



NELSON HENRIQUE MAGANHOTO

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA FERMENTAÇÃO
LÍQUIDA SUBMERSA DE *Clonostachys rosea***

**LAVRAS – MG
2020**

NELSON HENRIQUE MAGANHOTO

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA FERMENTAÇÃO LÍQUIDA
SUBMERSA DE *Clonostachys rosea***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Mestre.

Dr. Wagner Bettiol
Orientador

Dr. Gabriel Moura Mascarin
Coorientador

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Maganhoto, Nelson Henrique.
Otimização dos parâmetros para fermentação líquida submersa de *Clonostachys rosea* / Nelson Henrique Maganhoto - 2020.
78 p.

Orientador (a): Wagner Bettiol.
Coorientador (a): Gabriel Moura Mascarin.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.
Bibliografia.

1. Bioprodutos. 2. Fermentação submersa. 3. Controle biológico. I. Bettiol, Wagner. II. Mascarin, Gabriel Moura. III. Título..

NELSON HENRIQUE MAGANHOTO

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA FERMENTAÇÃO LÍQUIDA
SUBMERSA DE *Clonostachys rosea***

**OPTIMIZATION OF PARAMETERS FOR SUBMERGED LIQUID
FERMENTATION OF *Clonostachys rosea***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 11 de fevereiro de 2020

Dr. Wagner Bettiol	Embrapa Meio Ambiente
Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA
Dr. Marcelo Augusto Boechat Morandi	Embrapa Meio Ambiente
Dr. Gileno Vieira Lacerda Júnior	Embrapa Meio Ambiente

Dr. Wagner Bettiol
Orientador

Dr. Gabriel Moura Mascarin
Coorientador

**LAVRAS – MG
2020**

À minha mãe Suely, pelo amor incondicional e às minhas irmãs Tatiane e Tamires e meu irmão José, por me apoiarem sempre.

OFEREÇO

À minha amada esposa Tamiris, pelo imenso amor, amizade, incentivo e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Bettiol, pelos inúmeros ensinamentos desde o começo do meu mestrado, pela confiança e dedicação ao me orientar neste projeto. Obrigado, professor!

Deixo um agradecimento especial ao meu coorientador Dr. Gabriel Moura Mascarin, pelo incentivo e pela dedicação do seu tempo ao meu projeto de pesquisa.

Aos queridos companheiros de laboratório, pelo convívio e amizade.

À Gabriela, pelo apoio e dedicação.

Às técnicas do laboratório de Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini”, Anamaria, Ana Caroline, Neusa e Roseli, pela ajuda, paciência e companheirismo.

À querida secretária do programa de Fitopatologia Ariane, pela atenção e dedicação dispensadas nesses anos de pós-graduação.

Aos Professores da pós-graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, que muito contribuíram para minha formação.

À Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade de desenvolver o trabalho de dissertação e oportunidade para meu aperfeiçoamento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e financiamento desta pesquisa.

OBRIGADO!

RESUMO

A capacidade do *Clonostachys rosea* agir como agente de controle biológico de doenças e de pragas, bem como promover o crescimento de plantas, é amplamente conhecido. Entretanto, um dos maiores desafios para o desenvolvimento de produtos à base deste antagonista é a sua produção em massa. Atualmente, a sua produção é realizada por meio de fermentação em estado sólido, consumindo muito espaço, tempo e intensa mão de obra, sendo que a utilização da fermentação em estado líquido poderá colaborar para vencer esse desafio. Realizar a otimização de diferentes combinações entre variáveis que interferem no processo fermentativo em meio submerso visando aumentar a concentração de conídios produzidos no meio de cultivo foram os objetivos do presente estudo. Também foram avaliados o número das unidades formadoras de colônia (UFC), de microescleródios e da biomassa fúngica seca. Ao final das fermentações foram realizados bioensaios para comprovar a eficácia dos propágulos de *C. rosea* produzidas via fermentação líquida no controle de alguns patógenos e uma praga de importância na agricultura brasileira (*Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Bemisia tabaci*). Inicialmente foi realizado um ensaio utilizando delineamento experimental de Plackett-Burman, estudando a interação entre seis variáveis do meio de cultivo: relação C:N, carbono total do meio, pH, inóculo inicial e as concentrações de Ca e Fe. Em seguida, a otimização das condições de cultivo foi realizada com o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), com três fontes de nitrogênio (extrato de levedura, farelo de algodão e ureia) e variando o pH durante a fermentação. As duas primeiras etapas foram realizadas em Erlenmeyers de 250 mL com três defletores basais, nos quais foram adicionados 90 mL dos diferentes meios esterilizados e 10 mL de inóculo. A etapa final de fermentação foi realizada em biorreatores automatizados de bancada de 3 L (Eppendorf®, BioFlo 115, Alemanha). A maior concentração média obtida de conídios via fermentação líquida foi de $7,87 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ com 120 horas de fermentação em meio contendo: relação C:N 50:1, Ca 1 g L⁻¹, Fe 100 mg L⁻¹, pH 6, carbono total 24 g L⁻¹ e inóculo inicial de 1×10^5 conídios mL⁻¹. Na fermentação sólida utilizando grãos de arroz, o valor médio máximo obtido após 30 dias de fermentação foi de $1,87 \times 10^9$ g⁻¹. A fermentação de *C. rosea* realizada em biorreator de bancada resultou em uma menor produção de conídios quando comparada com as produções obtidas nas etapas anteriores ($1,49 \times 10^7$ conídios mL⁻¹ com 120 horas de fermentação). O agente de controle biológico controlou de maneira significativa todos os patógenos e a praga testados, não apresentando diferenças estatísticas entre as formas de produção dos propágulos de *C. rosea* testados.

Palavras-chave: Bioprodutos, Plackett e Burmann 12, Fermentação submersa, DCCR, Controle Biológico.

ABSTRACT

The potential of *Clonostachys rosea* to act as a biocontrol agent for diseases and pests – as well as to promote plant growth – is well known. However, one of the major challenges for the development of products based on this antagonist is its mass production. Currently, its production is carried out through solid-state fermentation, a labor-intensive process that consumes too much space and time. The use of liquid fermentation can help overcome this challenge. The objective of this study is to optimize different combinations between variables that interfere with the fermentation process in a submerged medium in order to increase the concentration of conidia produced in the culture medium. The numbers of colony-forming units (CFU), microsclerotia and dry fungal biomass were also evaluated. The effectiveness of the propagules of *C. rosea* produced in liquid fermentation in the control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bemisia tabaci* was evaluated. Initially, an assay was carried out using the Plackett-Burman experimental design, studying the interaction between six variables of the culture medium, which are C:N ratio, total carbon of the medium, pH, initial inoculum and concentrations of Ca and Fe. Subsequently, the optimization of the culture conditions was performed with Rotational Central Composite Design (RCCD), using three nitrogen sources (yeast extracts, cottonseed meal and urea), and varying the pH during the fermentation. The first two steps were performed in 250 mL Erlenmeyers with three basal deflectors, in which 90 mL of sterilized different media and 10 mL of inoculum were added. The final fermentation step was carried out in a 3L bench bioreactor (Eppendorf, 115 BioFlo, Germany). The highest concentration of conidia obtained from submerged liquid fermentation was 7.87×10^8 conidia mL⁻¹ at 120 hours of fermentation in the medium with: C:N 50:1, Ca 1 g L⁻¹, Fe 100 mg L⁻¹, pH 6, total carbon 24 g L⁻¹ and initial inoculum 1×10^5 conidia mL⁻¹. In the solid fermentation using rice grains, the maximum value obtained after 30 days of fermentation was 1.87×10^9 g⁻¹. The submerged fermentation of *C. rosea* carried out in a bench bioreactor resulted in a lower production of conidia when compared to the production obtained in the previous steps (1.49×10^7 conidia mL⁻¹ after 120 hours of fermentation). *C. rosea* produced by submerged fermentation and solid-state fermentation controlled all pathogens and pest evaluated in the same way.

Key words: Bioproducts, Plackett and Burmann 12, Submerged fermentation, DCCR, Biocontrol.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Evolução das concentrações de conídios de *Clonostachys rosea* produzidos em fermentação líquida submersa por tratamentos a cada 24 horas. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais.39
- Figura 2** - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados e a significância das variáveis para o rendimento de conídios mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* produzido meio líquido submerso com 120 horas após a inoculação. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm.41
- Figura 3** - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados e a significância das variáveis para a produção de conídios mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* produzido meio líquido submerso com 144 horas após a inoculação. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm.42
- Figura 4** - Gráfico dos efeitos padronizados e a significância das variáveis para o rendimento de conídios mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* produzido via fermentação líquida submersa após 168 a inoculação. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5** - Gráfico dos efeitos padronizados e a significância das seis variáveis testadas para a produção de unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* produzido via fermentação líquida submersa. Contagem realizada 48 horas após a incubação das placas de Petri com meio BDA+Triton..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6** - Diagrama de Pareto com a significância dos fatores para a biomassa fúngica seca de *C. rosea* ao final da fermentação líquida. Biomassa seca em filtro de papel (previamente pesado e seco) mantidos em estufa a 50 °C ± 2, até peso constante..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7** - Gráficos de contorno gerado pelo modelo proposto para rendimento de conídios mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* com 144 horas de fermentação. Carbono total no meio de cultivo vs. relação C:N. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).....44

- Figura 8** - Gráficos de contorno gerado pelo modelo proposto para rendimento de conídios mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* com 144 horas de fermentação. Relação C:N vs. densidade inicial de inóculo. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).....45
- Figura 9** - Gráfico de contorno das unidades formadoras de colônias formadas de *Clonostachys rosea* com a partir da interação entre relação C:N e teor de Fe no meio de cultivo. Contagem realizada 48 horas após a incubação das placas de Petri com meio BDA+Triton. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).....46
- Figura 10** - Gráfico de contorno gerado pelo modelo proposto. Biomassa fúngica seca para relação C:N vs. carbono total no meio de cultivo. Nível inferior (-1) e nível superior (+1). Biomassa seca em filtro de papel (previamente pesado e seco) mantidos em estufa a 50 °C ± 2, até peso constante.....46
- Figura 11** - Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para o rendimento de conídios mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* em meio líquido após 120 horas da inoculação no DCCR.50
- Figura 12** - Gráficos de efeitos principais da influência das diferentes fontes de nitrogênio no rendimento média de conídios com 120 horas fermentação no DCCR com 5 pontos centrais. Farinha de algodão (-1), extrato de levedura (0) e ureia (1).50
- Figura 13** - Gráfico de superfície resposta para o modelo proposto. Concentração de conídios mL⁻¹ com 120 horas de fermentação para pH vs. fonte de nitrogênio. (-1) para o nível inferior e (+1) para o nível superior.51
- Figura 14** - Diagrama de Pareto com a significância dos fatores para a biomassa fúngica seca de *C. rosea* ao final da fermentação líquida no delineamento composto central rotacional. Biomassa seca em filtro de papel (previamente pesado e seco) mantidos em estufa a 50 °C ± 2, até peso constante.52
- Figura 15** - Gráficos de efeitos principais das diferentes fontes de nitrogênio para a produção de biomassa fúngica seca (a) e superfície resposta do modelo proposto da biomassa fúngica seca para pH vs. Fonte de nitrogênio (b). Farinha de algodão (-1), extrato de levedura (0) e ureia (0).52
- Figura 16** - Diagrama de Pareto com efeitos padronizados e a significância das variáveis testadas para a produção de unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* produzido via fermentação líquida submersa no delineamento

- composto central rotacional. Contagem realizada 48 horas após a incubação das placas de Petri com meio BDA+Triton. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 17** - Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para a produção de microescleródios em meio líquido via delineamento composto central rotacional com 144 horas de fermentação. 54
- Figura 18** - Superfície de resposta do modelo proposto para a produção de unidade formadora de colônias (UFC) mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* e a interação entre pH e fonte de nitrogênio. Contagem realizada 48 horas após a incubação das placas de Petri com meio BDA+Triton. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 19** - Gráficos de efeitos principais das diferentes fontes de nitrogênio para a produção de microescleródios em meio líquido com 144 horas de fermentação (a) e superfície resposta do modelo proposto do rendimento de microescleródios para pH vs. Fonte de nitrogênio (b). Farinha de algodão (-1), extrato de levedura (0) e ureia (1). 55
- Figura 20** - Probabilidades de cada nota em função do tratamento no teste de antagonismo de *Clonostachys rosea* vs. *Botrytis cinerea*. As notas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem a colonização dos discos por *C. rosea* em 0%, 0-3%, 3-6%, 6-12%, 12-25%, 25-37% 37-50% e >50% do disco, respectivamente. 57
- Figura 21** - Fotos do bioensaio de inibição da germinação miceliogênica dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio Neon-S por *C. rosea*. (a) e (b) Escleródios com aplicação de *Clonostachys rosea* e na concentração de 1x10⁷ conídios mL⁻¹; (c) e (d) Escleródios com aplicação de água destilada esterilizada. 59
- Figura 22** - Boxplot da germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* em meio Neon-S no bioensaio do parasitismo de *C. rosea* v.s *S. sclerotiorum* após 7 dias de incubação. Teste com cinco tratamentos e quatro repetições com 20 escleródios por repetição. Placas incubadas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz. 60
- Figura 23** - Análise e curvas de sobrevivência de adultos de moscas branca* biótipo b (*Bemisia tabaci*) em função dos tratamentos utilizados, mensurado em diferentes pontos no tempo. Experimento realizado com quatro tratamentos e dez repetições com dez moscas por repetição. 61

Figura 24 - Gráfico de mortalidade em % acumulada por 120 horas com o desvio padrão em função dos tratamentos. Bioensaio com 10 repetições por tratamento e dez moscas por repetição.62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Variáveis e seus valores codificados e reais, utilizados no planejamento experimental Plackett-Burman 12 para otimização da produção de conídios, unidades formadoras de colônia e biomassa fúngica seca de *Clonostachys rosea* em meio líquido.25
- Tabela 2** - Matriz do planejamento experimental com desenho do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais para otimização da produção de conídios, unidades formadoras de colônia e biomassa fúngica seca de *Clonostachys rosea* em meio líquido. (-1) para o nível inferior e (+1) para o nível superior.26
- Tabela 3** - Parâmetros definidos após a etapa de Plackett e Burman 12 para a produção do meio basal utilizado no delineamento central composto rotacional para a produção de conídios de *Clonostachys rosea* em meio líquido.27
- Tabela 4** - Variáveis e seus valores codificados e reais utilizados no delineamento composto central rotacional para otimização da produção de propágulos de *Clonostachys rosea* em cultivo líquido submerso.27
- Tabela 5** - Matriz do planejamento experimental tipo delineamento central composto rotacional com cinco pontos centrais e $\alpha = 1$ para a produção de conídios de *Clonostachys rosea* em meio líquido. (-1) para o nível inferior e (+1) para o nível superior.28
- Tabela 6** - Parâmetros utilizados na fermentação líquida submersa de *Clonostachys rosea* em biorreator automatizados de bancada de 3 L (Eppendorf[®], BioFlo 115, Alemanha), para a produção de conídios de *Clonostachys rosea* após a realização do DCCR.29
- Tabela 7** - Tratamentos e códigos para o ensaio de colonização foliar do morangueiro do *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea*, com nove repetições para cada tratamento e dez disco de folha de morangueiro por repetição.31
- Tabela 8** – Tratamentos, códigos e concentração utilizada no ensaio de antagonismo do *Clonostachys rosea* sob *Bemisia tabaci* biótipo b em folíolos de tomateiro. Com 10 repetições por tratamento e 10 moscas de 5 a 7 dias de idade por repetição.34
- Tabela 9** – Rendimento da produção de conídios de *Clonostachys rosea* obtidos em três tempos de fermentação líquida – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com

3 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).	35
Tabela 10 - Resultados da produção das unidades formadoras de colônia e biomassa fúngica seca de conídios de <i>Clonostachys rosea</i> – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).	40
Tabela 11 - Resumo da análise da produção de conídios de <i>Clonostachys rosea</i> obtidos em três tempos de fermentação líquida submersa, unidades formadoras de colônia, biomassa fúngica seca – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm e três repetições no tempo. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).	47
Tabela 12 - Resultado da produção de conídios de <i>Clonostachys rosea</i> (em conídios mL ⁻¹) dos tratamentos obtidos em cinco tempos de fermentação líquida utilizando o delineamento central composto rotacional com 5 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 28 °C e 250 rpm. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).	48
Tabela 13 - Produção de biomassa fúngica seca, unidades formadoras de colônia e microescleródios de <i>Clonostachys rosea</i> em fermentação líquida utilizando o delineamento central composto rotacional com 5 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 28 °C e 250 rpm. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).	49
Tabela 14 - Resultado da produção de conídios e microescleródios de <i>Clonostachys rosea</i> (em conídios/microescleródios mL ⁻¹) em cinco diferentes tempos de fermentação em biorreator de bancada automatizados de 3 L. Mantida a 0,5 v/vm (volume de ar por minuto por volume de meio de cultura), 28 °C e agitação de 300 rpm.	56
Tabela 15 - Resumo da análise de Contrastes para as notas atribuídas através de escala de avaliação foliar para o fungo <i>Clonostachys rosea</i> em função dos tratamentos. Seguindo o modelo de regressão logística multinomial para dados de notas de folhas de morangueiro colonizando <i>Clonostachys rosea</i>	57
Tabela 16 - Frequência das notas do crescimento de <i>Clonostachys rosea</i> em discos de folha de morangueiro e atribuídas de acordo com a escala de avaliação do crescimento foliar e Probabilidades de cada nota em função do tratamento. Experimento com seis	

tratamentos, nove repetições para cada tratamento e dez disco de folha de morangueiro por repetição. 58

Tabela 17 - Valores médios dos escleródios viáveis do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em função dos tratamentos¹ após sete dias da incubação das placas com meio Neon-S. Teste com cinco tratamentos e quatro repetições com 20 escleródios por repetição. 59

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	Batata Dextrose Ágar
DCCR	Delineamento Central Composto Rotacional
LSF	Fermentação em estado líquido
SSF	Fermentação em estado sólido
ME	Microescleródios
PB	Plackett e Burman
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	<i>Clonostachys rosea</i>	17
2.2	Fermentação	19
	2.2.1 Fermentação Sólida.....	19
	2.2.2 Fermentação Líquida.....	20
2.3	Delineamentos Experimentais	23
	2.3.1 Plackett-Burman	23
	2.3.2 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Organismos utilizados e manutenção das culturas.....	24
3.2	Ensaio de fermentação líquida de <i>Clonostachys rosea</i>	25
	3.2.1 Plackett e Burman 12.....	25
	3.2.2 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	27
	3.2.3 Scale-up: produção de conídios em biorreator de bancada	29
3.3	Avaliação do rendimento de conídios, unidades formadoras de colônias, produção de microescleródios, biomassa.....	29
3.4	Fermentação de <i>Clonostachys rosea</i> em meio sólido (arroz).....	30
3.5	Testes de antagonismo	31
	3.5.1 <i>Clonostachys rosea</i> vs. <i>Botrytis cinerea</i>	31
	3.5.2 <i>Clonostachys rosea</i> vs. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	32
	3.5.3 <i>Clonostachys rosea</i> vs. <i>Bemisia tabaci</i>	32
3.6	Análise Estatística.....	34
4	RESULTADOS	34
4.1	Ensaio inicial (Plackett e Burman 12).....	34

4.2	Otimização do meio de cultivo via Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	47
4.3	Produção massal de conídios em biorreator de bancada	55
4.4	Fermentação de <i>Clonostachys rosea</i> em Arroz.....	56
4.5	Testes de Antagonismo	56
4.5.1	<i>Clonostachys rosea</i> vs. <i>Botrytis cinerea</i>	56
4.5.2	<i>Clonostachys rosea</i> vs. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	58
4.5.3	<i>Clonostachys rosea</i> vs. <i>Bemisia tabaci</i>	60
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES.....	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A comercialização de biopesticidas agrícolas no Brasil cresceu em 2018 mais do que 70%, movimentando R\$ 464,5 milhões ante R\$ 262,4 milhões em 2017. Mundialmente o setor apresentou crescimento de 17% no mesmo período (MAPA, 2019). O Brasil segue esta tendência e está gerando uma necessidade por diversidade de agentes de controle biológico e seus potenciais produtos. A utilização dos agentes de biocontrole visa diminuir problemas ambientais causados pelo uso dos agrotóxicos, como contaminação do solo, água e eliminação de organismos benéficos (BETTIOL et al., 2009) e minimizar a seleção de patógenos resistentes a esses produtos (HARMAN, 2000), tornando-se uma importante ferramenta para reduzir o uso de agrotóxicos na agricultura.

O fungo *Clonostachys rosea* tem grande potencial como um agente de biocontrole de fitopatógenos fúngico e age por parasitismo, antagonismo, competição e indução de resistência de plantas (LAHOZ et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2011; LAHLALI e PENG, 2013), além de promover o crescimento de plantas (LUBECK et al., 2002), controlar mosca-branca (*Bemisia tabaci*) (ANWAR et al., 2018) e nematoides (SUTTON et al., 1997).

A produção em grande escala de *C. rosea* é um processo conhecido e de simples execução em condições controladas, porém sua produção ainda depende da fermentação em estado sólido (ZHANG et al., 2013), técnica que necessita de muito tempo para a produção de conídios e exige um ambiente amplo para a execução do processo. Uma alternativa para a produção massal de *C. rosea* em larga escala é a fermentação em estado líquido, ou cultura submersa, que minimiza o tempo de produção, espaço e mão de obra, fatores cruciais na viabilidade econômica de uma produção massal de fungos filamentosos usados como agentes de biocontrole (CARVALHO et al., 2018; MASCARIN et al., 2018).

Desta forma, visando otimizar a combinação entre diferentes variáveis que interferem no processo de multiplicação das estruturas reprodutivas de *C. rosea*, este trabalho foi realizado com o objetivo de aumentar a produção de conídios de *C. rosea* via fermentação líquida e validar seu potencial como agente de controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* e *Bemisia tabaci*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea é um ascomiceto da ordem Hypocreales (*Bionectria ochroleuca*: teleomorfo), anteriormente classificado como *Gliocladium roseum* (SCHROERS et al., 2001). Cosmopolita e relatado como saprófita, *C. rosea* é um organismo comum no solo, restos culturais e plantas daninhas. Pode ser encontrado em ambientes com pH variando de neutro a alcalino e em regiões temperadas, tropicais e desérticas (NOBRE et al., 2005; SUTTON et al., 1997), sugerindo a sua eficiência em colonizar solos e plantas em ampla faixa de temperatura, variando de 18 a 30 °C. Essa espécie produz conídios unicelulares em conidióforos de dois tipos, penicilado solitários ou agregados, formando pústulas obscuras ou ausentes, ou na forma verticilada (MOREIRA, 2012). As colônias do fungo em meio de cultura podem ser esbranquiçadas, alaranjadas ou salmão.

Schiller e Sinclair (1984) isolaram *C. rosea* de hastes, vagens, folhas e sementes de soja. Por outro lado, Sutton et al. (1997) obtiveram isolados de amostras de raízes de trevo vermelho, folhas de morangueiro e framboesa. Em sua fase sexuada (*B. ochroleuca*), pode ser encontrado, principalmente em ramos mortos de árvores, em plantas herbáceas e parasitando outros fungos (SUTTON et al., 1997). Este fungo pode produzir dois tipos de conidióforos; verticilados e penicilados, que se desenvolvem a partir de hifas superficiais espessadas em caules, estames e folhas entre 32 a 72 h após germinação e podem produzir conídios entre 40 e 72 h após a germinação inicial.

O sequenciamento realizado do genoma do *C. rosea* por Karlsson et al. (2015) revelou que o fungo possui um tamanho de 58,3 Mb e 14,268 genes, e quatro genes para a produção de quitinase (dois do subgrupo B e dois do subgrupo C). Os autores também ressaltaram que os dados sugerem que a tolerância a metabólitos secundários é uma característica proeminente na biologia de *C. rosea*.

Clonostachys rosea é amplamente conhecido por sua ação contra o fungo *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo-cinzento, importante doença que causa dano em, aproximadamente, 200 espécies de plantas cultivadas com distribuição global (WILLIAMNS et al., 2007). Também controla nematoides (KHAN et al., 2006), além de promover o crescimento de plantas (LUBECK et al., 2002) e controlar insetos (ANWAR et al., 2018).

Gong et al. (2017) destacaram que *C. rosea* induz resistência a *B. cinerea* em frutos de tomate. Algumas moléculas de sinalização foram induzidas em diferentes momentos após a infecção. O acúmulo substancial de moléculas sinalizadoras em resposta à indução de *C.*

rosea levou à expressão de inúmeros genes/proteínas de defesa da planta hospedeira. Além disso, alguns pequenos RNAs de *B. cinerea* podem silenciar genes de tomate envolvidos na imunidade (ARNE et al., 2013), porém a indução de resistência por *C. rosea* pode enfraquecer o efeito desses RNAs em frutos de tomate. *Clonostachys rosea* também induziu resistência a patógenos em algumas espécies de plantas. Lahoz et al., (2004) trataram raízes de plantas de tabaco com *C. rosea* e analisaram o extrato foliar das plantas quanto aos níveis de β -1,3-glucanases, β -1,4-glicosidases, quitinases, N-acetil-b-glucosaminidase e peroxidases. Os autores constataram que as atividades de β -1,3-glucanases, β -1,4-glicosidases e quitinases aumentaram nas plantas tratadas com o fungo e também concluíram que a severidade do oídio foi menor em plantas tratadas com *C. rosea* e posteriormente infectadas com *Erysiphe orontii*.

Outro alvo biológico de *C. rosea* são os nematoides, sendo reconhecido como parasita facultativo para nematoides fitopatogênicos (LI et al., 2006; ZHAO et al., 2005). A sua eficiência foi relatada por Khan et al. (2006) no controle de nematoides, principalmente das espécies pertencentes a *Meloidogyne*, mediante parasitismo de ovos e produzindo dois tipos de enzimas, protease e quitinase, que são essenciais ao processo de antagonismo. Por fim, esse fungo ainda demonstra capacidade de colonizar insetos, como por exemplo *Oncometopia tucumana* e *Sonesimia grossa* (TOLEDO et al., 2006) e, mais recentemente, *Bemisia tabaci* (ANWAR et al., 2018).

O isolado IK726 de *C. rosea* induziu o crescimento de plântulas de tomate (RAVNSKOV et al., 2006) e aumentou significativamente a massa de cevada (JOHANSEN et al., 2005). De acordo com Ravnskov et al. (2006), a indução do crescimento das plantas coincidiu com um aumento no teor de fósforo e sugeriram que *C. rosea* pode ser o responsável pelo aumento na solubilização deste elemento.

Cota et al. (2008 a,b) ressaltaram que *C. rosea* foi superior a alguns fungicidas comerciais (Procimidona e Captan) no controle de *B. cinerea* em morango em testes de campo. Boff et al. (2003) afirmaram que a colonização das pétalas e flores por *B. cinerea* pode ser prevenida ou reduzida pela ação de *C. rosea*, visto que este agente de biocontrole protege as pétalas e flores do morangueiro contra a infecção de *B. cinerea* durante o resto do período produtivo. Isto seria uma grande vantagem, visto que as aplicações de fungicida oferecem proteção somente por um período limitado. Outras vantagens podem ser creditadas a esse microrganismo, como a relativamente fácil produção de inóculo em material sólido (quando comparado a outros agentes de biocontrole) e apresentar baixo risco ecológico

devido a sua distribuição natural em plantas e solo (SCHROERS, 2001; SUTTON e PENG, 1993; TOLEDO et al., 2006).

Apesar de sua comprovada eficiência como agente de controle biológico de doenças de plantas, existem poucos produtos comerciais à base de *C. rosea* (BETTIOL et al., 2012). No Brasil não há nenhum biofungicida registrado no MAPA com o *C. rosea* como ingrediente ativo. Nos Estados Unidos existem dois produtos liberados pela U.S. Environmental Protection Agency (Vectorite[®], FPSolano[®]). No Brasil e no mundo há diversos bioprodutos registrados com *C. rosea* em sua composição, em diversas categorias como, por exemplo, promotores de crescimento ou bioativadores. Por seu potencial, a produção em escala industrial passou a ser um objetivo de diversos estudos. Carvalho et al. (2018) afirmaram que para a sua produção, existem basicamente dois processos em grande escala de fungos: em substrato sólido, nos quais são produzidos esporos aéreos, mas consome muito espaço e tempo, o que o torna caro; e cultivo submerso, no qual o substrato está na forma líquida, que é uma alternativa com alta produção e baixo custo quando comparado ao meio sólido de fermentação (WATANABE et al., 2006).

2.2 Fermentação

A fermentação possui uma importância histórica para a humanidade e data de milhares de anos atrás, principalmente para o processamento de alimentos. Considerando o século passado e as últimas décadas, ainda é utilizada para a produção de importantes biomoléculas e produtos para indústrias, incluindo a de alimentos, farmacêutica, têxtil, bioquímica e bioenergia, entre outros (PANDEY, 2003; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

2.2.1 Fermentação sólida

A fermentação em estado sólido é um processo no qual os microrganismos se desenvolvem em um ambiente sem água livre ou com um conteúdo muito baixo de água livre (SOCCOL et al., 2017). Normalmente, os fungos filamentosos e leveduras que são adaptados a baixos níveis de atividade da água são considerados organismos adequados para a fermentação em estado sólido (GE et al., 2017). Um dos fatores limitantes para a multiplicação de microrganismos e a adaptação a esse processo é a quantidade reduzida de água no substrato, porém os fungos se mostram bastante tolerantes a esse ambiente (FERNANDES, 2006). Os substratos sólidos mais utilizados são os grãos de arroz, milho,

milheto, trigo e aveia (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997). Também pode ser realizado utilizando um suporte sintético (poliuretano) com adição de uma fonte nutricional.

A esporulação dos fungos ocorre na superfície e nas cavidades com espaços livres do substrato ou suporte utilizado (SMITS et al., 2003). Quando a água está em excesso, o rendimento de esporulação (índice de esporulação) diminui porque as cavidades dos meios são ocupadas pela água, o que reduz os espaços livres para o desenvolvimento de formas de reprodução de fungos (DE LA CRUZ QUIROZ et al., 2015). Os autores ainda ressaltaram que o estresse hídrico da fermentação em estado sólido (SSF) favorece a esporulação de fungos. Primeiro, promovendo a indução ao início precoce da esporulação e, em segundo lugar, evaporando o excesso de água, liberando espaços livres para a esporulação, o que contribui para um aumento importante no índice de esporulação.

O uso da SSF e linhagens de fungos filamentosos pode agregar valor aos resíduos agrícolas, por meio de bioconversões. Esses resíduos incluem bagaço de plantas, sementes, casca e frutos e são constituídos por celulose, que representam uma fonte potencial de açúcar e energia (PANDEY et al., 2008).

Em fermentações de *C. rosea* em substrato sólido realizadas por Carvalho et al. (2018), foram relatadas a produção de 5×10^8 conídios g^{-1} de *C. rosea* em 15 dias de fermentação utilizando arroz como substrato. Também utilizando como fonte principal no meio de cultivo Viccini et al. (2007) observaram produção de $3,4 \times 10^9$ conídios g^{-1} de *C. rosea*, produzidos em Erlenmeyer. Por outro lado, Zhang et al. (2015) obtiveram a concentração de $3,5 \times 10^{10}$ conídios g^{-1} de *C. rosea* em 11 dias, utilizando farelos de trigo e milho (proporção de 3:1).

2.2.2 Fermentação líquida

A principal contraparte da fermentação em substrato sólido é a fermentação submersa, um processo no qual os microrganismos se multiplicam em meio líquido, com alto teor de água livre.

Os processos biológicos realizados na fermentação em cultura submersa têm vantagens notáveis em relação à instrumentação e controle da fermentação (monitoramento de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas solúveis em água), também quanto à separação da biomassa após a fermentação, mistura, aeração e dimensionamento, quando comparados com a fermentação em estado sólido (FARINAS, 2015).

Mascarin et al. (2015) afirmaram que com o controle dos parâmetros de fermentação, como pH, oxigenação, relação C:N e temperatura, a produção em cultura submersa é mais

vantajosa e permite melhor controle da contaminação e demanda menos espaço e trabalho manual em relação à fermentação sólida estática. Além disso, o emprego de biorreatores com agitação mecânica ou sistema airlift permite o escalonamento automatizado de uma produção mais padronizada do propágulo e/ou metabólito de interesse num curto intervalo de tempo.

Algumas empresas de biopesticidas adotam a tecnologia de fermentação líquida para a produção de conídios submersos. Porém, não há relatos sobre rendimentos, tempo de fermentação, custos de produção e comparação com conídios aéreos em termos de eficácia e vida-de-prateleira (KOBORI et al., 2015).

Com a fermentação líquida é possível aumentar a produção de propágulos diferentes, incluindo os clamidósporos. Os clamidósporos de *C. rosea* são importantes ecologicamente ao fungo, pois são mais eficientes do que os conídios para proliferar, sobreviver e germinar no solo (CALDWELL 1958; BEAGLE-RISTAINO e PAPAVIDAS, 1985); isto ocorre porque os clamidósporos são células resistentes com paredes externas espessas (HUGHES, 1985). *Clonostachys rosea* raramente gera clamidósporos em condições naturais (SUN et al., 2014). Li et al. (2005) investigaram a formação de clamidósporos em *C. rosea* e descobriram que os esporos resistentes poderiam ser induzidos pela introdução do composto antifúngico iturina (extraído de isolados de *Bacillus subtilis*) no meio de cultivo. Sun et al. (2014) afirmaram que, na maioria dos casos, a produção de clamidósporos foi através da expansão das células miceliais em cultura líquida, embora não tenha sido fácil induzir este tipo de esporos sob condições convencionais. A porcentagem de clamidósporos na cultura submersa aumentou ligeiramente com o tempo, sugerindo a conversão de alguns conídios em esporos resistentes.

A influência do pH na produção de conídios de *C. rosea* foi relatada por Carvalho et al. (2018), sendo que meios com o pH 3,5 promoveu a melhor produção de conídios. Steyaert, Weld e Stewart (2010) observaram que a maior produção de conídios de *Trichoderma atroviridae* foi em meios com valores menores de pH.

Leite et al. (2003) relataram que meios ricos em carbono e com deficiência em nitrogênio tendem a produzir maior quantidade de conídios e que a esporulação dos fungos é separada do seu crescimento vegetativo por processos metabólicos distintos, bem como requisitos nutricionais e ambientais (GAO et al., 2009; SUN et al., 2009). Sun et al. (2014) defendem que as fases de fermentação do crescimento vegetativo e produção de esporos podem ser reguladas de forma diferente, não apenas para aumentar os níveis de fermentação, mas também para acumular produtos eficazes. Essa otimização da fermentação por meio da transição de condições ótimas de cultura para condições adversas pode atender à demanda de

grande quantidade de clamidósporos de agentes de biocontrole para aplicações de campo (GAO et al., 2009).

A utilização de diferentes fontes de C e N tem sido explorada no desenvolvimento de meios de cultura para a fermentação em estado líquido por diversos autores (LEITE et al., 2003; VICCINI et al., 2007; ZHANG et al., 2015; CARVALHO et al., 2018), especialmente daqueles à base de produtos naturais, levando a avanços na aplicação desses produtos nos processos de fermentação em larga escala (CONNORS, 2002; KAMPEN, 2014). O processo de substituição dos componentes nutricionais por um substrato complexo, barato e acessível é importante quando se busca a redução dos custos de produção do meio (JACKSON et al., 1996; JACKSON, 1997).

Cerca de 50% da biomassa seca produzida é de carbono, sendo esse o principal componente de um meio de cultura, pois fornece o elemento mais importante para construção das células, além de suprir a energia necessária para movimentar o metabolismo do microrganismo (KAMPEN, 2014). Pode-se usar diferentes fontes de carbono no meio de cultivo desde açúcares simples (glicose, frutose) a óleos (soja, canola) (CONNORS, 2002). Entretanto, segundo Mascarin et al. (2015b) a concentração de carbono no meio é mais importante do que a fonte de carbono, pois, afeta também os níveis de osmolaridade e oxigênio dissolvido. Os autores relataram que o potencial osmótico e nível de oxigênio dissolvido foram maiores em meios com altas concentrações de carbono (140 e 200 g L⁻¹) em relação aqueles com concentração mais baixa, fatores que atuaram em sinergia e incrementaram a produção de blastoporos de *Beauveria bassiana*.

Uma das vantagens significativas da fermentação líquida é a diminuição do tempo necessário para a produção em massa de conídios de *C. rosea*. No trabalho realizado por Carvalho et al. (2018), com o uso de biorreatores de bancada com meio de cultura e condições otimizadas, a concentração de conídios chegou a 1x10⁸ mL⁻¹ no sétimo dia. Para comparação, a fermentação em estado sólido utilizando grãos de arroz ou trigo como substrato requer aproximadamente 15 dias para produzir 5x10⁸ conídios g⁻¹. Carvalho et al. (2018) ainda ressaltaram a importância que a produção de conídios utilizando a fermentação líquida requer menos espaço e trabalho, o que é uma consideração crucial em relação aos custos de energia e mão-de-obra para produção em massa. Para aumentar a produção de conídios de *C. rosea* via fermentação líquida foram utilizados delineamentos experimentais convencionais em ensaios de fermentação. Além da produção de conídios de *C. rosea*, também foram avaliadas a formação de outros propágulos.

2.3 Delineamentos Experimentais

2.3.1 Plackett-Burman

O delineamento experimental de Plackett-Burman é utilizado para identificar os fatores mais importantes no início da fase de experimentação, quando o conhecimento completo sobre o sistema em estudo não está disponível (ANAND et al., 2018). Este delineamento é um fatorial fracionário (YU et al., 1997) utilizado para demonstrar o peso relativo de vários fatores.

Nesse delineamento, cada fator é estudado em dois níveis: (-1) para o nível inferior e (+1) para o nível superior. Essa técnica é especialmente prática no caso de um grande número de fatores e quando não está claro quais configurações provavelmente estarão mais próximas das respostas ótimas (PLACKETT e BURMAN, 1946).

Este delineamento é constantemente utilizado em pesquisas que envolvem processos fermentativos desde a produção de etanol (WEHBE et al., 2017; PABLE et al., 2019; MA et al., 2019), indústria alimentícia (ZHANG et al., 2017) e em estudos de otimização na produção de biopesticidas (AWAD et al., 2017; SHANG et al., 2017; CARVALHO et al., 2018).

2.3.2 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

O Delineamento Composto Central (DCC) pertence a uma família de delineamentos eficientes, os delineamentos compostos, os quais requerem poucos ensaios para sua realização (ATKINSON e DONEV, 1992). O Delineamento Central Composto Rotacional foi desenvolvido, inicialmente, por Box e Wilson (1951) para estudo de funções polinomiais de resposta na indústria, onde o erro experimental, em geral, é pequeno, e as condições experimentais são mais facilmente controláveis.

O Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) foi utilizado por diversos autores nos últimos três anos na otimização da produção de agentes de biocontrole ou de metabólitos secundários produzidos (PEREIRA et al., 2017; AWAD et al., 2017; SHANG et al., 2017; CARVALHO et al., 2018; BARRERA et al., 2019; ANANY et al., 2019; KARUPPIAH et al., 2019). Conforme Mateus et al. (2001), este delineamento possui características interessantes para a busca da resposta ótima, que são um número de tratamentos reduzido em comparação aos fatoriais completos e pode ser realizado sequencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização do sistema. Nessas

condições, é comum repetir apenas um tratamento, no caso, o relativo ao ponto central, reduzindo assim o tempo e custo operacional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente (22°43’36”S e 47°00’59”W), localizado no município de Jaguariúna, Estado de São Paulo.

3.1 Organismos utilizados e manutenção das culturas

Nos estudos foram utilizados os fungos *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* e a mosca-branca *Bemisia tabaci*.

O agente de controle biológico utilizado nesse experimento foi a cepa de *Clonostachys rosea* LQC-62, o qual é proveniente da coleção da Embrapa Meio Ambiente (depositada no NCBI sob número de acesso MG489966), originalmente isolada em cultivos de rosas na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Essa cepa apresenta certa tolerância à radiação UV-B quando comparada a outras cepas (COSTA et al., 2012). O cultivo da cultura foi realizado em placas de Petri, com meio batata-dextrose-ágar (BDA, Difco®) na dosagem de 40 g L⁻¹, as quais foram mantidas a 25 °C, 12 h de luz, por 14 dias e, posteriormente, preservado a -20 °C em uma solução esterilizada de água destilada e 10% de glicerol.

A cepa de *B. cinerea* foi obtida coleção da Embrapa Meio Ambiente (sob código de acesso CMAA-1123). O cultivo da cultura foi realizado em placas de Petri de 90 mm x 15 mm, com meio BDA. As placas com o fungo foram mantidas a 25 °C, 12 h de luz, por 21 dias e, posteriormente, discos do meio de cultura foram preservado a -20 °C em uma solução esterilizada de água destilada e 10% de glicerol.

Sclerotinia sclerotiorum utilizada nos ensaios foi proveniente da coleção da Embrapa Meio Ambiente. O cultivo inicial da cultura foi realizado em placas de Petri, com meio BDA. As placas com o fungo foram mantidas a 25 °C, 12 h de luz, por 21 dias e, posteriormente, preservado a -20 °C em uma solução esterilizada de água destilada e 10% de glicerol. Para a produção dos escleródios foi utilizado um meio de cultivo com cenoura e fubá seguindo a metodologia de Garcia et al. (2012), os escleródios foram colhidos após trinta dias da incubação e armazenados em geladeira a 4 °C.

A manutenção da criação de *B. tabaci* foi realizada em plantas de couve manteiga (*Brassica oleracea*) mantidas em uma estufa de estrutura de alvenaria e madeira, fechada com tecido voil que não permitia a entrada de outros insetos. As plantas foram irrigadas por um

sistema automatizado de gotejamento de maneira a atender as suas necessidades hídricas. Desbastes de folhas mortas ou doentes e adubação foram realizadas para manter o vigor das plantas de couve.

3.2 Ensaios de fermentação líquida de *Clonostachys rosea*

Os ensaios de fermentação líquida foram divididos em três etapas: triagem inicial utilizando o delineamento de Plackett e Burman 12; a otimização do meio de cultivo utilizando o delineamento central composto rotacional (DCCR); e scale-up realizada em biorreatores automatizados de bancada de 3 L (Eppendorf[®], BioFlo 115, Alemanha).

3.2.1 Plackett e Burman 12

O delineamento experimental Plackett e Burman 12 foi utilizado para estudar a interação entre seis variáveis do meio de cultivo: relação C:N, concentrações de Ca e Fe, pH, carbono total do meio e densidade do inóculo inicial (Tabela 1). Este delineamento foi composto de 12 ensaios + 3 pontos centrais, totalizando 15 ensaios. A Tabela 2 representa o design de Plackett-Burman com os valores codificados.

Tabela 1 - Variáveis e seus valores codificados e reais, utilizados no planejamento experimental Plackett-Burman 12 para otimização da produção de conídios, unidades formadoras de colônia e biomassa fúngica seca de *Clonostachys rosea* em meio líquido.

Fator	Código	-1	0	1
C/N	X ₁	20:1	50:1	80:1
Ca (g L ⁻¹)	X ₂	1	2	3
Fe (mg L ⁻¹)	X ₃	50	100	150
pH	X ₄	3,5	6	8,5
C total (g L ⁻¹)	X ₅	12	24	36
Inóculo inicial (conídios mL ⁻¹)	X ₆	1x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁶

Fonte: Do autor (2019).

Em Erlenmeyers (Exom[®]) de 250 mL com três defletores basais foram adicionados 90 mL dos diferentes meios esterilizados e 10 mL de inóculo. O inóculo foi obtido a partir das amostras em estoque, as quais foram crescidas em placas de Petri por 14 dias e os conídios removidos com uma alça de Drigalski após a adição de solução salina esterilizada com polisorbato 80 a 0,05% (Synth[®]). A suspensão do inóculo foi filtrada em gaze esterilizada, submetida a um banho de ultrassom com frequência de 40 KHZ por 5 minutos e,

posteriormente adicionado 10 mL aos Erlenmeyers contendo os meios de cultivo. Os Erlenmeyers foram incubados em Shaker Orbital (Solab[®] com diâmetro de órbita de 28 mm) com temperatura constante de 28 °C e fotoperíodo de 12 horas. Para a manutenção do nível de oxigênio necessário nos meios de cultivo foi aplicada uma agitação constante de 250 rpm, por sete dias. Foram realizadas três repetições divididas no tempo. De cada Erlenmeyer foram retiradas cinco alíquotas de 10 mL (uma a cada 24 horas) para determinar o pH, o número de conídios produzidos, a biomassa e as unidades formadoras de colônias – UFC. A primeira alíquota foi retirada 72 horas após a transferência do fungo no meio de cultura.

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental com desenho do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais para otimização da produção de conídios, unidades formadoras de colônia e biomassa fúngica seca de *Clonostachys rosea* em meio líquido. (-1) para o nível inferior e (+1) para o nível superior.

Tratamento	X₁	X₂	X₃	X₄	X₅	X₆
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0

Legenda: X₁: Relação C:N; X₂: Ca; X₃: Fe; X₄: pH; X₅: C total; X₆ = densidade inicial de inóculo (conídios mL⁻¹).

Fonte: Do autor (2019).

3.2.2 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

Depois de realizada a primeira etapa da fermentação líquida, os dados foram processados e os resultados definiram os parâmetros para a produção do meio basal (Tabela 3), que foi utilizado na próxima etapa do processo. Dentre as variáveis analisadas foram escolhidas as que se sobressaíram na produção de conídios.

Tabela 3 - Parâmetros definidos após a etapa de Plackett e Burman 12 para a produção do meio basal utilizado no delineamento central composto rotacional para a produção de conídios de *Clonostachys rosea* em meio líquido.

Relação C/N	50:1
Ca (g L⁻¹)	1
Fe (mg L⁻¹)	100
pH	6
Carbono total (g L⁻¹)	24
Inóculo Inicial (conídios mL⁻¹)	1x10 ⁵

Fonte: Do autor (2019).

O planejamento do tipo DCCR foi realizado visando estudar somente dois fatores: variação do pH e diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo (Tabela 4). As variações do pH foram realizadas após medição com 72 horas da inoculação e seu valor corrigido de acordo com o tratamento utilizando soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de potássio (KOH) na concentração de 1N.

Tabela 4 - Variáveis e seus valores codificados e reais utilizados no delineamento composto central rotacional para otimização da produção de propágulos de *Clonostachys rosea* em cultivo líquido submerso.

Variável	Código	-1	0	1
Variação no pH	X ₁	3,5	6	8,5
Fonte de nitrogênio	X ₂	Farinha de algodão	Extrato de levedura	Ureia

Fonte: Do autor (2019).

O delineamento foi disposto como um fatorial 2², composto por 13 ensaios, sendo cinco pontos centrais e utilizando com o valor de $\alpha = 1$. Na Tabela 5 está representada a

matriz do planejamento DCCR com os valores codificados. O valor de α faz que todos os pontos sejam equidistantes dos pontos centrais.

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental tipo delineamento central composto rotacional com cinco pontos centrais e $\alpha = 1$ para a produção de conídios de *Clonostachys rosea* em meio líquido. (-1) para o nível inferior e (+1) para o nível superior.

Tratamento	X₁	X₂
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1	0
6	1	0
7	0	-1
8	0	1
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

Legenda: X₁: Variação do pH; X₂: Fonte de nitrogênio.

Fonte: Do autor (2019).

Neste ensaio foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL com três defletores basais e adicionados 90 mL do meio com as diferentes fontes de nitrogênio e o pH ajustado a 6. Após a autoclavagem dos Erlenmeyers contendo os 90 ml de meios e pH ajustados foram adicionados 10 mL de inóculo (concentração final de 1×10^5 conídios mL⁻¹). O inóculo foi obtido conforme descrito anteriormente. Os Erlenmeyers foram incubados em Shaker Orbital (Solab[®] com diâmetro de órbita de 28 mm) com temperatura constante de 28 °C e fotoperíodo de 12 horas e agitação constante de 250 rpm, por sete dias. Foram realizadas três repetições divididas no tempo. Cinco alíquotas de 10 mL (uma a cada 24 horas) foram retiradas de cada Erlenmeyer para avaliação do pH, número de conídios produzidos, biomassa, unidades formadoras de colônias e microescleródios. A primeira alíquota foi retirada 72 horas após a inoculação.

3.2.3 Scale-up: produção de conídios em biorreator de bancada

Os fatores que apresentaram os melhores resultados para a produção de conídios foram selecionados e utilizados em biorreatores automatizados de bancada de 3 L (Eppendorf[®], BioFlo 115, Alemanha). Foi adicionado na dorna do biorreator 1,8 L do meio de cultivo com os parâmetros definidos após o DCCR (Tabela 6) e 0,2 L de suspensão com inóculo (1×10^6 conídios mL⁻¹). Mantida a 0,5 v/vm (volume de ar por minuto por volume de meio de cultura) por seis dias e agitação de 300 rpm.

Tabela 6 - Parâmetros utilizados na fermentação líquida submersa de *Clonostachys rosea* em biorreator automatizados de bancada de 3 L (Eppendorf[®], BioFlo 115, Alemanha), para a produção de conídios de *Clonostachys rosea* após a realização do DCCR.

Relação C/N	50:1
Ca (g L⁻¹)	1
Fe (mg L⁻¹)	100
pH (sem variação externa)	6
Carbono total (g L⁻¹)	24
Inóculo inicial (conídios mL⁻¹)	1×10^5
Fonte de nitrogênio	Extrato de Levedura

Fonte: Do autor (2019).

3.3 Avaliação do rendimento de conídios, unidades formadoras de colônias, produção de microescleródios e biomassa.

A concentração de conídios foi determinada em câmara de Neubauer espelhada de volume 0,1 mm³. Após diluições seriadas de uma amostra do fermentado em solução salina esterilizada com polisorbato 80 a 0,05% (Synth[®]). Uma alíquota da suspensão foi transferida para a câmara de Neubauer, mantida em repouso por um minuto antes de se iniciar a contagem em microscópio de luz utilizando a lente 400x. A contagem foi efetuada nos quatro quadrantes de campo um (1) nos dois lados da câmara de Neubauer. Após a contagem dos oito quadrados foi retirada a média da contagem. Para as fermentações dos itens [3.2.1](#) e [3.2.2](#), as contagens com 72 e 96 horas foram realizadas com a diluição 10^{-2} para as contagens subsequentes foi utilizada a diluição de 10^{-3} . Para a fermentação do item [3.3](#) foi utilizado a diluição de 10^{-3} . A determinação das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada em placas de 90 x 15 mm (três placas por tratamento) contendo 10 mL de BDA com Triton[®] (0,1%) por placa. O propósito da utilização do Triton[®] foi diminuir a velocidade de

crescimento das colônias, facilitando assim a visualização e contagem. Após a diluição seriada das amostras obtidas nas fermentações foram pipetados nas placas 100 μL da suspensão de *C. rosea* na diluição de 10^{-4} e disperso pela placa de Petri com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Os dados foram coletados 48 horas após a incubação das placas. Para a quantificação da biomassa seca produzida, no sétimo dia de fermentação, todo o volume restante dos Erlenmeyer foi transferido para filtro de papel (previamente pesado e seco) e filtrado utilizando Kitassato com funil de Büchner ligados a uma bomba de filtração a vácuo. Em seguida, os papéis de filtro foram mantidos em estufa a 50 °C \pm 2, até peso constante. Após o tempo de secagem, os papéis de filtro foram pesados e por sua diferença da massa foi determinada a biomassa seca. Para medir o pH foi utilizado um pHmetro Hanna® de bancada previamente calibrado. Foram adicionados e homogeneizados 10 mL da suspensão contendo *C. rosea*. Foram realizadas cinco leituras a cada 24 horas a partir de 72 horas da incubação. Para a fermentação do item [3.2.3](#) a leitura foi aferida a cada 60 segundos. A contagem dos microescleródios foi realizada em lâminas de microscopia de 26 por 76 mm com adição de 100 μL da suspensão de *C. rosea* na diluição 10^{-1} e coberta com uma lamínula de vidro translúcida de 24 por 50 mm. Para estabelecer o número de microescleródios formados, em microscópio de luz utilizando a lente 40x, contou-se toda área coberta pela lamínula. As suspensões utilizadas na contagem de microescleródios foram as obtidas nos itens [3.2.2](#) e [3.2.3](#)

3.4 Fermentação de *Clonostachys rosea* em meio sólido (arroz)

A fermentação de *C. rosea* em substrato sólido foi realizada em arroz parboilizado. Um quilo do arroz foi colocado de molho em água destilada (1:1) por 16 horas quando o excesso de água presente no arroz foi retirado com o auxílio de uma peneira. Foram pesadas alíquotas de 250 g do arroz e colocados em saco de polipropileno autoclaváveis (22x32 cm) que foi fechado e grampeado separadamente três vezes. Os sacos de polipropileno foram autoclavados por 20 minutos à 121 °C e 1 atm. Em câmara de fluxo, 10 mL de uma suspensão de *C. rosea* contendo 1×10^7 conídios mL^{-1} foi injetada com uma seringa esterilizada. O arroz foi incubado em sala de crescimento à temperatura de 25 °C (\pm 5 °C) por 10 dias.

Transcorrido o período, em uma câmara de fluxo, foi aberto um orifício e colado papel de filtro esterilizado cobrindo toda a área aberta formando uma janela. Esses sacos de polipropileno foram mantidos em sala de crescimento por mais 20 dias. A cada dois dias os sacos foram revolvidos para melhor secagem dos grãos. Passados 30 dias desde a inoculação,

uma amostra de 1 g do arroz foi coletada, colocada em um tubo Falcon de 50 mL contendo 9 mL de uma solução salina esterilizada com polisorbato 80 a 0,05% (Synth®). O tubo Falcon foi agitado e colocado em banho de ultrassom com frequência de 40 KHZ por 5 minutos, em seguida o conteúdo foi filtrado em gaze esterilizado e realizada as diluições seriadas para a obtenção do número de conídios produzidos e unidades formadoras de colônias.

3.5 Testes de antagonismo

3.5.1 *Clonostachys rosea* vs. *Botrytis cinerea*

Para avaliar a ação do *C. rosea obtido* da fermentação obtida no item 3.2.3 contra *B. cinerea* foi utilizada a metodologia proposta por Morandi, Sutton e Maffia (2000). Dez discos de 1 cm de diâmetro de folhas de morangueiro da variedade San Andreas foram superficialmente desinfestados e secos em câmara de fluxo e transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm (Craplast®) contendo 10 mL de meio paraquat-cloranfenicol-ágar (PCA). 20 µL da suspensão de *C. rosea*, com concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹, foram dispostos sob cada disco e a placa incubada por 24 horas em BOD Eletrolab® a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas, em câmara de fluxo, os discos foram inoculados com 20 µL de uma suspensão a 1×10^4 conídios mL⁻¹ de *B. cinerea*. Em seguida, as placas foram incubadas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Passados dez dias de incubação, foi avaliada a área com esporulação de *C. rosea* seguindo a metodologia de escalas de notas propostas por Nobre et al. (2005), onde as notas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem a colonização foliar por *C. rosea* em 0%, 0-3%, 3-6%, 6-12%, 12-25%, 25-37%, 37-50% e >50% do disco, respectivamente. O ensaio foi realizado com seis tratamentos (Tabela 7) com nove repetições cada e dez parcelas em cada repetição (discos de folha do morangueiro).

Tabela 7 - Ensaio de colonização foliar do morangueiro com *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea*.

Código	Tratamento	Concentração (conídios mL ⁻¹)
A	Água destilada	-
B	<i>B. cinerea</i>	1×10^4
C	<i>C. rosea</i> (Fermentação líquida)	1×10^6
D	<i>C. rosea</i> (Fermentação sólida)	1×10^6
CB	<i>C. rosea</i> (Fermentação líquida) x <i>B. cinerea</i>	1×10^6 ; 1×10^4
AC	<i>C. rosea</i> (Fermentação sólida) x <i>B. cinerea</i>	1×10^6 ; 1×10^4

Fonte: Do autor (2019).

3.5.2 *Clonostachys rosea* vs. *Sclerotinia sclerotiorum*

O bioensaio de parasitismo de *C. rosea* em *S. sclerotiorum* foi adaptado de Geraldine et al. (2013) e realizado em caixa plástica Gerbox (desinfestada com hipoclorito de sódio a 2%, álcool 70% e luz UV), com 250 g de solo e areia (na proporção 1:1) autoclavados e com a umidade em 100% da sua capacidade de campo. O solo e a areia foram autoclavados por três vezes a 121 °C e 1 atm por 40 minutos, em dias consecutivos (HUANG e ERICKSON, 2008), efetuando-se a terceira autoclavagem um dia antes da montagem dos experimentos. Após a distribuição de 20 escleródios por gerbox foram aplicados 10 mL da suspensão de *C. rosea* produzida no item 3.2.3 nas concentrações de 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 conídios mL^{-1} , também foram aplicados 10 mL da suspensão de *C. rosea* produzido em arroz parboilizado (3.4) na concentração de 1×10^7 conídios mL^{-1} e 10 mL de água destilada no tratamento controle. As caixas plásticas foram incubadas por 15 dias em B.O.D (Eletrolab[®]) a $20 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ e fotoperíodo de 12 horas, quando os escleródios foram removidos das caixas e desinfestados superficialmente com etanol (70%) e hipoclorito de sódio (2%), e mergulhados em água autoclavada três vezes. Para verificar a viabilidade dos escleródios de *S. sclerotiorum* os mesmos foram colocados em meio Neon-S (1 L de água; 40g de BDA Difco[®], 50 mg de azul de bromofenol, 50 mg de cloranfenicol, 50 mg de ácido livre 2,4-D) (NAPOLEÃO et al., 2006). Este meio tem como propriedade a mudança de cor após a germinação do *S. sclerotiorum*. A avaliação foi realizada sete dias após a incubação das placas de Petri com o meio Neon-S.

3.5.3 *Clonostachys rosea* vs. *Bemisia tabaci*

O bioensaio de antagonismo de *C. rosea* sobre *B. tabaci* foi realizado utilizando a metodologia adaptada de Müller et al. (2018), onde folíolos de tomateiro foram cortados e mergulhados nas suspensões dos tratamentos descritos na Tabela 8 por cinco segundos com ligeira agitação e deixado secar por 30 minutos em papel absorvente nas bandejas. O folíolo tratado e seco de cada pecíolo foi inserido em um tubo de fundo plano (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura) contendo dois cm e espuma fenólica úmida. Os tratamentos foram organizados em blocos casualizados com 10 repetições (tubos) cada e cada folíolo foi infestado com dez adultos de mosca branca com idades entre 5 e 7 dias de uma colônia de laboratório. Após a infestação, cada tubo foi fechado com tela de náilon anti-afídeo preta (malha de 0,64 x 0,20 mm) e fixada com elásticos de látex. Os tubos foram colocados em uma

sala climática a 28 ± 1 °C, $50 \pm 10\%$ de umidade relativa e um fotoperíodo de 14 horas de luz. A mortalidade porcentual foi avaliada por sete dias a cada 24 horas.

Tabela 8 – Tratamentos, códigos e concentração utilizada no ensaio de antagonismo do *Clonostachys rosea* sob *Bemisia tabaci* biótipo b em folíolos de tomateiro. Com 10 repetições por tratamento e 10 moscas de 5 a 7 dias de idade por repetição.

Código	Tratamento	Concentração aplicada
X1	Água destilada	-
X2	Água destilada + Tween 80 (0,05%)	-
X3	<i>C. rosea</i> (Fermentação líquida)	1×10^8 (conídios mL ⁻¹)
X4	<i>C. rosea</i> (Fermentação sólida)	1×10^8 (conídios mL ⁻¹)
X5	Benevia®	500 mL/ha

Fonte: Do autor (2019).

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com os softwares estatísticos SISVAR[®], R[®] e Minitab[®] Statistical Software. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e, quando necessário, foram realizadas as devidas transformações. Com os diagramas de Pareto e gráficos de contorno e gráficos de superfície de resposta foram selecionados os fatores significativos ($P < 0,05$) para os ensaios fermentativos. Os dados de antagonismo e mortalidade foram analisados usando ANOVA e a separação das médias pelo teste de Scott-Knott comparando os métodos de bioensaio.

4 RESULTADOS

Com observações em microscópios de luz foi possível identificar, além dos conídios, a produção de mais três tipos de propágulos durante todo o processo da fermentação líquida de *Clonostachys rosea*: conídios, micélio e microescleródios. Foi o primeiro relato de produção de microescleródios de *C. rosea*.

4.1 Ensaio inicial (Plackett e Burman 12)

Na fermentação líquida inicial de *Clonostachys rosea* em Erlenmeyers de 250 mL com três defletores basais a maior produção de conídios ocorreu nos tratamentos centrais. A maior média de concentração de conídios obtida foi de $7,39 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ com 144 horas de fermentação. Na Tabela 9 e Figura 1 são apresentados os números de conídios produzidos quantificados em câmara de Neubauer. Com 168 horas de incubação foi verificado que, na

maioria dos tratamentos, houve um decréscimo na quantidade de conídios nos meios de cultivo quando comparados a avaliação com 144 horas de incubação.

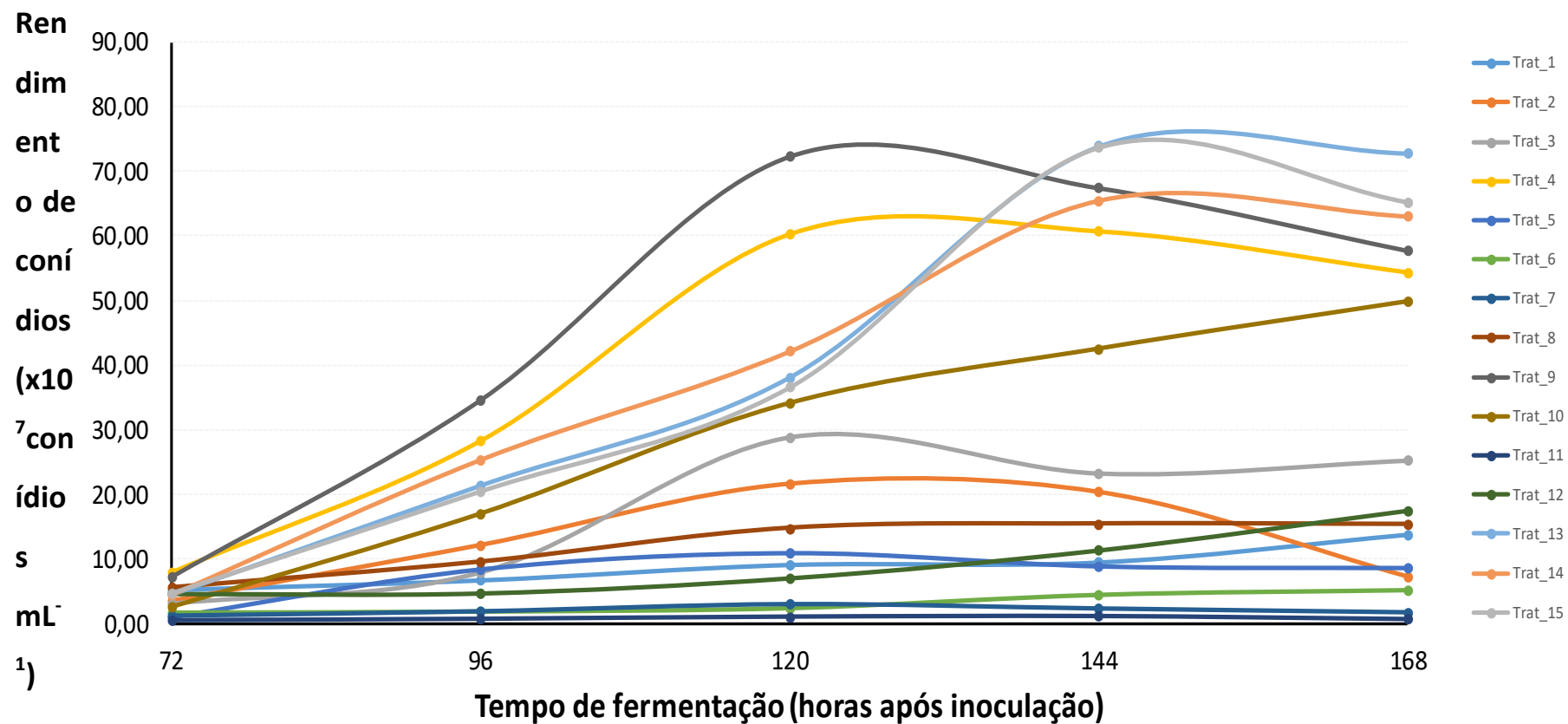
Tabela 9 – Rendimento da produção de conídios de *Clonostachys rosea* obtidos em três tempos de fermentação líquida – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).

Tratamentos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Conídios mL ⁻¹	Conídios mL ⁻¹	Conídios mL ⁻¹
							(120 h)	(144 h)	(168 h)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	9,13 x 10 ⁷	9,50 x 10 ⁷	1,37 x 10 ⁸
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	2,17 x 10 ⁸	2,04 x 10 ⁸	7,21 x 10 ⁷
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	2,88 x 10 ⁸	2,32 x 10 ⁸	2,52 x 10 ⁸
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	6,03 x 10 ⁸	6,07 x 10 ⁸	5,43 x 10 ⁸
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	1,09 x 10 ⁸	8,88 x 10 ⁷	8,63 x 10 ⁷
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	2,38 x 10 ⁷	4,50 x 10 ⁷	5,25 x 10 ⁷
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	3,08 x 10 ⁷	2,38 x 10 ⁷	1,75 x 10 ⁷
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	1,47 x 10 ⁸	1,54 x 10 ⁸	1,53 x 10 ⁸
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	7,23 x 10 ⁸	6,74 x 10 ⁸	5,77 x 10 ⁸
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	3,40 x 10 ⁸	4,25 x 10 ⁸	4,98 x 10 ⁸
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	1,04 x 10 ⁷	1,13 x 10 ⁷	6,70 x 10 ⁶
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	7,00 x 10 ⁷	1,12 x 10 ⁸	1,74 x 10 ⁸
13	0	0	0	0	0	0	3,81 x 10 ⁸	7,39 x 10 ⁸	7,28 x 10 ⁸
14	0	0	0	0	0	0	4,21 x 10 ⁸	6,55 x 10 ⁸	6,30 x 10 ⁸
15	0	0	0	0	0	0	3,65 x 10 ⁸	7,37 x 10 ⁸	6,52 x 10 ⁸

Legenda: X₁: Relação C:N; X₂: Ca; X₃: Fe; X₄: pH; X₅: C total; X₆ = Densidade inicial de inóculo (conídios mL⁻¹).

Fonte: Do autor (2019).

Figura 1 - Evolução das concentrações de conídios de *Clonostachys rosea* produzidos em fermentação líquida submersa por tratamentos a cada 24 horas. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais. Os dados dos tratamentos são apresentados na Tabela 9.



Fonte: Do autor (2019).

Para as unidades formadoras de colônias (UFC), os tratamentos com os valores centrais também se destacaram, com a maior contagem de 5×10^7 UFC.mL⁻¹. A maior produção de biomassa fúngica seca de *C. rosea* foi observada no tratamento 5, com 0,91 gramas de biomassa a cada 50 mL de meio de cultivo (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados da produção das unidades formadoras de colônia e biomassa fúngica seca de conídios de *Clonostachys rosea* – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).

Tratamentos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	UFC mL ⁻¹	Biomassa (g)*
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	$5,00 \times 10^7$	0,6100
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	$5,87 \times 10^6$	0,7567
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	$2,68 \times 10^7$	0,7433
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	$5,00 \times 10^7$	0,2367
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	$4,82 \times 10^7$	0,9100
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	$3,44 \times 10^7$	0,4100
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	$1,30 \times 10^7$	0,2233
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	$4,18 \times 10^7$	0,2600
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	$1,04 \times 10^7$	0,2833
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	$4,90 \times 10^7$	0,4367
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	$3,32 \times 10^7$	0,4700
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	$4,78 \times 10^7$	0,4633
13	0	0	0	0	0	0	$4,44 \times 10^7$	0,6933
14	0	0	0	0	0	0	$5,00 \times 10^7$	0,7933
15	0	0	0	0	0	0	$5,00 \times 10^7$	0,7233

Legenda: X₁; Relação C:N; X₂: Ca; X₃: Fe; X₄: pH; X₅: C total; X₆ = Densidade inicial de inóculo (conídios mL⁻¹).
 (*) Biomassa seca para 50 mL de meio cultivo.

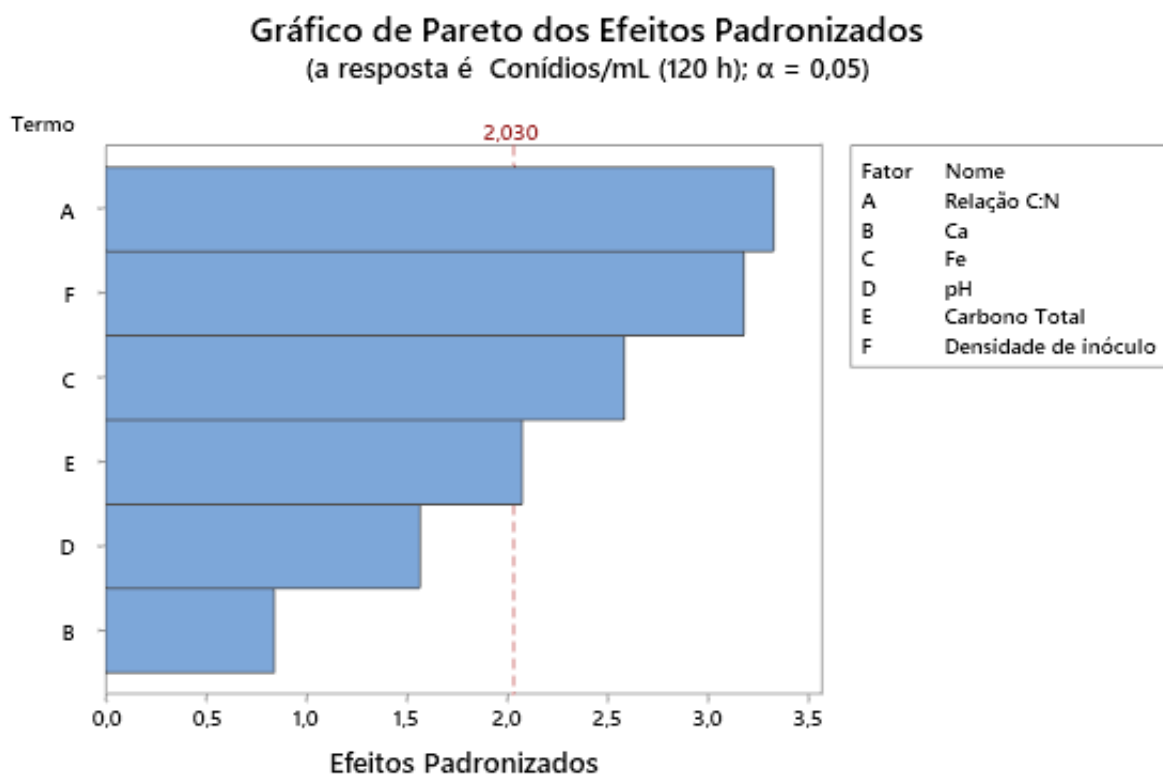
Fonte: Do autor (2019).

Os diagramas de Pareto com os efeitos padronizados das variáveis testadas sobre a produção de conídios após 120, 144 e 168 horas da inoculação estão apresentados nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente. Os efeitos que se ultrapassam a linha de referência são considerados significativos. Nas Figuras 2 e 3 pode ser observado que os fatores significativos para o número de conídios mL⁻¹, produzidos após 120 e 144 horas de incubação foram a relação C:N, a densidade de inóculo, o carbono total e o Fe. O pH inicial do meio de cultivo foi significativo dentro da faixa estudada apenas para a produção com 168 horas de fermentação.

O teor de Ca no meio de cultura não foi significativo em nenhum tempo de avaliação para a produção de conídios. Com isso foram fixados para a etapa seguinte o menor valor de Ca e o pH 6, o qual foi selecionado por ser o natural do meio de cultivo utilizando o extrato de levedura como fonte de nitrogênio e não ser estatisticamente relevante nos tempos de maior produção de conídios.

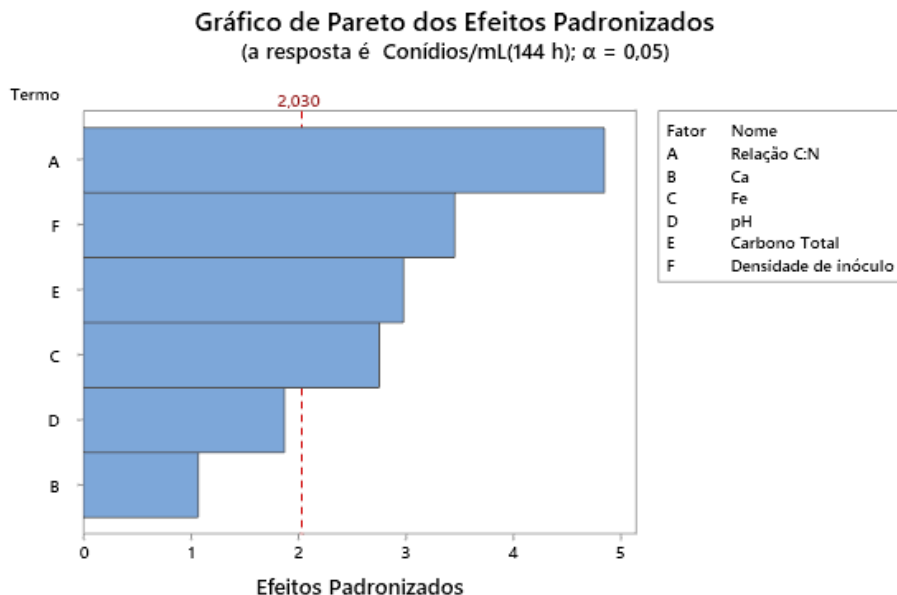
Para as unidades formadoras de colônia os fatores significativos encontrados através do Minitab® Statistical (Figura 5) diferiram do encontrado para biomassa seca (Figura 6), sendo que os fatores significativos para a UFC foram a relação C:N, o teor de Fe e a densidade inicial de inóculo, destes três apenas a relação C:N foi significativa para a biomassa seca, que também teve como fatores significativos o carbono total no meio e o teor de Ca.

Figura 2 - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados e a significância das variáveis para o rendimento de conídios mL^{-1} de *Clonostachys rosea* produzido meio líquido submerso com 120 horas após a inoculação. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm.



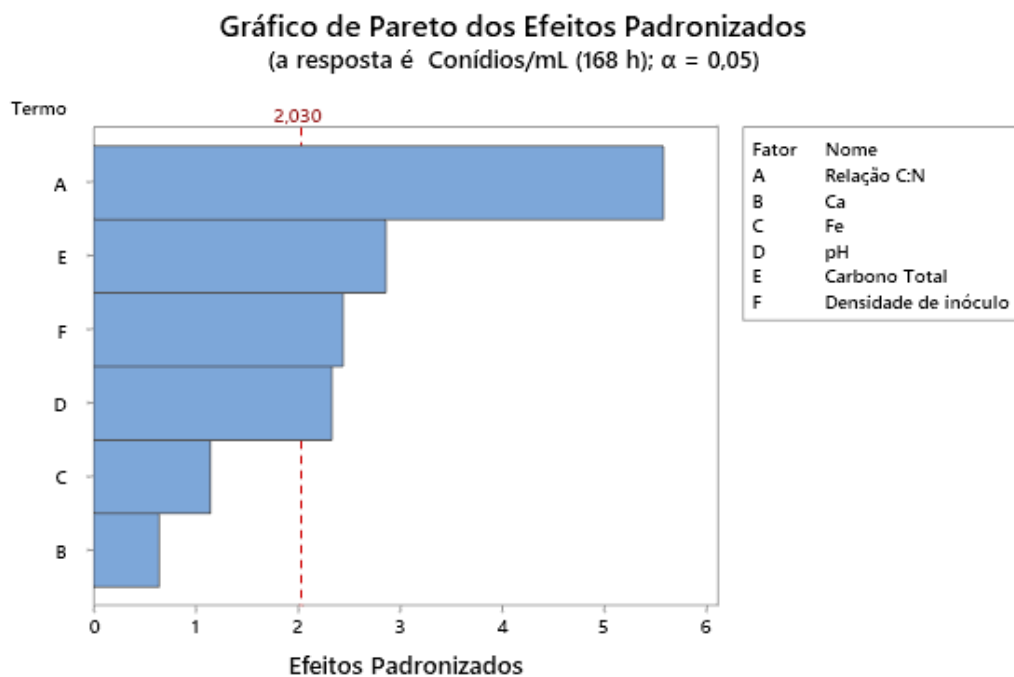
Fonte: Do autor (2019).

Figura 3 - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados e a significância das variáveis para a produção de conídios mL^{-1} de *Clonostachys rosea* produzido meio líquido submerso com 144 horas após a inoculação. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm.



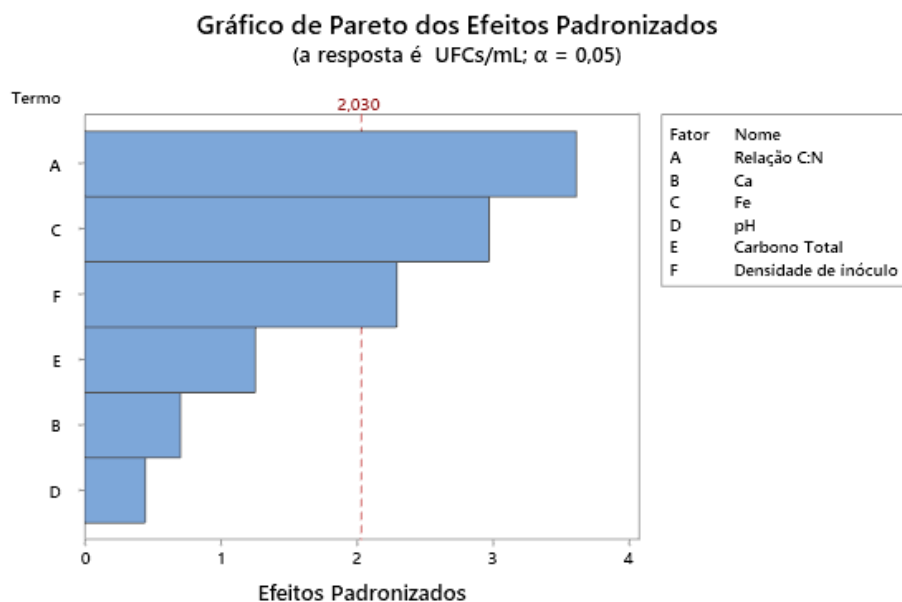
Fonte: Do autor (2019).

Figura 4 - Gráfico dos efeitos padronizados e a significância das variáveis para o rendimento de conídios mL^{-1} de *Clonostachys rosea* produzido via fermentação líquida submersa após 168 a inoculação. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm.



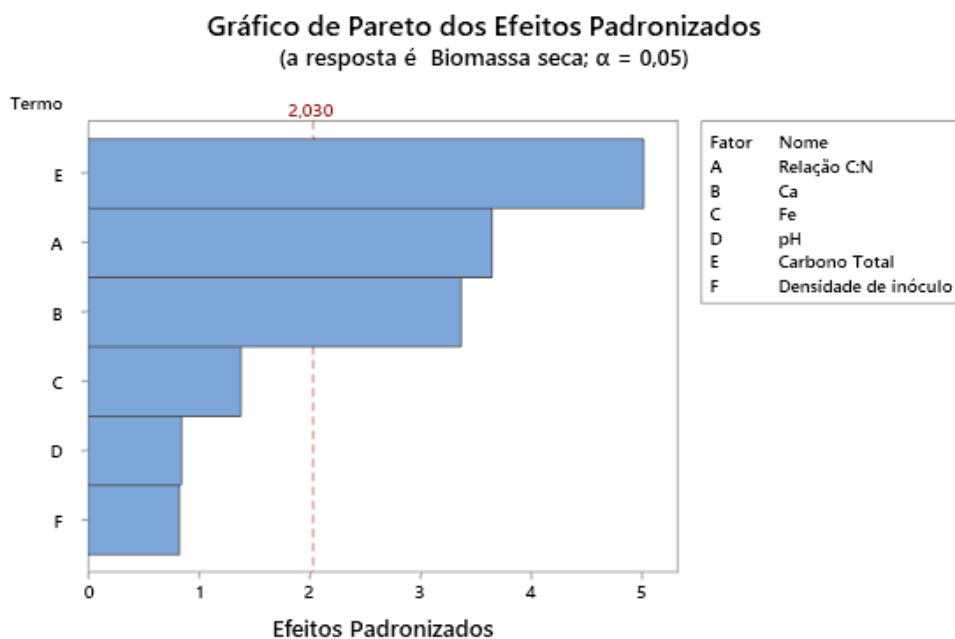
Fonte: Do autor (2019).

Figura 5 - Gráfico dos efeitos padronizados e a significância das seis variáveis testadas para a produção de unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* produzido via fermentação líquida submersa. Contagem realizada 48 horas após a incubação das placas de Petri com meio BDA+Triton.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 6 - Diagrama de Pareto com a significância dos fatores para a biomassa fúngica seca de *C. rosea* ao final da fermentação líquida. Biomassa seca em filtro de papel (previamente pesado e seco) mantidos em estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, até peso constante.

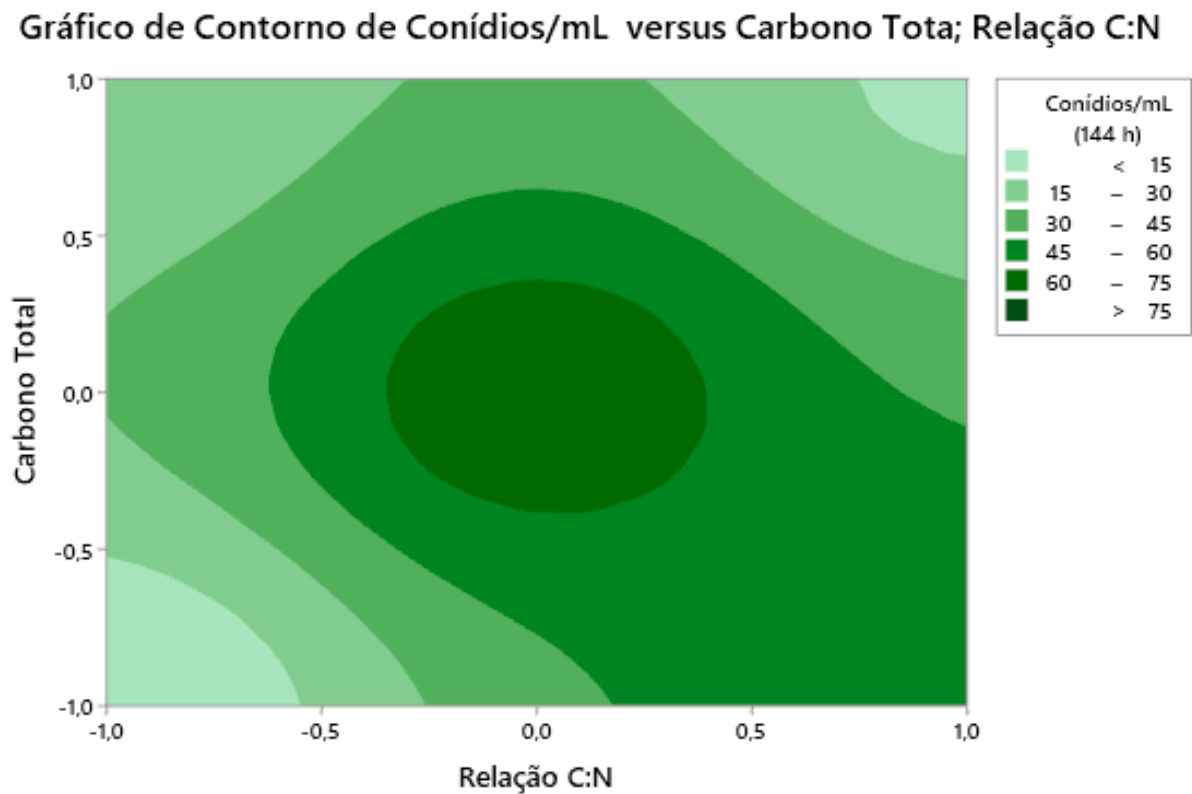


Fonte: Do autor (2019).

No gráfico de superfícies de contorno (Figura 7) foram observadas as respostas da variável conídios mL⁻¹ após 144 horas da incubação e como se relaciona com dois fatores

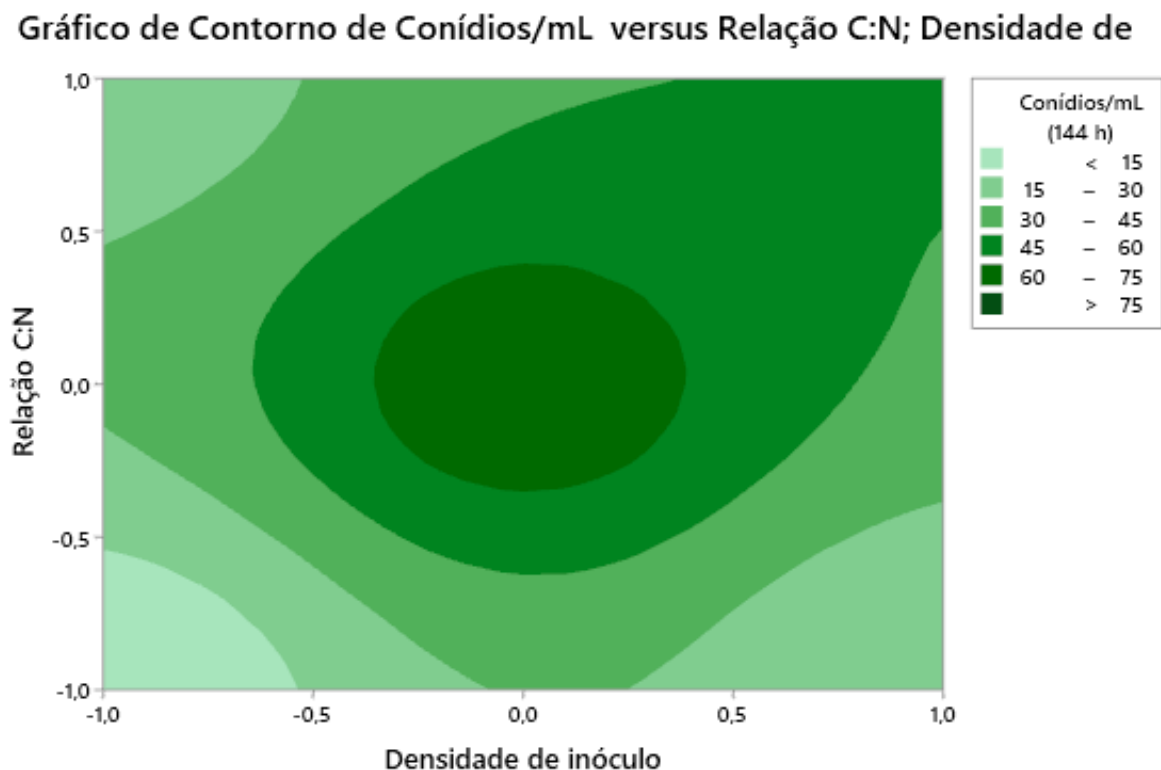
preditores, relação C:N e carbono total no meio de cultivo. Neste gráfico, as regiões verde-escuras indicam maior concentração de conídios mL^{-1} e as regiões verde-claras, os menores valores. A interação entre relação C:N e densidade inicial de inóculo e as respostas da variável conídios mL^{-1} após 144 horas da incubação é exposta na Figura 8. De acordo com as Figura 7 e 8, a região ótima para a produção de conídios está dentro dos valores centrais. A região central do gráfico indica os valores centrais do planejamento experimental com desenho do tipo Plackett-Bruman 12 (Relação C:N, 50:1, 24 g/L de carbono total e densidade de inóculo inicial de 1×10^5 conídios mL^{-1}).

Figura 4 - Gráficos de contorno gerado pelo modelo proposto para rendimento de conídios mL^{-1} de *Clonostachys rosea* com 144 horas de fermentação. Carbono total no meio de cultivo vs. relação C:N. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).



Fonte: Do autor (2019).

Figura 5 - Gráficos de contorno gerado pelo modelo proposto para rendimento de conídios mL^{-1} de *Clonostachys rosea* com 144 horas de fermentação. Relação C:N vs. densidade inicial de inóculo. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).

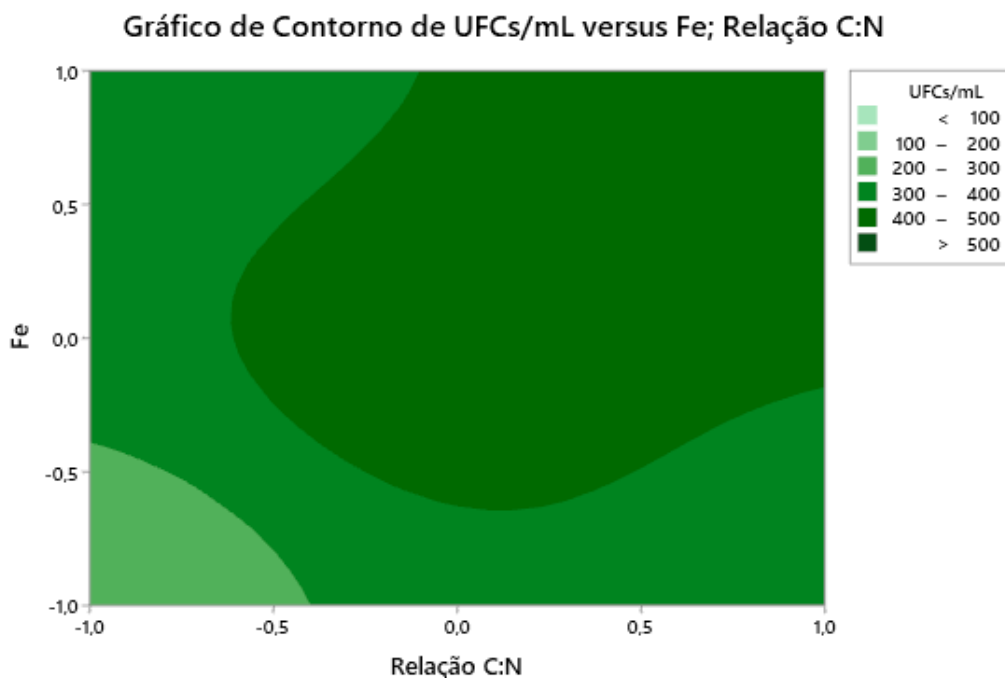


Fonte: Do autor (2019).

Na Figura 9 são apresentadas as respostas da variável UFC mL^{-1} a qual foi influenciada pelo teor de Fe e relação C:N do meio. Neste gráfico, a região ótima para a de unidades formadoras de colônias está entre o valor central e superior (Relação C:N entre 50:1 e 80:1, e Fe entre 100 mg L^{-1} e 150 mg L^{-1}).

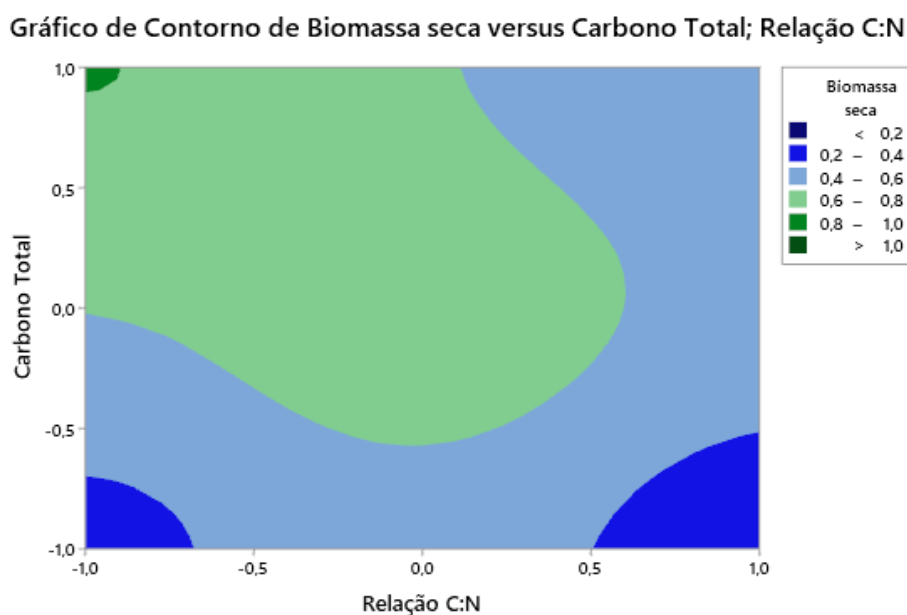
Para a produção de biomassa (Figura 10) foi observada interação entre a quantidade total de carbono no meio e a relação C:N no gráfico de contorno. A produção de biomassa foi diretamente proporcional à quantidade de carbono (Figura 10), porém, essa produção é limitada pela relação C:N do meio de cultivo. O tratamento onde o meio de cultivo com a maior quantidade de carbono e a menor relação C:N se sobressai na biomassa produzida quando comparada aos demais.

Figura 6 - Gráfico de contorno das unidades formadoras de colônias formadas de *Clonostachys rosea* com a partir da interação entre relação C:N e teor de Fe no meio de cultivo. Contagem realizada 48 horas após a incubação das placas de Petri com meio BDA+Triton. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).



Fonte: Do autor (2019).

Figura 7 - Gráfico de contorno gerado pelo modelo proposto. Biomassa fúngica seca para relação C:N vs. carbono total no meio de cultivo. Nível inferior (-1) e nível superior (+1). Biomassa seca em filtro de papel (previamente pesado e seco) mantidos em estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, até peso constante.



Fonte: Do autor (2019).

Na Tabela 11 é apresentado o resumo da análise de variância dos dados obtidos no Plackett e Burman 12 (Tabelas 9 e 10). Com o estudo dos gráficos de contorno e dos fatores significativos foi definido os parâmetros para a construção do meio de cultivo que foi utilizado no DCCR. O foco da otimização via DCCR foi maximizar a produção de conídios e diminuir o tempo para atingir o ápice da produção. Os fatores definidos estão descritos na Tabela 3 do item 3.2.2.

Tabela 11 - Resumo da análise da produção de conídios de *Clonostachys rosea* obtidos em três tempos de fermentação líquida submersa, unidades formadoras de colônia (UFC), biomassa fúngica seca – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 25 °C e 250 rpm e três repetições no tempo. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).

	120 h		144 h		168 h		UFCs		Biomassa	
	Valor-P	Valor-T	Valor-P	Valor-T	Valor-P	Valor-T	Valor-P	Valor-T	Valor-P	Valor-T
Relação C:N	0,002*	3,33	0,000*	4,85	0,000*	5,58	0,001*	3,61	0,001*	-3,65
Ca	0,405	0,84	0,292	1,07	0,523	0,65	0,485	-0,71	0,002*	3,37
Fe	0,014	-2,58	0,009*	-2,75	0,259	-1,15	0,005*	2,97	0,176	1,38
pH	0,126	-1,57	0,069	-1,87	0,025*	-2,33	0,657	-0,45	0,404	-0,84
Carbono total	0,045*	-2,08	0,005*	-2,98	0,007*	-2,86	0,217	1,26	0,000*	5,02
Densidade de inóculo	0,003*	3,18	0,001*	3,46	0,020*	2,45	0,028*	-2,29	0,415	0,83

Fonte: Do autor (2019).

4.2 Otimização do meio de cultivo via Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

Nos ensaios utilizando o delineamento central composto rotacional foi possível averiguar a interação entre diferentes fontes de carbono e o efeito da mudança abrupta no pH do meio de cultivo. Utilizando o Minitab® Statistical Software, o DCCR determinou a faixa ótima para as variáveis analisadas, permitiu a análise dos gráficos de superfícies de resposta e a validação experimental dos resultados. O tratamento 10 com 120 horas de fermentação apresentou a maior média de produção conídios $7,87 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ (Tabela 12) e o tratamento 12 apresentou a maior biomassa fúngica seca (0,805 g/50 mL) e UFC ($8,52 \times 10^7$ UFC mL⁻¹). Na contagem dos microescleródios, em diferentes tempos de fermentação, o

tratamento 9, com 144 horas de fermentação obteve a maior média ($5,33 \times 10^3$ microescleródios mL^{-1}).

Tabela 12 – Resultado da produção de conídios de *Clonostachys rosea* (em conídios mL^{-1}) dos tratamentos obtidos em cinco tempos de fermentação líquida utilizando o delineamento central composto rotacional com 5 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 28 °C e 250 rpm. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).

Tratamentos	X ₁	X ₂	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
1	-1	-1	$1,03 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,05 \times 10^8$	$3,51 \times 10^8$	$3,20 \times 10^8$
2	1	-1	$1,31 \times 10^8$	$2,17 \times 10^8$	$3,77 \times 10^8$	$3,40 \times 10^8$	$1,70 \times 10^8$
3	-1	1	$2,03 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$	$1,13 \times 10^7$	$4,75 \times 10^7$	$1,75 \times 10^7$
4	1	1	$1,00 \times 10^7$	$1,75 \times 10^7$	$4,50 \times 10^7$	$6,38 \times 10^7$	$1,12 \times 10^7$
5	-1	0	$6,98 \times 10^7$	$2,97 \times 10^8$	$4,77 \times 10^8$	$5,31 \times 10^8$	$4,15 \times 10^8$
6	1	0	$6,38 \times 10^7$	$2,15 \times 10^8$	$3,53 \times 10^8$	$4,38 \times 10^8$	$6,21 \times 10^8$
7	0	-1	$8,00 \times 10^7$	$1,52 \times 10^8$	$2,65 \times 10^8$	$4,06 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$
8	0	1	$1,00 \times 10^7$	$3,25 \times 10^7$	$3,80 \times 10^6$	$2,50 \times 10^6$	$6,25 \times 10^6$
9	0	0	$1,72 \times 10^8$	$3,58 \times 10^8$	$4,75 \times 10^8$	$4,56 \times 10^8$	$3,67 \times 10^8$
10	0	0	$3,78 \times 10^8$	$6,10 \times 10^8$	$7,87 \times 10^8$	$5,42 \times 10^8$	$4,45 \times 10^8$
11	0	0	$1,60 \times 10^8$	$2,92 \times 10^8$	$5,26 \times 10^8$	$4,81 \times 10^8$	$3,96 \times 10^8$
12	0	0	$1,82 \times 10^8$	$3,32 \times 10^8$	$4,31 \times 10^8$	$3,11 \times 10^8$	$3,05 \times 10^8$
13	0	0	$1,45 \times 10^8$	$1,78 \times 10^8$	$2,03 \times 10^8$	$3,67 \times 10^8$	$3,73 \times 10^8$

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 13 - Produção de biomassa fúngica seca, unidades formadoras de colônia (UFC) e microescleródios de *Clonostachys rosea* em fermentação líquida utilizando o delineamento central composto rotacional com 5 pontos centrais. Realizado em Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL, a 28 °C e 250 rpm. Nível inferior (-1) e nível superior (+1).

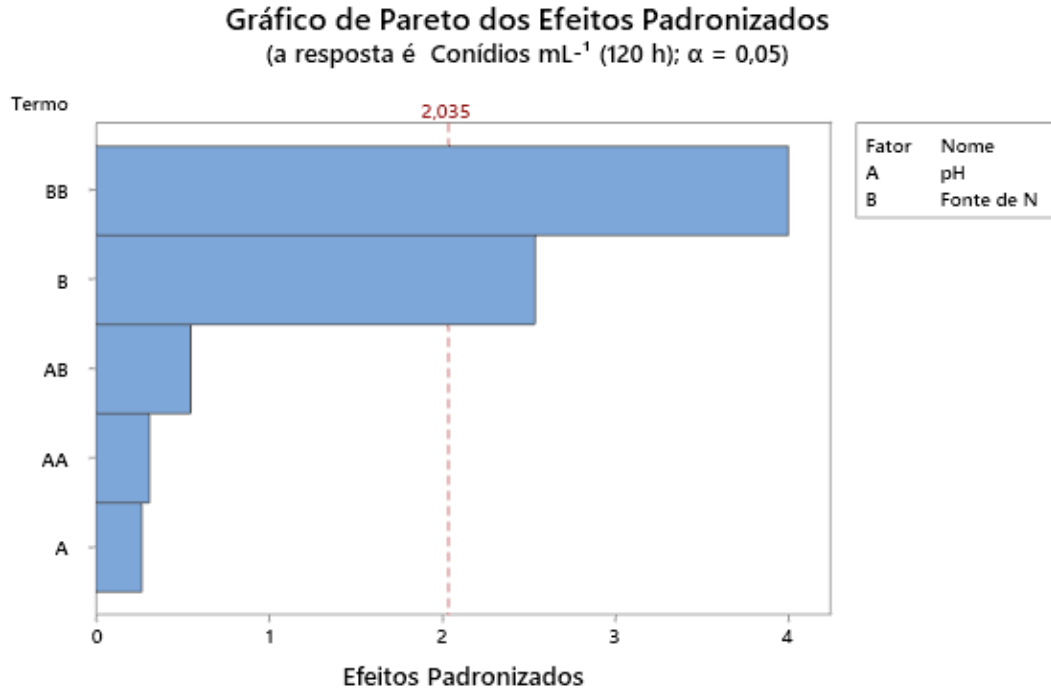
Tratamentos	X ₁	X ₂	Biomassa (g)*	UFC**	ME*** 120 H	ME* 144 h	ME* 168 h
1	-1	-1	0,310	7,35 x 10 ⁷	7,33 x 10 ²	1,13 x 10 ³	1,16 x 10 ³
2	1	-1	0,245	7,85 x 10 ⁷	1,30 x 10 ³	1,70 x 10 ³	6,00 x 10 ²
3	-1	1	0,280	1,34 x 10 ⁶	1,33 x 10 ²	1,00 x 10 ²	0,67 x 10 ²
4	1	1	0,410	6,00 x 10 ⁵	6,70 x 10 ¹	3,00 x 10 ²	1,00 x 10 ²
5	-1	0	0,750	7,78 x 10 ⁷	2,40 x 10 ³	2,76 x 10 ³	3,86 x 10 ³
6	1	0	0,520	7,87 x 10 ⁷	3,00 x 10 ³	2,26 x 10 ³	1,70 x 10 ³
7	0	-1	0,460	6,53 x 10 ⁷	6,67 x 10 ²	1,83 x 10 ³	3,00 x 10 ²
8	0	1	0,310	1,09 x 10 ⁶	2,33 x 10 ²	1,00 x 10 ²	2,33 x 10 ²
9	0	0	0,580	8,43 x 10 ⁷	3,53 x 10 ³	5,33 x 10 ³	3,03 x 10 ³
10	0	0	0,545	7,94 x 10 ⁷	1,26 x 10 ³	2,16 x 10 ³	2,06 x 10 ³
11	0	0	0,745	8,35 x 10 ⁷	2,66 x 10 ³	2,03 x 10 ³	3,16 x 10 ³
12	0	0	0,805	8,52 x 10 ⁷	3,50 x 10 ³	3,36 x 10 ³	2,43 x 10 ³
13	0	0	0,585	8,43 x 10 ⁷	2,23 x 10 ³	4,60 x 10 ³	2,80 x 10 ³

Legenda: * g 50 mL⁻¹; ** Colônias mL⁻¹; *** Microescleródio mL⁻¹

Fonte: Do autor (2019).

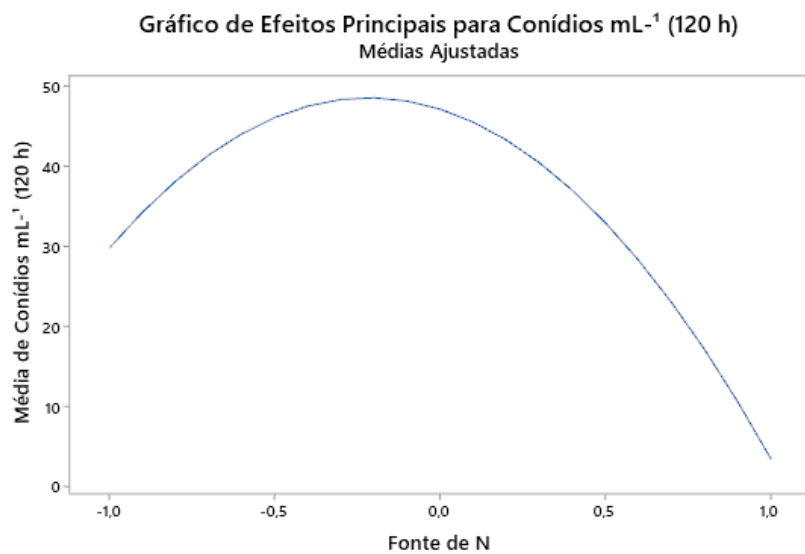
No diagrama de Pareto a seguir (Figura 11), obtido com os dados produzidos na etapa do DCCR (Tabela 12) são observados os efeitos padronizados das variáveis testadas sobre a produção de conídios após 120 horas, no qual somente as fontes de nitrogênio foram estatisticamente significativas (Figura 11) em todos os tempos de contagem. Detalhes dos efeitos de cada nível dos fatores estudados são observados nas Figuras 12 e 13. O uso de extrato de levedura (valor central) sobressaiu das demais fontes de nitrogênio e, em contrapartida, o uso de ureia como fonte de N para a produção de conídios de *C. rosea* foi a mais baixa.

Figura 8 - Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para o rendimento de conídios mL^{-1} de *Clonostachys rosea* em meio líquido após 120 horas da inoculação no DCCR.



Fonte: Do autor (2019).

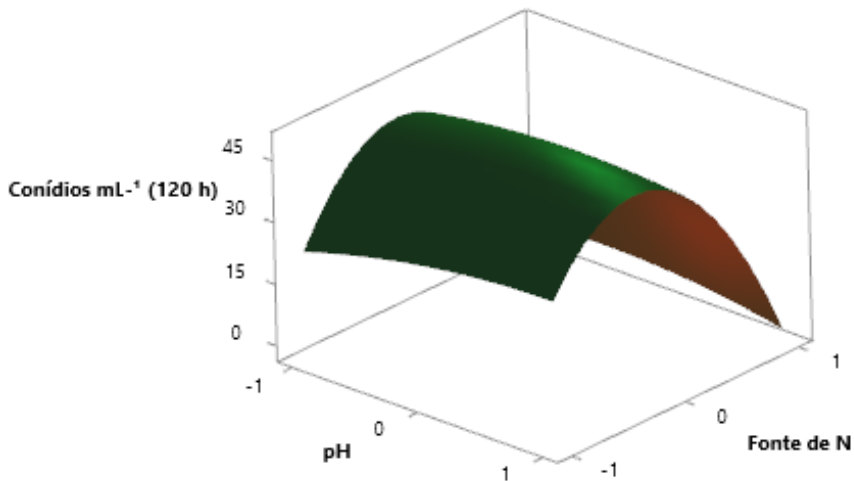
Figura 9 - Gráficos de efeitos principais da influência das diferentes fontes de nitrogênio no rendimento média de conídios com 120 horas fermentação no DCCR com 5 pontos centrais. Farinha de algodão (-1), extrato de levedura (0) e ureia (1).



Fonte: Do autor (2019).

Figura 10 - Gráfico de superfície resposta para o modelo proposto. Concentração de conídios mL^{-1} com 120 horas de fermentação para pH vs. fonte de nitrogênio. (-1) para o nível inferior e (+1) para o nível superior.

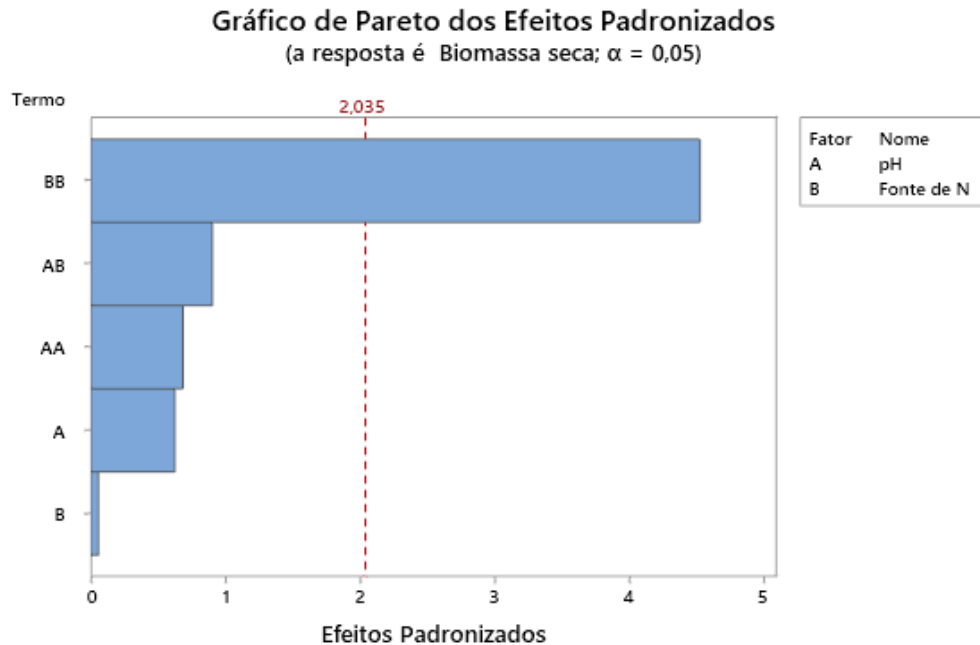
Gráfico de Superfície de Conídios mL^{-1} (120 h) versus Fonte de N; pH



Fonte: Do autor (2019).

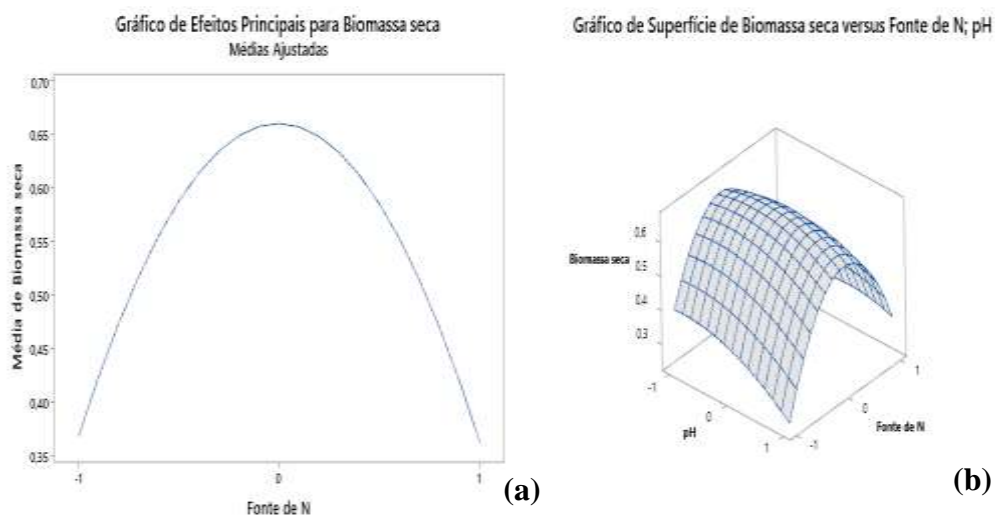
Somente a interação entre as diferentes fontes de nitrogênio foi estatisticamente significativa (Figura 14). Na Figura 15 (a) a diferença entre fontes distintas de nitrogênio na formação de biomassa fúngica seca de *C. rosea* pode ser observada, o valor central da fonte de nitrogênio (extrato de levedura) alcançou as maiores médias de biomassa fúngica. A Figura 15 (b) evidencia que a alteração do pH do meio de cultivo com 72 horas de fermentação não influenciou na formação de biomassa (Figura 15 b).

Figura 11 - Diagrama de Pareto com a significância dos fatores para a biomassa fúngica seca de *C. rosea* ao final da fermentação líquida no delineamento composto central rotacional. Biomassa seca em filtro de papel (previamente pesado e seco) mantidos em estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, até peso constante.



Fonte: Do autor (2019).

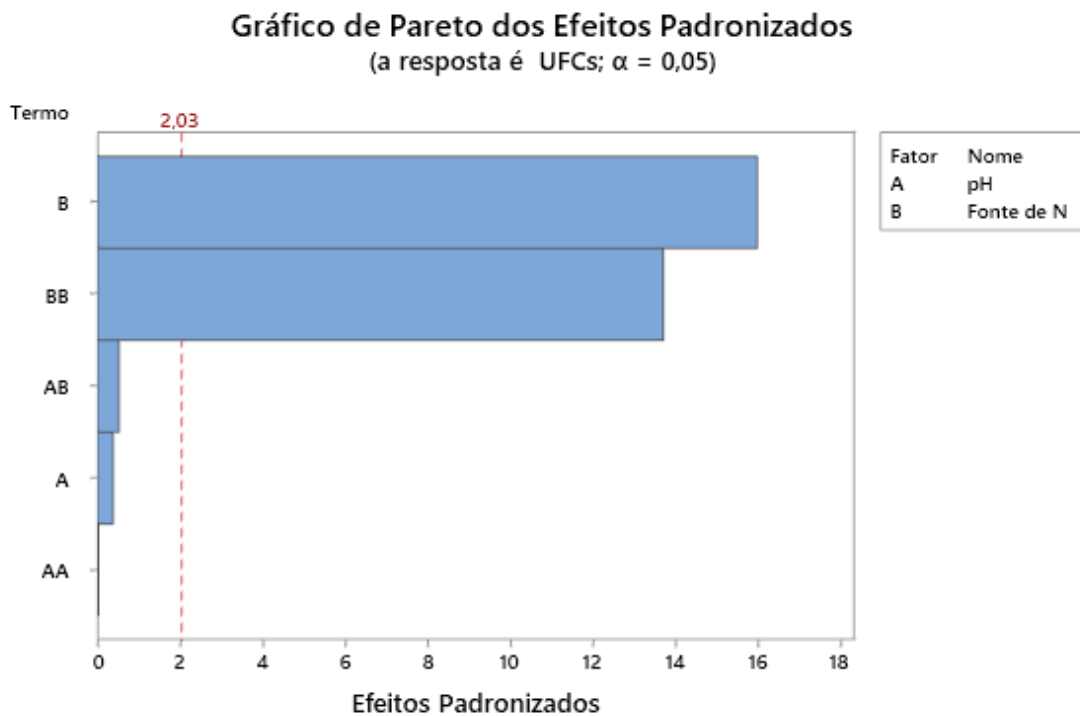
Figura 12 - Gráficos de efeitos principais das diferentes fontes de nitrogênio para a produção de biomassa fúngica seca (a) e superfície resposta do modelo proposto da biomassa fúngica seca para pH vs. Fonte de nitrogênio (b). Farinha de algodão (-1), extrato de levedura (0) e ureia (0).



Fonte: Do autor (2019).

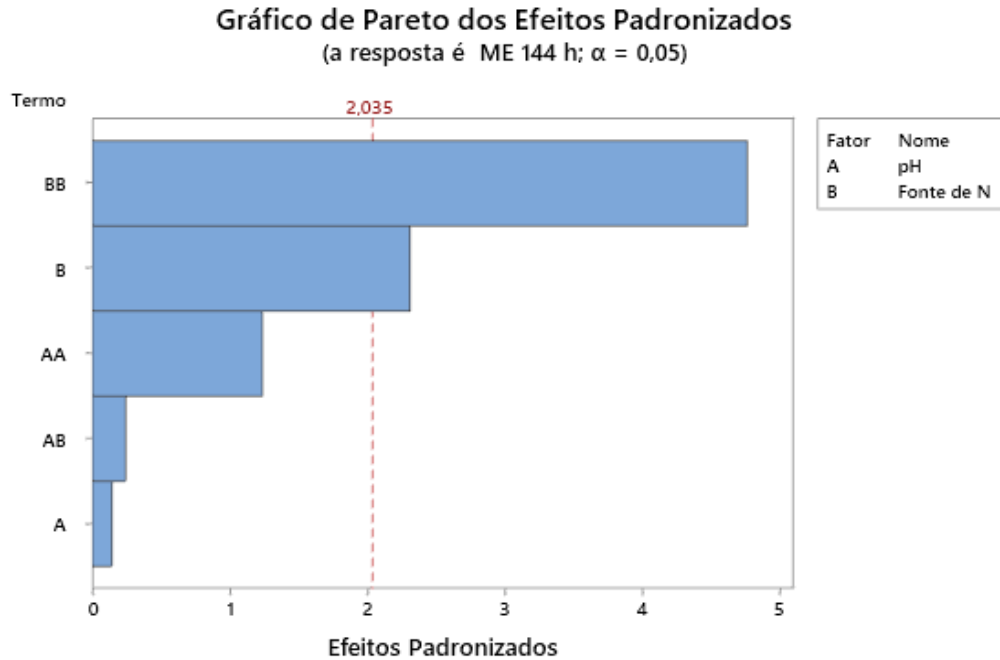
Nos gráficos de diagrama de Pareto com os efeitos padronizados das variáveis independentes testadas sobre a produção de unidades formadoras de colônia e microescleródios (Figuras 16 e 17), respectivamente, pode ser observado que o fator significativo foi apenas para a fonte de nitrogênio. No gráfico de superfície resposta (Figura 18) a média de UFC é maior com a utilização do extrato de levedura no meio de cultivo. A farinha de algodão como fonte de nitrogênio é superior ao uso de ureia. Na Figura 19, observa-se um maior número de microescleródios formados com 144 horas de fermentação com a utilização de extrato de levedura.

Figura 16 – Diagrama de Pareto com efeitos padronizados e a significância das variáveis testadas para a produção de unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* produzido via fermentação líquida submersa no delineamento composto central rotacional. Contagem realizada 48 horas após a incubação das placas de Petri com meio BDA+Triton.



Fonte: Do autor (2019).

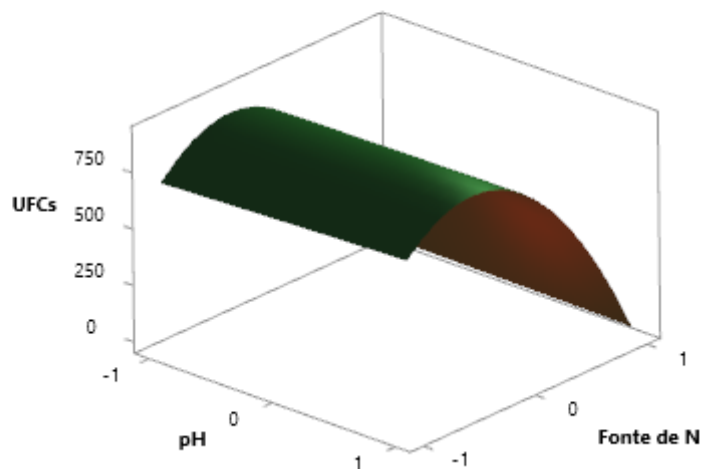
Figura 13 - Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para a produção de microescleródios em meio líquido via delineamento composto central rotacional com 144 horas de fermentação.



Fonte: Do autor (2019).

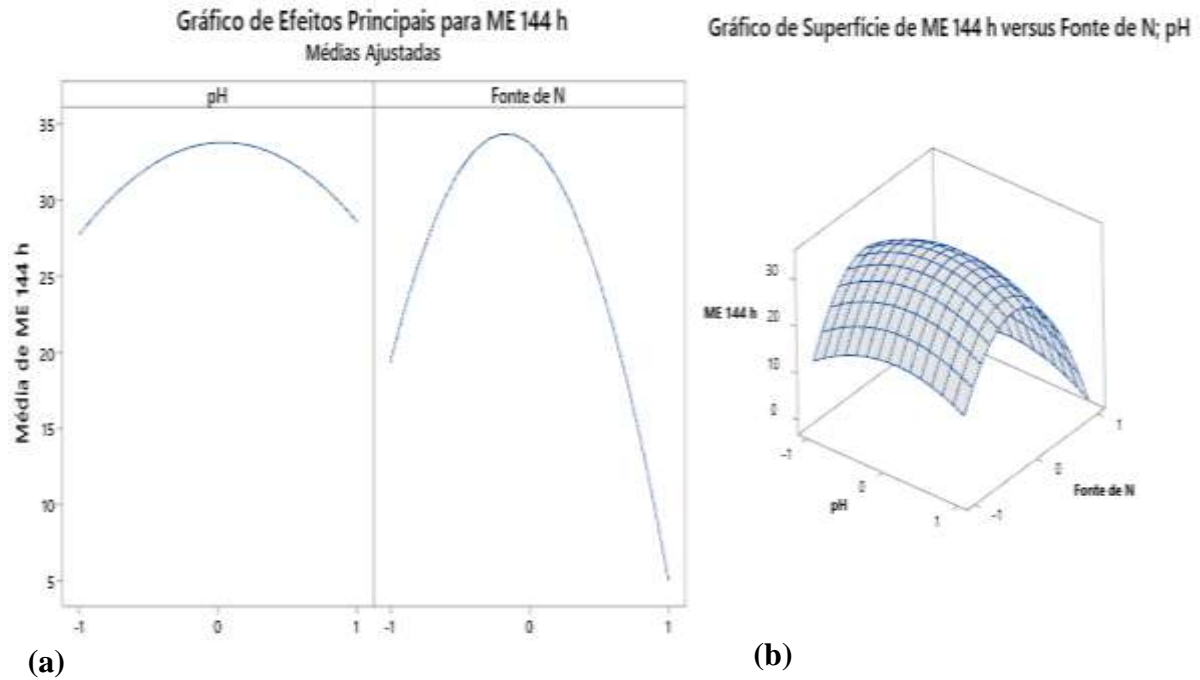
Figura 18 - Superfície de resposta do modelo proposto para a produção de unidade formadora de colônias (UFC) mL⁻¹ de *Clonostachys rosea* e a interação entre pH e fonte de nitrogênio. Contagem realizada 48 horas após a incubação das placas de Petri com meio BDA+Triton.

Gráfico de Superfície de UFCs versus Fonte de N; pH



Fonte: Do autor (2019).

Figura 14 - Gráficos de efeitos principais das diferentes fontes de nitrogênio para a produção de microescleródios em meio líquido com 144 horas de fermentação (a) e superfície resposta do modelo proposto do rendimento de microescleródios para pH vs. Fonte de nitrogênio (b). Farinha de algodão (-1), extrato de levedura (0) e ureia (1).



Fonte: Do autor (2019).

4.3 Produção massal de conídios em biorreator de bancada

Para a produção em massa do *C. rosea* foi utilizado um biorreator automatizado de bancada de 3 L (Eppendorf[®], BioFlo 115, Alemanha). O meio de cultura foi selecionado após realizada a otimização via DCCR (item 3.2.3). Os dados foram colhidos diariamente, a partir de 48 horas do início da fermentação, por cinco dias. Houve uma redução drástica nas médias das concentrações de conídios e microescleródios encontradas ($1,49 \times 10^7$ com 120 horas de fermentação e $1,33 \times 10^3$ com 96 horas de fermentação, respectivamente) (Tabela 14). A média da biomassa fúngica seca ficou em 0,412 g a cada 50 mL de meio de cultivo e as unidades formadoras de colônia ficou em $1,12 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$.

Tabela 14 – Resultado da produção de conídios e microescleródios de *Clonostachys rosea* em cinco diferentes tempos de fermentação em biorreator de bancada automatizados de 3 L. Mantida a 0,5 v/vm (volume de ar por minuto por volume de meio de cultura), 28 °C e agitação de 300 rpm.

	Microescleródios mL ⁻¹	Conídios mL ⁻¹
48 horas	2,66 x 10 ²	1,50 x 10 ⁶
72 horas	1,30 x 10 ³	6,25 x 10 ⁶
96 horas	1,33 x 10 ³	1,25 x 10 ⁷
120 horas	7,66 x 10 ²	1,49 x 10 ⁷
144 horas	1,03 x 10 ³	9,70 x 10 ⁶

Fonte: Do autor (2019).

4.4 Fermentação de *Clonostachys rosea* em arroz

A concentração média de conídios de *C. rosea* obtida nas fermentações em arroz foi de 1,87 x 10⁹ g⁻¹ de arroz após 30 dias de incubação.

4.5 Testes de antagonismo

4.5.1 *Clonostachys rosea* vs. *Botrytis cinerea*

No experimento da capacidade antagonista de *C. rosea* sobre *B. cinerea* em disco de folha de morangueiro, observou-se, após dez dias de incubação, o crescimento do fungo *C. rosea* produzidos em fermentação em estado líquido (LSF) e via fermentação sólida (SFF). Para o tratamento com aplicação apenas de *B. cinerea*, o fungo se desenvolveu e colonizou o disco de folha do morangueiro. Nos tratamentos com água destilada esterilizada e sem inoculação de *C. rosea* ou *B. cinerea*, não foi notado qualquer crescimento de microrganismo fúngicos. Notas foram distribuídas para cada disco de folha de morangueiro seguindo o diagrama de notas e percentagens de áreas de discos foliares colonizados por *C. rosea* a colonização, a frequências das notas de crescimento estão expostas nas Tabelas 16 e Figura 20. O modelo de regressão logística multinomial foi utilizado para avaliar as frequências das notas. O tratamento com *C. rosea* produzido em fermentação sólida (SFF) foi comparada com os demais tratamentos (Tabela 15). O crescimento do *C. rosea* (fermentado líquido) foi estatisticamente superior ao crescimento do *C. rosea* produzido em arroz. Porém, a frequência das notas não foi estatisticamente diferente das obtidas onde havia a competição entre o patógeno com o agente de controle.

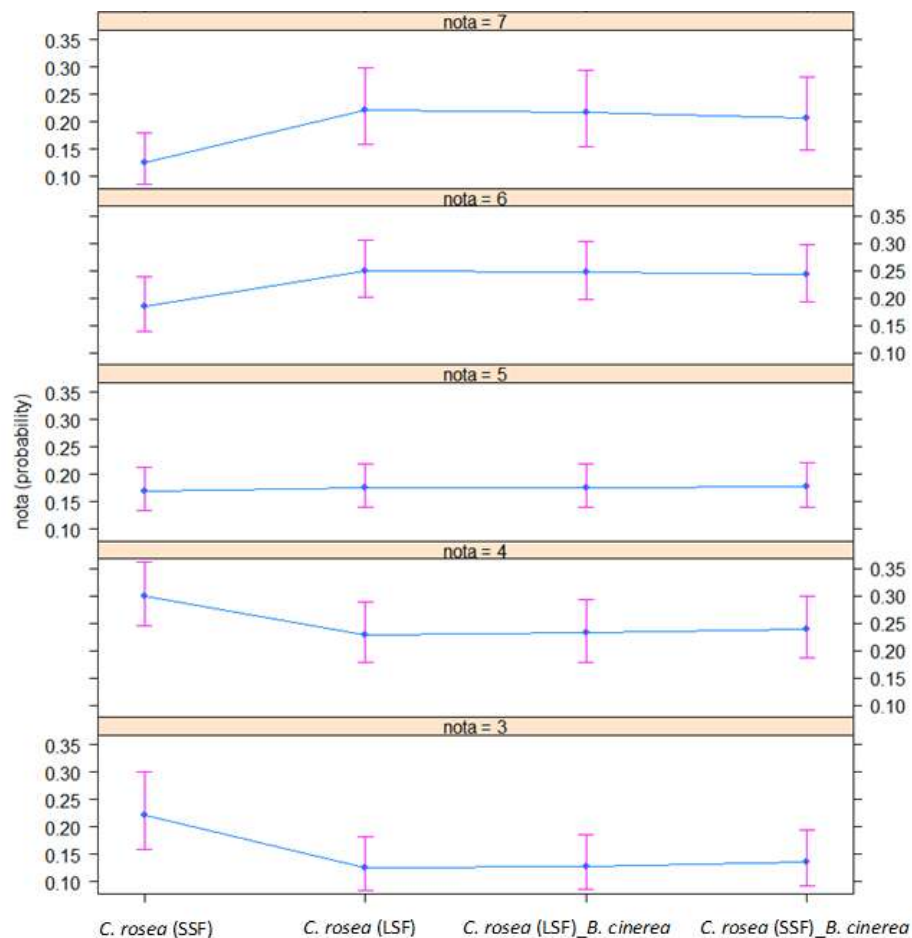
Tabela 15 - Resumo da análise de contrastes para as notas atribuídas através de escala de avaliação foliar para o fungo *Clonostachys rosea* em função dos tratamentos. Seguindo o modelo de regressão logística multinomial para dados de notas de folhas de morangueiro colonizando *C. rosea*.

Contrastes	Valor-p
	Frequência de notas de esporulação foliar por <i>C. rosea</i>
SSF vs. LSF	0,034*
SSF vs. LSF e <i>Botrytis</i>	0,046*
SSF vs. SSF e <i>Botrytis</i>	0,427 ^{NS}

LSF = fermentação em estado líquido. SSF = fermentação sólida (SFF).

Fonte: Do autor (2019).

Figura 15 - Probabilidades de cada nota em função do tratamento no teste de antagonismo de *Clonostachys rosea* vs. *Botrytis cinerea*. As notas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem a esporulação dos discos por *C. rosea* em 0%, 0-3%, 3-6%, 6-12%, 12-25%, 25-37% 37-50% e >50% do disco, respectivamente.



Fonte: Do autor (2019).

Tabela 16 - Frequência das notas do crescimento de *Clonostachys rosea* em discos de folha de morangueiro e atribuídas de acordo com a escala de avaliação do crescimento foliar e Probabilidades de cada nota em função do tratamento. Experimento com seis tratamentos, nove repetições para cada tratamento e dez disco de folha de morangueiro por repetição.

Notas	LSF	SSF	LSF e <i>B. cinerea</i>	SSF e <i>B. cinerea</i>	<i>B. cinerea</i>	Água destilada
0	0	0	0	0	90	90
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	11	19	12	13	0	0
4	20	29	23	18	0	0
5	18	13	12	20	0	0
6	21	19	22	21	0	0
7	20	10	21	18	0	0

Legenda: LSF = Fermentação em estado líquido de *C. rosea*. SSF = Fermentação estado sólido (arroz) de *C. rosea*.

Fonte: Do autor (2019).

4.5.2 *Clonostachys rosea* vs. *Sclerotinia sclerotiorum*

Para os ensaios relacionados à inibição da germinação miceliogênica dos esclerócios de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio Neon-S como descrito no item [3.5.2](#), os dados de germinação foram ajustados a um modelo misto linear generalizado com distribuição binomial para erros e função de logit link, assumindo como efeito fixo os tratamentos enquanto o efeito aleatório foi atribuído ao nível observacional para explicar a super dispersão. Os fermentados de *C. rosea*, em todas as concentrações e tipo de fermentação foram capazes de inibir a germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* e foram estatisticamente diferentes ao controle ($P < 0,001$) (Tabelas 17, Figura 21 e 22). Não houve diferença entre o *C. rosea* produzido em cultura submersa para o produzido em grão de arroz. As diferentes concentrações de *C. rosea* produzidas via fermentação líquida (LSF) também não foram diferentes significativamente.

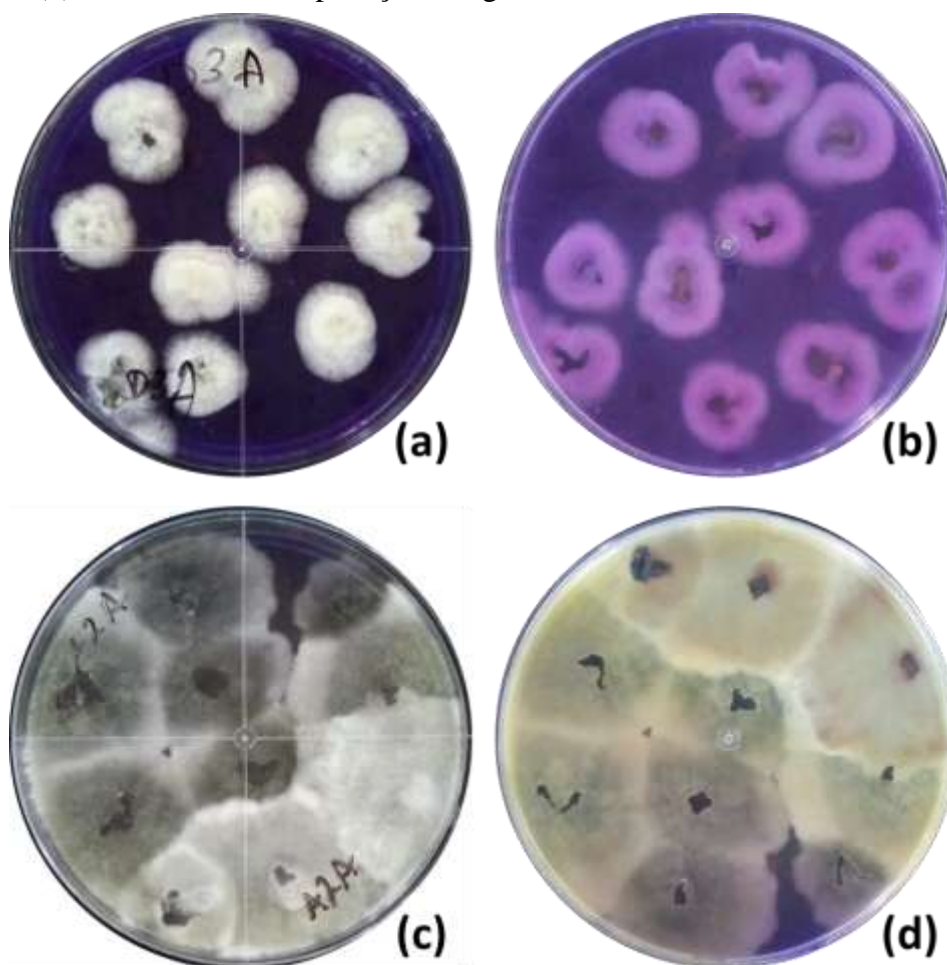
Tabela 17 - Valores médios dos escleródios viáveis do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em função dos tratamentos¹ após sete dias da incubação das placas com meio Neon-S. Teste com cinco tratamentos e quatro repetições com 20 escleródios por repetição.

Tratamentos	Concentração aplicada	Escleródios viáveis
(D) <i>C. rosea</i> (LSF)	1×10^7 conídios mL ⁻¹	0,00 a
(B) <i>C. rosea</i> (LSF)	1×10^5 conídios mL ⁻¹	0,50 a
(E) <i>C. rosea</i> (SSF)	1×10^7 conídios mL ⁻¹	0,50 a
(C) <i>C. rosea</i> (LSF)	1×10^6 conídios mL ⁻¹	1,00 a
(A) Água destilada	-	11,50 b

¹ Médias, nas colunas, seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

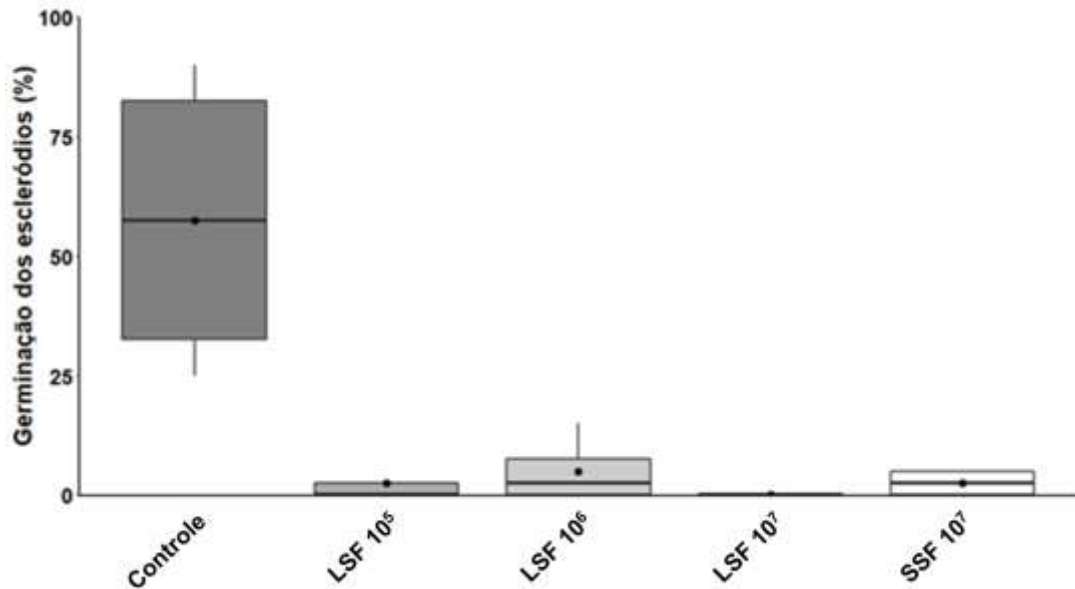
Fonte: Do autor (2019).

Figura 16 - Fotos do bioensaio de inibição da germinação miceliogênica dos esclerócios de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio Neon-S por *C. rosea*. (a) e (b) Escleródios com aplicação de *Clonostachys rosea* e na concentração de 1×10^7 conídios mL⁻¹; (c) e (d) Escleródios com aplicação de água destilada esterilizada.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 17 - Boxplot da germinação dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio Neon-S no bioensaio do parasitismo de *Clonostachys rosea* vs. *S. sclerotiorum* após 7 dias de incubação. Teste com cinco tratamentos e quatro repetições com 20 escleródios por repetição. Placas incubadas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz.



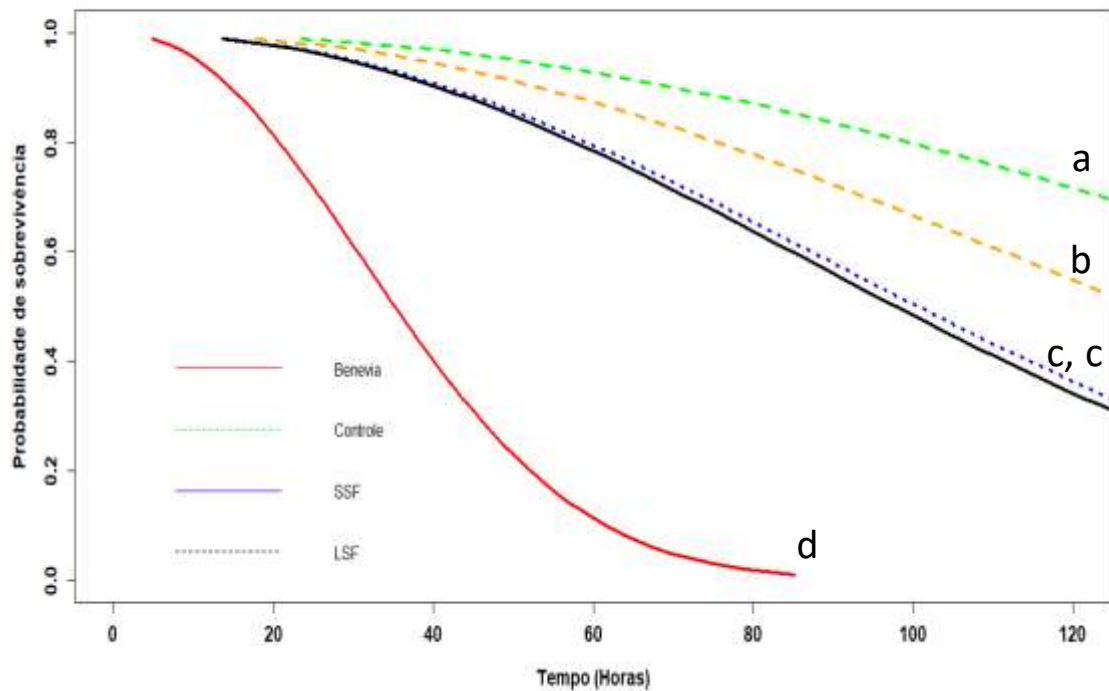
Legenda: LSF = Fermentação em estado líquido de *C. rosea*. SSF = Fermentação em estado sólido (arroz) de *C. rosea*

Fonte: Do autor (2019).

4.5.3 *Clonostachys rosea* vs. *Bemisia tabaci*

O modelo não paramétrico com distribuição Weibull foi utilizado para os dados de sobrevivência, testando o efeito dos tratamentos (Tabela 8) na sobrevivência de adultos de *B. tabaci*. A sobrevivência da mosca branca foi significativamente influenciada pelos tratamentos (Qui-quadrado = 296,41 em 4 graus de liberdade, $P < 0,001$) quando comparada aos tratamentos controle (benevia, água destilada e tween) e não houve diferença significativa entre os tipos de fermentação de *C. rosea*. A probabilidade da mortalidade de 50% dos adultos de *B. tabaci* para os dois tipos de produção, fermentação líquida (LSF) e fermentação sólida (SSF), com 10.000 amostras aleatórias, estimadas com o bootstrap, foi de 112 horas para o tratamento com a utilização do fermentado líquido e 109 horas para os conídios formados em fermentação sólida (Figura 22). A estimativa da mortalidade de 50% dos adultos para o tratamento com a aplicação do inseticida (Benevia[®]) controlar 50% dos indivíduos foi de 38 horas.

Figura 18 - Análise e curvas de sobrevivência de adultos de moscas branca* biótipo b (*Bemisia tabaci*) em função dos tratamentos utilizados, mensurado em diferentes pontos no tempo. Experimento realizado com quatro tratamentos e dez repetições com dez moscas por repetição.

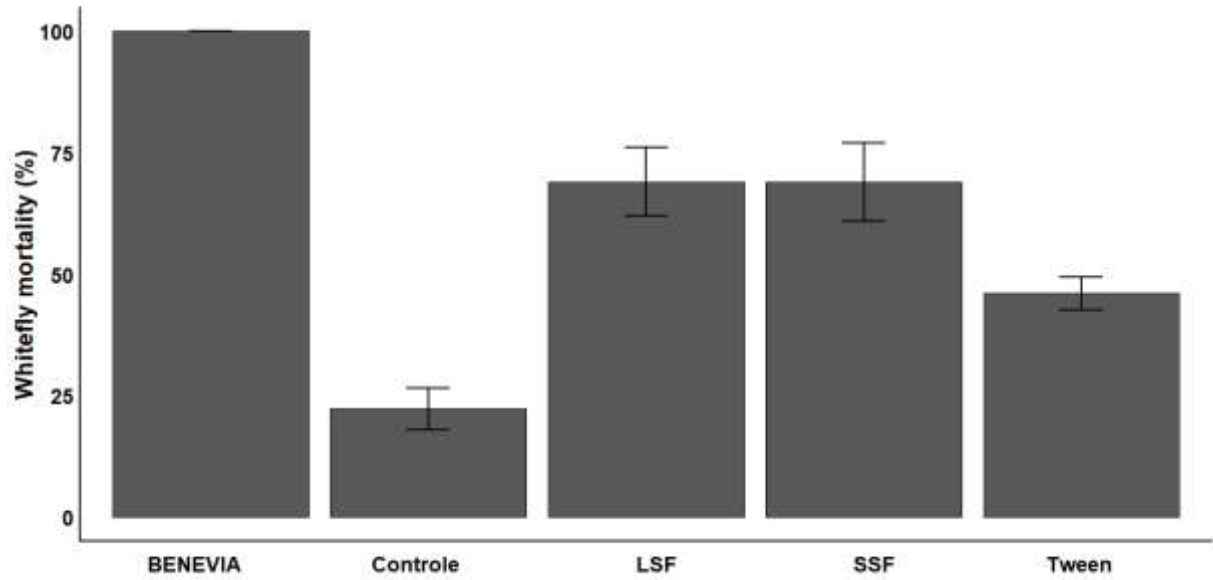


* Médias, nas curvas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2019).

Os dados de mortalidade acumulados por 120 horas foram ajustados a um modelo misto linear generalizado com distribuição binomial para erros e função de logit link, assumindo como efeito fixo os tratamentos enquanto o efeito aleatório foi atribuído às réplicas para explicar a super-dispersão (ou variabilidade extrabinomial) (Figura 21). Os tratamentos controle (água destilada estilizada e tween) foram estatisticamente diferentes, com 120 horas da aplicação, a mortalidade do tratamento com Tween foi de 46% dos indivíduos contra 29% de mortos nos folíolos tratados apenas com água destilada.

Figura 19 - Gráfico de mortalidade em % acumulada por 120 horas com o desvio padrão em função dos tratamentos. Bioensaio com 10 repetições por tratamento e dez moscas por repetição.



Legenda: LSF = Fermentação em estado líquido de *C. rosea*. SSF = Fermentação em estado sólido (arroz) de *C. rosea*

Fonte: Do autor (2019).

5 DISCUSSÃO

A otimização da fermentação líquida de *Clonostachys rosea* promoveu a diminuição do tempo de fermentação quando comparada à fermentação sólida, e apresentou maior eficiência no aumento das escalas de produção de conídios. A maior concentração média obtida de conídios via fermentação líquida foi de $7,87 \times 10^8$ conídios mL^{-1} , valor superior aos obtidos em fermentação líquida por Carvalho et al. (2018) e por Sun et al. (2013) que foram de $1,01 \times 10^8$ conídios mL^{-1} e $3,3 \times 10^8$ conídios mL^{-1} , respectivamente.

Na fermentação sólida utilizando grãos de arroz o valor médio máximo obtido após 30 dias de fermentação foi de $1,87 \times 10^9$ g^{-1} , valor superior ao obtido por Carvalho et al. (2018) e inferior aos encontrados por Viccini et al. (2007) e Zhang et al. (2015) que foram de 5×10^8 conídios g^{-1} , $3,4 \times 10^9$ e $3,5 \times 10^{10}$ conídios g^{-1} , respectivamente. Esse menor valor pode provavelmente ser devido à quantidade de água no sistema. De acordo com De La Cruz Quiroz et al. (2015), o excesso de água diminui o rendimento de índice de esporulação, pois, as cavidades dos meios são ocupadas pela água, o que reduz os espaços livres para o desenvolvimento de formas de reprodução de fungos.

Clonostachys rosea não foi dependente do pH do meio de cultura nas faixas estudadas para sua reprodução e multiplicação (Tabela 11 e Figura 13), pois nos ensaios, as variações de pH não foram significativas, dados que diferem dos obtidos por Carvalho et al. (2018). Sun et al. (2013) relataram que uma alta concentração de conídios foi obtida em culturas submersas na faixa de pH 5,0 - 9,0 e o pH ideal para a geração de conídios foi de 6 - 6,5. Estes autores também relataram que a formação de clamidósporos foi inibida sob essa condição de pH, indicando que as condições ideais de pH encontradas no Plackett e Burman 12 para o crescimento e propagação do *C. rosea* inibe a formação de clamidósporos. Os resultados obtidos por Pasqualetti et al. (2019) demonstram que a condição de pH para o melhor crescimento foi registrada em pH 8,0 (faixa de 3,5 a 10,5 pH). No entanto, esse valor ótimo não deve ser considerado com tanta relevância, pois esse fungo apresentou crescimento ótimo ou subótimo em uma faixa muito ampla de pH (5,5-9,5), com variações não estatisticamente significativas de sua taxa de crescimento (PASQUALETTI et al., 2019).

No ensaio inicial foram estudados diferentes níveis da relação carbono e nitrogênio do meio de cultura, sendo que a que apresentou as maiores produções de estruturas do bioagente foi a 50:1 (Tabela 9) e escolhida para os ensaios subsequentes. O desenvolvimento de um meio para cultivo com uma relação C:N específica para uma linhagem ou isolado é

importante, já que diz respeito a sua subsequente produção massal e ao conhecimento das condições adequadas de cultivo, possibilitando a obtenção de alta esporulação (KHALIL; SHAH; NAEEM, 1985). De acordo com Jaronski e Jackson (2012), a relação entre carbono e nitrogênio é considerada de grande importância no balanço do meio de cultura e isso permite trabalhar a estreita relação entre o custo e a qualidade do fungo produzido, além da sua estabilidade após secagem e sua agressividade, medida em termos de virulência e patogenicidade (OTTATI-DE- LIMA et al., 2010). No delineamento de Plackett-Burman 12, a utilização de uma relação C:N baixa e com a maior concentração total de carbono no meio promoveu um aumento na produção de biomassa seca (Tabela 10), no segundo experimento (DCCR), utilizando valores da relação C:N e C total únicos, a biomassa seca foi significativa, sendo sua maior produção com a utilizada do extrato de levedura como fonte de nitrogênio (Figura 14).

A fonte de nitrogênio do meio de cultivo escolhida foi o extrato de levedura, com base no bom desempenho no ensaio DCCR, onde se destacou das demais fontes de nitrogênio (farelo de algodão e ureia) e nos resultados alcançados no experimento anterior. Esse componente consiste em uma boa fonte de nitrogênio e sua inclusão em um meio de cultura equilibrado pode trazer bons resultados. Com o Plackett e Burman 12 ainda foram definidos as concentrações de Fe e Ca. Apesar do Ca ser relatado na literatura como um dos fatores para a formação de conídios em cultivo submersos de *Trichoderma viride* e *Metarhizium anisopliae* I, (Leger et al., 1990; Šimkovič et al., 2008) as diferentes concentrações desse sal não foram significativas para a produção de conídios de *C. rosea*, porém, sua maior concentração estimulou a produção de biomassa fúngica seca. O uso de diferentes dosagens de Fe no meio de cultivo foi significativo apenas para a produção de conídios e unidades formadoras de colônia de *C. rosea*. O Fe em sua maior concentração testada influenciava de maneira negativa a produção de conídios.

Após as definições dos parâmetros do meio de cultura foi realizado o scale-up da produção em biorreator. Na produção massal de *C. rosea* no biorreator houve uma discordância nos valores de todas as variáveis analisadas, os números máximos médios obtidos para a concentração de conídios, biomassa seca, microescleródios ficaram abaixo dos conseguidos nas etapas anteriores (Plackett-Bruman 12 e DCCR) (Tabelas 9, 10, 11 e 12). Porém, a concentração máxima de conídios mL⁻¹ foi obtida em um menor tempo de fermentação (96 horas após a inoculação) quando se comparada as máximas médias alcançadas nos ensaios anteriores (Plackett-Bruman 12 e DCCR, 144 horas e 120 horas após a

inoculação, respectivamente) (Tabelas 9 e 11). A partir deste resultado, hipotetiza-se que as diferentes taxas de oxigenação e agitação influenciaram na produção de conídios de *C. rosea*.

Nos bioensaios de antagonismo, *C. rosea* controlou *B. cinerea*, *S. Sclerotiorum* e *B. tabacci* (Tabelas 16, 18 e 19). Houve diferença significativa entre as diferentes formas de produção dos propágulos testados (via fermentação líquida ou sólida) apenas no teste de antagonismo de *B. cinerea*. No teste de disco de folha morangueiro o resultado foi compatível ao encontrado por Morandi et al. (2000); Cota et al. (2008a) e Carvalho et al. (2018), onde a colonização das folhas pelo patógeno nos tratamentos tratados com esporos de *C. rosea* foi praticamente nula, demonstrando assim a eficiência do *C. rosea* em controlar o *B. cinerea* por competição.

Clonostachys rosea se mostrou capaz de inibir a germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum* em meio Neon-S, resultado semelhante ao encontrado por e Rodriguez et al. (2011) e Wu et al. (2018). Rodriguez et al. (2011) relatam que o isolado de *C. rosea* estudado por eles produziu peptaibióticos. Os peptaibióticos são um grupo de antibióticos peptídicos que possuem conformações e bioatividades únicas (SZEKERES et al., 2005) e interrompem o crescimento de fungos permitindo com que o fungo produtor parasite o restante da estrutura do fungo parasitado (SCHIRMBOËCK et al. 1994). O efeito dos peptaibióticos produzidos pelo *C. rosea* foi observado por Rodriguez et al. (2011) no micélio da *S. Sclerotiorum*. Esse peptídeo promove a lise celular das hifas. Neste bioensaio foi observado a inibição da germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* para todas as concentrações e tipo de fermentação, não havendo perda de virulência dos conídios do agente de controle produzidos por tipos diferentes de fermentação. Não houve diferença entre o *C. rosea* produzido em cultura submersa para o produzido em grão de arroz (Tabela 17). As diferentes concentrações de *C. rosea* produzidas via fermentação líquida (LSF) também não foram diferentes significativamente (Figura 21).

No controle da mosca branca, a utilização dos fermentados novamente se mostrou eficiente, com uma mortalidade de 69% dos indivíduos adultos de *B. tabaci* após 120 horas da aplicação das suspensões de *C. rosea*. No trabalho realizado por Anwar et al. (2018) foi observado pelos autores o início da mortalidade de adultos de *B. tabaci* com 120 horas após a inoculação do *C. rosea* (4×10^8 conídios mL⁻¹) e a maior taxa de mortalidade com 6 dias chegando a 23,54% dos indivíduos, os tratamentos com os agentes de controle biológico foram significativos a partir de 48 horas da aplicação. Hipotetiza-se que o baixo índice de sobrevivência dos indivíduos no tratamento com a aplicação Tween, deve-se a uma possível

ação repelente do produto nos adultos de *B. tabaci*, diminuindo a capacidade de alimentação e as levando a morte por inanição. A adição de Tween pode ter influenciado na mortalidade dos indivíduos adultos de *B. tabaci*.

Neste estudo a produção de microescleródios de *C. rosea* foi observada em todas as etapas das fermentações líquidas (Plackett e Burman 12, DCCR e biorreator). A importância na produção de microescleródios é a possibilidade de aplicações no solo visando o controle de doenças transmitidas por patógenos/pragas habitantes do solo, onde seria mais adequado que a aplicação de conídios (KOBORI et al., 2015). A maior concentração de microescleródios obtida foi de $5,33 \times 10^3$ microescleródios mL^{-1} (Tabela 13) utilizando 24 g L^{-1} de carbono total e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, Kobori et al. (2015) obteve $4,8 \times 10^4$ microescleródios mL^{-1} de *Trichoderma harzianum* utilizando meios com alto teor de (36 g L^{-1}) e farelo de algodão como fonte de nitrogênio. A produção média máxima de microescleródios de *C. rosea* utilizando o farelo de algodão foi de $1,83 \times 10^3$ microescleródios mL^{-1} .

A produção máxima de *C. rosea* em fermentação líquida submersa foi de $7,87 \times 10^8$ conídios mL^{-1} em um curto espaço de tempo (144 horas). Esse bioagente, além de apresentar um complexo arsenal de mecanismos envolvidos na proteção de plantas, os quais incluem micoparasitismo, competição por nutrientes, antibiose, produção de antibióticos peptídicos, promoção de crescimento, indução de respostas de defesa sistêmicas em plantas (Lahoz et al., 2004; Rodríguez et al., 2011; Lahlali e Peng, 2013; e Lubeck et al., 2002) ele também produz estrutura de resistência (microescleródios), facilitando a conservação e pluralizando sua utilização como agente de controle biológico. Devido à necessidade de se encontrar alternativas economicamente mais vantajosas e de reduzido impacto no meio ambiente e a saúde humana, os biopesticidas ganharam maior destaque no mercado de proteção de plantas (Juliatti et al., 2019) e com resultados supracitados, a fermentação líquida faz do *C. rosea* uma realidade no controle de pragas e doenças de plantas.

Como as informações estabelecidas neste trabalho, as próximas etapas serão definir os parâmetros para que a produção em biorreator de bancada alcance os rendimentos obtidos nas etapas do Plackett e Burman e no DCCR além de isolar e identificar os metabólitos produzidos pela cepa LQC-62 utilizada no presente trabalho. Outro objetivo é a produção de três biopesticidas distintos à base de *C. rosea*. O primeiro produto com conídios, com aplicação na parte aérea da planta agindo contra patógenos presentes no filoplano; o segundo com microescleródios, para ser aplicado no solo ou sobre resto de cultura e, por fim, um

produto com todos os micropropágulos (hifas, conídios e microescleródios) de *C. rosea*. Obtendo assim três produtos com possível capacidade antagonista a patógenos e pragas em seus respectivos micro-hábitat.

6 CONCLUSÕES

A produção via fermentação em estado líquido de *C. rosea* é viável e com duração total de cinco dias. Além disso, *C. rosea* produz conídios submersos e, pela primeira vez, produziu microescleródios.

A alteração de parâmetros no meio de cultura altera a qualidade, quantidade e o tipo de propágulo produzido.

O pH não influenciou na produção de conídios de *C. rosea* nos meios testados.

Os conídios de *C. rosea* produzidos em meio líquido não diferiram no antagonismo em relação aos conídios aéreos produzidos na fermentação sólida nos ensaios contra *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Bemisia tabaci*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAND, A.; SINGH, G.; SARAF, S. A. Plackett-Burman design as a tool for screening and process optimization of rivastigmine-loaded lipid nanocarriers. **Asian journal of pharmaceutical and clinical research**, v. 11, n. 12, p. 155-158, 2018.
- ANANY, H. et al. Immobilization of intact phage and phage-derived proteins for detection and biocontrol purposes. In: **Bacteriophages**. New York: Humana press, 2019. p. 89-105.
- ANWAR, W.; AKHTER, A.; IFTIKHAR, S. Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). **Biocontrol science and technology**, v. 28, n. 8, p. 750-760, 2018.
- ARNE, W. et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. **Science**, v. 342, n. 6154, p. 118-123, 2013.
- AWAD, G. E. A. et al. Sequential optimizations of *Aspergillus awamori* EM66 exochitinase and its application as biopesticide. **Journal of applied pharmaceutical science**, v. 7, n. 2, p. 067-075, 2017.
- BARRERA, M. C.; GÓMEZ, M. I; SERRATO BERMÚDEZ, J. C. Towards the production of fungal biocontrol candidates using inert supports: a case of study of *Trichoderma asperellum* in a pilot fixed bed fermenter. **Biocontrol science and technology**, v. 29, n. 2, p. 162-184, 2019.
- BEAGLE-RISTAINO, J. E.; PAPAVIDAS, G. C. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. **Phytopathology**, v. 75, n. 6, p. 729-732, 1985.
- BERRIE, A. *Botrytis*, Powdery Mildew and Blackspot of Strawberry. In: NATIONAL SOFT FRUIT CONFERENCE, 2000, Co.Wexford. **Anais...** Co.Wexford: Teagasc, 2000, p. 30-35.
- BETTIOL, W. et al. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas**, v. 17, p. 111-147, 2009.
- BETTIOL, W. et al. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. (Documentos, 88), 2012. 115 p.
- BOFF, P. et al. The role of petals in development of grey mould in strawberries. **Fitopatologia brasileira**, v.28, p.76-83, 2003.
- BOLTON, M. D., THOMMA, B. P., 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.
- BONDAR, G. Aleyrodídeos do Brasil. **Boletim do laboratório de patologia vegetal do estado da Bahia**, v.5, p.1-37. 1928.
- 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.
- BOX, G. E.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the royal statistical society: series B (methodological)**, v. 13, n. 1, p. 1-38, 1951.

- BYRNE, D.N.; BELLOWS JUNIOR, T.S. Whitefly biology. **Annual review of entomology**, v. 36, p. 431-457, 1991.
- CALDWELL, R. Fate of spores of *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. introduced into soil. **Nature**, v. 181, n. 4616, p. 1144, 1958.
- CARVALHO, A. L. de A. et al. Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation. **Biological control**, v. 118, p. 16-25, 2018.
- CONNORS, N.C. Culture medium optimization and scale-up for microbial fermentations. In: VINCI, V.A.; PAREKH, S.R. **Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells**. New Delhi: Humana Press, 2002. p. 171-193.
- COSTA, L. B. et al. Impact of UV-B radiation on *Clonostachys rosea* germination and growth. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 2497-2504, 2012.
- COTA, L. V.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 3, p. 312-317, 2008a.
- COTA, L.V. et al. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological control**, v. 46, n. 3, p. 515-522, 2008b.
- DE LA CRUZ QUIROZ, R. et al. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. **Critical reviews in biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 326-333, 2015
- DI, Y. L. et al. Baseline sensitivity and efficacy of trifloxystrobin against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop protection**, v. 87, p. 31-36, 2016.
- DROBY, S.; LICHTER, A. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. (eds) **Botrytis: biology, pathology and control**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 349-367.
- FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.
- FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2006. 130f. Dissertação (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.
- GAO, L. et al. Use of a novel two-stage cultivation method to determine the effects of environmental factors on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. **Mycoscience**, v. 50, n. 4, p. 317-321, 2009.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; CASSEMIRO, T. A. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em meio de cultura. **Bioscience journal**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2012.
- GE, X.; VASCO-CORREA, J.; LI, Y. Solid-State fermentation bioreactors and fundamentals. In: LARROCHE, C. et al. (eds.). **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2017. p. 381-402.

- GERALDINE, A. M. et al. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological control**, v. 67, n. 3, p. 308-316, 2013.
- GILL, R. J. The morphology of whiteflies. In: GERLING, D. (Ed.). **Whiteflies: their bionomics pest status and management**. Andover: Intercept, p. 13-46. 1990.
- GONG, C. et al. Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to grey mould disease and identification of the key proteins induced in tomato fruit. **Postharvest biology and technology**, v. 123, p. 83-93, 2017.
- GRAZIA, J. et al. Hemiptera. In: RAFAEL, J.A. et al (Ed.). **Os insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2012. p. 348-405
- HAJI, F.N.P. et al. Manejo da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B na cultura do tomate. In: HAJI, F.N.P.; BLEICHER, E. (Eds.). **Avanços no manejo da mosca-branca Bemisia tabaci biótipo B (Hemiptera, Aleyrodidae)**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2004. cap. 7, p.87-110.
- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant disease**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 376–393, 2000.
- HOU, Y. P. et al. Activity of a novel succinate dehydrogenase inhibitor fungicide pyraziflumid against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 145, p. 22-28, 2018.
- HU, S. et al. Baseline sensitivity and toxic actions of boscalid against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop protection**, v. 110, p. 83-90, 2018.
- HUANG, H., ERICKSON, R. S. Factors affecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal antagonists. **Journal of phytopathology**, v. 156, n. 10, p. 628-634, 2008.
- HUGHES, S.J. The term chlamydospore. In: TADASHI, A.; TETSURO, K. (Eds.) **Filamentous microorganisms**. Tokyo: Japan scientific societies press, 1985. pp. 1–20.
- JACKSON, M.A. et al. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. **Weed technology**, v. 10, n. 3, p. 645-650, 1996.
- JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 180-87, 1997.
- JOHANSEN, A. et al. Non-target effects of the microbial control agents *Pseudomonas fluorescens* DR54 and *Clonostachys rosea* IK726 in soils cropped with barley followed by sugar beet: a greenhouse assessment. **Soil biology & biochemistry**, v.37, p.2225–2239, 2005.
- JULIATTI, F. C. et al. *Trichoderma* as a biocontrol agent against *Sclerotinia* stem rot or white mold on soybeans in Brazil: usage and technology. In: SHAH, M. M. (Ed.). **Trichoderma – The most widely used fungicide**. London: Intech Open, 2019. p. 401-484.
- KABBAGE, M.; YARDEN, O.; DICKMAN, M. B. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant science**, v. 233, p. 53-60, 2015.

- KAMPEN, W.H. Nutritional requirements in fermentation. In: TODARO, C.C.; VOGEL, H.C. **Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment**. 3rd ed. Oxford: William Andrew, 2014. p. 37-57.
- KARLSSON, M. et al. Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *Clonostachys rosea*. **Genome biology and evolution**, v. 7, n. 2, p. 465-480, 2015.
- KARUPPIAH, V. et al. Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 causes differential gene expression and improvement in the wheat growth and biocontrol activity. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1068, 2019.
- KHAN, A.; WILLIAMS, K.L.; NEVALAINEN, H.K.M. Infection of plant-parasitic nematodes by *Clonostachys rosea* and *Monacrosporium lysipagum*. **Biological control**, v. 51, n. 5, p. 659-678, 2006.
- KOBORI, N. N. et al. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal biology**, v. 119, n. 4, p. 179-190, 2015.
- LAHLALI, R.; PENG, G. Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced host resistance. **Plant pathology**, v. 63, n. 2, p. 447-455, 2014.
- LAHOZ, E.; CONTILLO, R.; PORRONE, F. Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* Bainier. **Journal of phytopathology**, v. 152, n. 8-9, p. 465-470, 2004.
- LEHNER, M. S. et al. Meta-analytic modelling of the incidence–yield and incidence–sclerotial production relationships in soybean white mould epidemics. **Plant pathology**, v. 66, n. 3, p. 460-468, 2017.
- LEITE, L.G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Livroceres, 2003. 92 p.
- LI, J. et al. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. **Process biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 925-929, 2006.
- LI, J.; ZHU, F.; LI, J. Expression of the histidine kinase gene *Sshk* correlates with dimethachlone resistance in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 109, n. 3, p. 395-401, 2019.
- LI, L. et al. Induction of chlamydo spores in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* C2. **Journal of phytopathology**, v. 153, n. 11-12, p. 686-693, 2005.
- LOPEZ, V. et al. Discovery learning about sustainable management of whitefly pests and whitefly-borne viruses. **International centre for tropical agriculture**, v.1, n.1, p.12-37, 2008.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. **Bragantia**, v.53, n.1, p.53-59, 1994.
- LUBECK, M. et al. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. **Mycological research**. v. 106 p. 815 - 826. 2002.

- MA, H. et al. Optimization of ethanol fermentation from fruit and vegetable waste by Plackett-Burman and orthogonal experimental design. **Bioresources**, v. 14, n. 1, p. 1210-1218, 2019.
- MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de ciências agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, jun. 2012.
- MAO, X. W. et al. Resistance risk assessment for fluazinam in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 144, p. 27-35, 2018.
- MAPA. **Mercado de bio defensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano**. Março. 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/feffmercado-de-bio-defensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil#wrapper>> Acesso em: 21 set. 2019.
- MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 165, p. 46-53, 2018.
- MASCARIN, G.M. et al. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6653-6665, 2015b.
- MASCARIN, G.M. et al. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of invertebrate pathology**, v. 127, p. 11–20, 2015a.
- MATEUS, N. B., BARBIN, D., CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta scientiarum. Technology**, v. 23, p. 1537-1546, 2001.
- MEYER, M. C. et al. (Eds). **Ensaio cooperativos de controle químico de mofo-branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012**. Londrina: Embrapa Soja . (Documentos, 345), 2014. 100 p.
- 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. Londrina: Embrapa Soja. (Circular Técnica, 152) 2019. 5 p.
- MORANDI, M. A. B. et al. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. **Biological control**, v. 26, n. 3, p. 311-317, 2003.
- MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; **Manejo integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea***. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. (Documentos, 44), 2005. 35p.
- MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; SUTTON, J. C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, v. 29, n. 2, p. 103-113, 2001.
- MORANDI, M.A.B.; SUTTON, J.C.; MAFFIA, L.A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European journal of plant pathology**, v. 106, n.5, p. 439-448, 2000.
- MOREIRA, G. M. **Caracterização de espécies de *Clonostachys* e avaliação do parasitismo a *Botrytis cinerea***. 2012. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- NAPOLEÃO, R. et al. Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Summa phytopathologica**, v. 32, n. 2, p. 180-183, 2006.

- NATESHAN, H. M. et al. Host range, vector and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. **Annual applied biology**, v. 128, p. 233-244, 1996
- NOBRE, S. A. M. et al. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological control**, v.34, n.2, p.132-143, 2005.
- PABLE, A. A. et al. Use of Plackett–Burman design for enhanced phytase production by *Williopsis saturnus* NCIM 3298 for applications in animal feed and ethanol production. **3 Biotech**, v. 9, n. 6, p. 237, 2019.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical engineering journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.
- PENTEADO, S. do R. C. et al. Ocorrência, distribuição, danos e controle de pulgões do gênero *Cinara* em *Pinus* spp. no Brasil. **Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 55-64, 2000.
- PEREIRA, C. et al. Characterization and *in vitro* evaluation of new bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli*. **Virus research**, v. 227, p. 171-182, 2017.
- PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.
- RAO, C.H.S. et al. Modeling and optimization of fermentation factors for enhancement of alkaline protease production by isolated *Bacillus circulans* using full-forward neural network and genetic algorithm. **Journal of applied microbiology**, v.104, n. 3, p. 889-898, 2008.
- RAVNSKOV, S. et al. Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. **Soil biology & biochemistry**, v.38, p.3453-3462, 2006.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2 ed. Campinas: Cárita, 2009.
- RODRÍGUEZ, M. A. et al. *Clonostachys rosea* BAF3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. **Journal of applied microbiology**, v. 110, n. 5, p. 1177-1186, 2011.
- ROESE, A. D. et al. Agricultural diversification reduces the survival period of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. **European journal of plant pathology**, v. 151, n. 3, p. 713-722, 2018.
- SCHILLER, C. T.; SINCLAIR, J. B. Microorganisms associated with soybean vascular exudate and plant parts. **Internacional journal of tropical plant diseases**, v. 2, p. 1-4, 1984.
- SCHIRMBÖCK, M. et al. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4364-4370, 1994.
- SCHROERS, H.J. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **Studies in mycology**, n. 46, 2001.
- SHANG, B. et al. Optimization of lipid production from *Rhodotorula glutinis* CA815 under solid-state fermentation with waste tobacco stems by Plackett-Burman design. **Journal of food safety and quality**, v. 8, n. 9, p. 3606-3610, 2017.
- SILVA, J do N. et al. New cost-effective bioconversion process of palm kernel cake into bioinsecticides based on *Beauveria bassiana* and *Isaria javanica*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2595-2606, 2018.

- ŠIMKOVIČ, M. et al. Ca²⁺-dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 4, p. 291-298, 2008.
- SIMMONS, A.M. Oviposition on vegetables by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae): temporal and leaf surface factor. **Environmental entomology**, v.23, n.2, p.381-389, 1994.
- SMITS, T. H. M. et al. Characterization of the surface hydrophobicity of filamentous fungi. **Environmental microbiology**, v. 5, n. 2, p. 85-91, 2003
- SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology research and innovation**, v. 1, n. 1, p. 52-71, 2017.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical engineering journal**, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, 2003.
- ST LEGER, R. J. et al. Protein kinases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 136, n. 7, p. 1401-1411, 1990.
- STAATS, M. et al. Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. **Fungal genetics and biology**, v. 44, n. 1, p. 52-63, 2007.
- STEIN, C. P.; TEIXEIRA, E. P. Resistência de variedades de couve a *Brevicoryne brassicae* (L.) (Homoptera: Aphididae). **Bioikos**, v. 24, n. 2, 2012.
- STEYAERT, J. M.; WELD, R. J.; STEWART, A. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. **Fungal biology**, v. 114, n. 2/3, p. 198-208, 2010.
- SUEKANE, R. et al. Danos da mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) e distribuição vertical das ninfas em cultivares de soja em casa de vegetação. **Arquivos do Instituto biológico**, v. 80, n. 2, p. 151-158, 2013.
- SUN, M. H. et al. Effects of culture conditions on spore types of *Clonostachys rosea* 67-1 in submerged fermentation. **Letters in applied microbiology**, v. 58, n. 4, p. 318-324, 2014.
- SUN, M.H. et al. Fungal sporulation in two-stage cultivation. **Mycosystema**, v. 28, n. 1, p. 64-72, 2009.
- SUTTON, J. C.; PENG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, v. 83, n. 6, p. 615-621, 1993.
- SUTTON, J.C. et al. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant disease**, v. 81, n. 4, p. 316-328, 1997.
- SZEKERES, A. et al. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. **Acta microbiologica et immunologica hungarica**, v. 52, n. 2, p. 137-168, 2005.
- TOLEDO, A.V. et al. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Homoptera: Cicadellidae) in Argentina. **Journal of invertebrate pathology**, v. 92, n. 1, p.7-10, 2006.
- TU, J.C. An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. **Botanical bulletin of academia sinica**, v. 38 p.73-76. 1997.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. et al. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia brasileira**, v.22(1), p.69-73, 1997.
- VALE, F. X. R. et al. Manejo integrado das doenças do tomateiro: epidemiologia e controle. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**, p. 217-302, 2004.

- VICCINI, G. et al. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. **Process biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 275-278, 2007.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring. In: ROUSSOUS, S. et al. (Ed.). **Advances in solid-state fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 5-22
- WATANABE, S. et al. Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1. **Journal of pesticide science**, v. 31, n. 4, p. 375-379, 2006.
- WEHBE, M. et al. A simple passive equilibration method for loading carboplatin into pre-formed liposomes incubated with ethanol as a temperature dependent permeability enhancer. **Journal of controlled release**, v. 252, p. 50-61, 2017.
- WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular plant pathology**, v. 8, n. 5, p. 561-580, 2007.
- WU, H. Q. et al. Preparation of dry flowable formulations of *Clonostachys rosea* by spray drying and application for *Sclerotinia sclerotiorum* control. **Journal of integrative agriculture**, v. 17, n. 3, p. 613-620, 2018.
- YU, X. et al. Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 301-305, 1997.
- ZERBINI, F. M. et al. Identificação e taxonomia de novas espécies de vírus transmitidos por mosca-branca no Brasil. **Biológico**. v. 64, n. 2, p. 151-152. 2002.
- ZHANG, K. et al. Plackett-Burman optimization of L-lactic acid produced by fermentation of waste tobacco stems by *Lactobacillus casei* XJL. **Journal of food safety and quality**, v. 8, n. 4, p. 1351-1356, 2017.
- ZHANG, Y. et al. Pilot production of *Clonostachys rosea* conidia in a solid-state fermentor optimized using response surface methodology. **Engineering in life sciences**, v. 15, n. 8, p. 772-778, 2015.
- ZHANG, Y.Y. et al. A new two-phase kinetic model of sporulation of *Clonostachys rosea* in a new solid-state fermentation reactor. **Process biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1119-1125, 2013.
- ZHAO, M.L. et al. A potential virulence factor involved in fungal pathogenicity: serine-like protease activity of nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. **Fungal diversity**, v. 19, p.217-234, 2005.