005.
- LIBERATO, J. R. **Desenvolvimento e avaliação do software Quant para quantificação de doenças de plantas por análises de imagens.** 2003. 126p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.
- LOBANOK, A. G. et al. Composition and biological activity of submerged mycelium of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, p. 69–73, 2003.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176–177, 1962.
- MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, A.; REZENDE, J. A. M.; GERMAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. V. 2. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p. 261–272.
- MEYER, M. C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2018/19: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos. **Embrapa Soja - Circular Técnica**, v. 152, 2019.
- MOSHTAGHI-KHAVARAN, A.; KHOMARI, S.; ZARE, N. Soybean seed germination and seedling growth in response to deterioration and priming: effect of seed size. **Plant Breed Seed Sci**, v. 70, p. 55–67, 2014.
- MUNIZ, M. F. B. et al. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 144–149, 2004.
- NAPPI, B. P. **Valor nutricional de corpos de frutificação e biomassas dos cogumelos comestíveis *pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Auricularia auricula-fuclae*.** 1998. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.
- NGAI, P. H. K.; NG, T. B. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. **Life Sciences**, v. 73, n. 26, p. 3363–3374, 2003.

- OLIVEIRA, A. C. **Extrato aquoso de shiitake na indução de resistência e controle de doenças de feijoeiro e videira**. 2015. 78p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Guarapuava, 2015.
- OLIVEIRA, A. C. et al. *Lentinula edodes* extract in the control and induction of resistance to common bean pathogens. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 14, n. 4, p. 1–6, 2019.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plantulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 131p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.
- OOI, V. E. C. **Medicinally important fungi**. In: VanGriensven (ed.). Science and cultivation of edible fungi. 15. ed. Rotterdam: Balkema, 2000. p. 41–51.
- OWAID, M. N. Antagonistic role of hypha and cell-free culture filtrates of medicinal mushrooms to *Verticillium* sp. and *Pythium* sp. fungal pathogens. **Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)**, v. 7, n. 2, p. 94–102, 2017.
- OYETAYO, V. O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 380–386, 2009.
- PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. V. 1. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p. 424–450.
- PICCININ, E. **Potencial de preparações do cogumelo comestível “shiitake” (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo**. 2000. 185p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Cogumelo “shiitake” (*Lentinula edodes*) reduz o crescimento de fitopatógenos e a severidade de manchas foliares em sorgo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 68–72, 2010.
- R Core Team**. Vienna, Austria, 2019. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>
- REVERBERI, A. et al. Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 69, p. 207–215, 2005.
- SAS User’s Guide**. North CarolinaCary: SAS Institute Inc, 2001.

- SHARMA, S.; KHANNA, P. K.; KAPOOR, S. Optimised isolation of polysaccharides from *Lentinula edodes* strain NCBI JX915793 using response surface methodology and their antibacterial activities. **Natural Product Research**, v. 30, n. 5, p. 616-621, 2016.
- SIEGA, T. DE C. et al. Effect of essential oils on miceliogenic and carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Australian journal of basic and applied sciences**, v. 12, n. 1, p. 32–36, 2018.
- SINGH, N. I.; ALI, S.; CHAUHAN, J. S. Effect of seed size on quality within seed lot of pea and correlation of standard germination, vigour with field emergence test. **Nat Sci**, v. 7, p. 72–78, 2009.
- SOLINO, A. J. S. et al. Accumulation of phytoalexins in beans, soybeans and sorghum by fungal filtrates. **Rev. Caatinga, Mossoró**, v. 30, n. 4, p. 1073–1078, 2017.
- SOUZA, R. M. et al. Indução de fitoalexinas por preparações de leveduras, *Trichoderma* e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* Stapf. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 3, p. 325–335, 2019.
- SOUZA, R. C. P.; LOBO JUNIOR, M.; SOARES, G. C. M. Efeito de fungicidas para controle de mofo branco em sementes de feijão para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Documentos, IAC, Campinas**, v. 85, p. 769–771, 2008.
- STANGARLIN, J. R. et al. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arq. Inst. Biol**, v. 77, n. 1, p. 91–98, 2010.
- TOLAINI, V. et al. *Lentinula edodes* enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 243–249, 2010.
- TONUCCI, N. M. **Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de *Lentinula edodes* (Shiitake) sobre *Colletotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e Tobacco mosaic virus (TMV)**. 2004. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World Agricultural Production. p. 33, 2019.
- VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. **Quant-A software for plant disease severity assessment**. 8.18. **Anais...Christchurch, New Zealand: Congress of Plant Pathology**, 2003

VENTUROSOS, L. R. et al. Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 788–793, 2015.

VICENÇO, C. B. et al. Composição química e atividade *in vitro* de óleos essenciais sobre a mancha púrpura da soja. **Revista interdisciplinar de ciência aplicada**, v. 2, n. 4, 2017.

WANG, J. et al. Synergistic effect of *Lentinula edodes* and *Pichia membranefaciens* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. **Postharvest Biology and Technology**, v. 81, p. 7–12, 2013.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, p. 65–96, 1999.

WILLE, C. N. et al. Potencial of aqueous extracts of basidiomycetes to control root-rot nematodes on lettuce. **Horticultura Brasileira**, v. 37, p. 54–59, 2019.

XU, C. et al. Activity of a novel strobilurin fungicide benzothiofostrobin against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 32–38, 2014.

YORINORI, J. T.; NUNES JUNIOR, J.; LAZZAROTTO, J. J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. **Embrapa Soja**, p. 1–36, 2004.

YOUNG, C. S.; WERNER, C. P. Infection routes for *Sclerotinia sclerotiorum* in apetalous and fully petalled winter oilseed rape. **Plant Pathology**, v. 61, n. 4, p. 730–738, 2012.

ZANELLA, C. DE et al. Activity of plant extracts on the carpogenic germination and mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 82, p. 1–8, 2015.

ZAZZERINI, A.; TOSI, L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 415–421, 1985.