



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CIRO HIDEKI SUMIDA

**CONTROLE QUÍMICO E BIOLÓGICO DO MOFO BRANCO  
NA CULTURA DA SOJA**

---

Londrina  
2012

**CIRO HIDEKI SUMIDA**

**CONTROLE QUÍMICO E BIOLÓGICO DO MOFO BRANCO  
NA CULTURA DA SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina,  
para obtenção do título de Doutor em Agronomia,  
área de concentração: Fitossanidade/Fitopatologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri

Londrina  
2012

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S955c Sumida, Ciro Hideki.

Controle químico e biológico do mofo branco na  
cultura da soja / Ciro Hideki Sumida. – Londrina,  
2012.  
81 f. : il.

Orientador: Marcelo Giovanetti Canteri.  
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, 2012.  
Inclui bibliografia.

1. Fungicidas – 2Mofo branco (Botânica) - 3. Sclerotinia  
sclerotiorum – 4. Trichoderma - 5. Soja – Teses - Doenças e pragas – I. Canteri,  
Marcelo Giovanetti. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências  
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 632.952

CIRO HIDEKI SUMIDA

**CONTROLE QUÍMICO E BIOLÓGICO DO MOFO BRANCO NA  
CULTURA DA SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina,  
para obtenção do título de Doutor em Agronomia,  
área de concentração: Fitossanidade/Fitopatologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri  
UEL – Londrina - PR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Isabel Balbi Peña  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi Prete  
UEL – Londrina - PR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luzia Doretto Paccola Meirelles  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho  
UEPG – Ponta Grossa - PR

---

Prof. Dr. Seiji Igarashi (suplente)  
UEL – Londrina – PR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Cristina Santiago (suplente)  
UEL – Londrina - PR

---

Orientador. Prof. Dr. Marcelo G. Canteri  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 24 de março de 2012

---

**DEDICO**

À Deus, aos meus pais e professores.

---

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Takanori Sumida e Sumika Sumida, pela atenção, esforço e dedicação que tiveram durante todos esses anos de vida.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri e Martin Homechin (*in memoriam*), responsáveis pela realização deste trabalho, obrigado pela amizade, pelo profissionalismo, pela dedicação, pelos ensinamentos e orientação.

À comissão examinadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Isabel Balbi Peña, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luzia Doretto Paccola Meirelles, Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho, Prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi Prete, Prof. Dr. Seiji Igarashi e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Cristina Santiago, pela participação na banca de defesa da tese de doutorado.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Feijó de Souza Daniel, à Bacharel em Química Mirian Souza Prado e à graduanda Oriana Meneghel Boschilia pelo desenvolvimento dos trabalhos de extração e fornecimento dos extratos de *Trichoderma* sp. e análise da cromatografia (HPLC).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Pós-graduação.

À minha namorada Patrícia Ogino, pela amizade, companheirismo, pela paciência e compreensão nas horas mais difíceis.

Aos meus irmãos, Célio Norio Sumida, Celso Yukishigue Sumida e Claudio Naoki Sumida, pela amizade e companheirismo durante todos esses anos de vida.

Aos meus amigos e colegas da graduação, mestrado e doutorado, Douglas Casaroto Peitl, Leonardo Tamanini, Idenize Pedrina Orsini, Fabiana Tibolla, Natália Sanches Calvo, Felipe André Araújo, Debora Fonseca Chagas, Flávia Elis de Mello, Giovanni de Oliveira Arieira, Fernando Cesar Baida, Camila Torres Stroze, Roger Pereira e Camila Scolin, pela amizade e auxílio no desenvolvimento dos ensaios.

Ao Dr. Celson A. Weiler e Dr. Lécio Kaneko da BALLAGRO – Agrotecnologia, pelo auxílio no fornecimento de produtos.

Ao Dr. Toshio Sergio Watanabe e Gilberto Takeo Yano da Integrada Cooperativa Agroindustrial, pelo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

## RESUMO

A eficiência do controle químico por meio de fungicidas e o controle biológico por meio de *Trichoderma* sp. foram avaliados sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, germinação carpogênica e germinação dos ascósporos em condições de laboratório. Avaliou-se também o controle do mofo branco na cultura da soja em condições de campo. Nos ensaios do controle químico foram testados os fungicidas fluazinam, procimidona, iprodione, tiofanato metílico, carbendazim, fluazinam + cloreto de benzalcônio e tratamento biológico com *Trichoderma harzianum*. Para inibição do crescimento micelial de *S. sclerotinia* e da germinação carpogênica *in vitro*, o fluazinam foi o único fungicida com inibição de 100% ( $p < 0,05$ ). Na inibição da germinação dos ascósporos, o procimidona e o cloreto de benzalcônio apresentaram inibição de 13,5 e 13,9%, respectivamente. Esses mesmos fungicidas foram os mais eficientes na redução da produção de ascósporos/apotécio representando 65,6% e 82,4%, respectivamente. O fluazinam, o procimidona e o cloreto de benzalcônio + fluazinam apresentaram maior eficiência ( $p < 0,05$ ) para o controle do mofo branco em condições de campo. Na safra 2009-10, esses três fungicidas reduziram a incidência da doença em 73% em comparação à testemunha e na safra 2010-11 reduziram em 77%. Nos ensaios de controle biológico foram avaliados nove isolados de *S. sclerotiorum* de diferentes regiões brasileiras, dois isolados de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42 e os extratos desses isolados de *Trichoderma* cultivados em meio líquido BD, do qual foi retirado o extrato do meio líquido (TH25-L e TH42-L) e do micélio (TH25-M e TH42-M), e cultivados em arroz com casca, do qual foi retirado o extrato do arroz (TH25-S e TH42-S). No teste de antagonismo, o isolado TH25 apresentou as maiores porcentagens de inibição dentre os nove isolados de *S. sclerotiorum*. No entanto, em algumas comparações de médias entre TH25 e TH42, não se observou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Os extratos de *Trichoderma* sp. TH42-L, TH25-M e TH42-M foram os mais eficientes na inibição do crescimento micelial da *S. sclerotiorum* com variação de inibição de 80 a 100%, de acordo com o isolado. Os extratos TH25-L e TH42-L apresentaram redução de 42 e 38% ( $p < 0,05$ ) da germinação carpogênica, respectivamente. Os isolados selvagens de *Trichoderma* sp. reduziram a incidência e a severidade do mofo branco na cultura da soja em condições de campo. No ensaio-1 (aplicação inverno/verão) os tratamentos com TH25 e TH42 apresentaram redução de 37 e 32% ( $p < 0,05$ ) da incidência em relação à testemunha. No ensaio-2 (aplicação verão) apresentaram redução de 29 e 40% ( $p < 0,05$ ) da incidência. No teste de antagonismo de confrontação direta, não foi observado variabilidade dos isolados de *S. sclerotiorum*. No entanto, no teste de extratos observaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os isolados de *S. sclerotiorum* quando aplicados os extratos menos eficientes.

**Palavras-chave:** *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trichoderma* sp. Fungicida. Apotécio, Ascósporo.

SUMIDA, C.H. **Chemical and biological control of white mold in soybeans**. 2012. 81p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

### ABSTRACT

Efficiency of chemical control by fungicides and biological control by *Trichoderma* sp. was evaluated on *Sclerotinia sclerotiorum* mycelial growth, carpogenic germination and ascospores germination. White mold control on soybeans was evaluated in field conditions. Chemical control tests evaluated fungicides fluazinam, procymidone, iprodione, thiophanate methyl, carbendazim, fluazinam + benzalkonium chloride and *Trichoderma harzianum* biological treatment. Fungicide fluazinam was the only one inhibit 100% ( $p < 0.05$ ) the *S. sclerotiorum* mycelial growth and carpogenic germination. Procymidone and benzalkonium chloride showed, respectively, 13,5 and 13,9% ascospores germination inhibition. These same fungicides were most effective to reduce the production of ascospores per apothecia, reducing 65,6% and 82,4%. Fluazinam, procymidone and benzalkonium chloride + fluazinam were more efficient ( $p < 0,05$ ) on white mold control under field conditions. These fungicides reduced disease incidence by 73% compared to control in the 2009-10 crop and in 2010-11 crop, reduced by 77%. Biological control tests evaluated nine *S. sclerotiorum* strains from different Brazilian regions, two *Trichoderma* strains TH25 and TH42, and *Trichoderma* extracts grown in liquid media PD, which was removed the extract of liquid (TH25 and TH42-L-L) and extract of mycelium (TH25-M and TH42-M), and grown in paddy, which was removed from the extract solid (TH25-S and TH42 -S). *Trichoderma* strain TH25 had the highest percentages of inhibition among the nine *S. sclerotiorum* strains in the antagonism test. However, some comparisons between TH25 and TH42, there was no significant difference ( $p < 0,05$ ). *Trichoderma* sp. extracts TH42-L, TH25-M and TH42-M were the most effective on mycelial growth inhibiting of *S. sclerotiorum*, which was ranging by 80 to 100%, according to the *S. sclerotiorum* strain. TH25-L and TH42-L extracts decreased by 42 and 38% the germination carpogenic inhibition ( $p < 0.05$ ), respectively. *Trichoderma* wild strains reduced white mold incidence and severity on soybeans under field conditions. These biologic treatments reduced the disease incidence in the test-1 (treatment winter / summer) by 37 and 32% reduction ( $p < 0,05$ ) and in the test-2 (treatment summer) reduced by 29 and 40% ( $p < 0,05$ ). Antagonism test of direct confrontation did not observed the variability of *S. sclerotiorum* strains. However, extracts test showed significant differences ( $p < 0,05$ ) between *S. sclerotiorum* isolates when treated by extracts less efficient.

**Keywords:** *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trichoderma* sp. Fungicide. Apothecia. Ascospore.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Porcentagem de inibição de crescimento micelial in vitro da *Sclerotinia sclerotiorum* em função da concentração dos produtos homogeneizados no meio de cultura BDA. As médias seguidas da mesma letra nas colunas de mesma cor não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. (CB) cloreto de benzalcônio, (CV) coeficiente de variação. .... 34
- Figura 2** – Porcentagem da inibição da germinação in vitro dos ascósporos de *S. sclerotiorum* após tratamento com fungicidas no meio de cultura ágar-água, (CB) cloreto de benzalcônio. .... 36
- Figura 3** – Porcentagem da inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* após tratamento com extratos de dois isolados de *Trichoderma* sp., cultivados em arroz com casca (TH25-S e TH42-S do extrato do arroz) e meio líquido BD (TH25-L e TH42-L do extrato do líquido e TH25-M e TH42-M do extrato do micélio). Comparação de médias entre TH25 e TH42. Médias seguidas de mesma letra entre cada isolado de *S. sclerotiorum*, não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, 5% de probabilidade de erro. .... 57
- Figura 4** – Cromatograma obtido dos extratos do líquido TH25-L a 220nm e TH25-L a 254nm. .... 60
- Figura 5** – Cromatograma obtido dos extratos do líquido TH42-L a 220nm e TH42-L a 254nm. .... 60
- Figura 6** – Cromatograma obtido dos extratos do micélio TH25-M a 220nm e TH25-M a 254nm. .... 61
- Figura 7** – Cromatograma obtido dos extratos do micélio TH42-M a 220nm e TH42-M a 254nm. .... 61
- Figura 8** – Cromatograma obtido dos extratos do arroz TH25-S a 220nm e TH25-S a 254nm. .... 62
- Figura 9** – Cromatograma obtido dos extratos do arroz TH42-S a 220nm e TH42-S a 254nm. .... 63

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** –Porcentagem de inibição da germinação dos escleródios (IGE), inibição da geminação carpogênica (IGC), inibição da germinação de ascósporos (IGA) e número de ascósporos produzidos por apotécio (ASC/APO x 1000), após aplicação de fungicidas no solo em gerbox. Londrina-PR, 2011. .... 35
- Tabela 2** –Incidência e severidade do mofo branco tratadas com diferentes fungicidas e produtividade da soja safras 2009-10 e 2010-11. Mauá da Serra, PR. .... 38
- Tabela 3** –Crescimento micelial de *Trichoderma* sp. (%) confrontadas com *S. sclerotiorum* isolados de diferentes regiões brasileiras, avaliadas pela escala de notas de Bell et al. (1982) e transformadas em porcentagem. Londrina-PR, 2011. .... 54
- Tabela 4** –Análise de variância para delineamento fatorial 9x2x3 da inibição micelial de nove isolados de *S. sclerotiorum* tratadas com extratos de dois isolados de *Trichoderma* sp., cultivadas em meio líquido BD (extrato do líquido e do micélio) e arroz com casca (extrato do arroz). Londrina-PR, 2011. .... 55
- Tabela 5** –Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (%) após tratamento com extratos de dois isolados de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42, cultivados em arroz com casca (extrato do arroz) e meio líquido BD (extrato do líquido e do micélio). Londrina-PR, 2011. .... 56
- Tabela 6** –Porcentagem de inibição da germinação carpogênica e número de ascósporos/ apotécio (ASC/APO x 1000), após tratamento com extratos dos isolados de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42. Londrina-PR, 2011. .... 58
- Tabela 7** –Incidência e severidade do mofo branco, produtividade na cultura da soja tratadas com *Trichoderma* sp. e fungicida fluazinam, em dois ensaios: ensaio 1 (aplicação inverno/verão) e ensaio 2 (aplicação verão). Mauá da Serra-PR, 2011. .... 64

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 CULTURA DA SOJA .....	14
2.2 DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA .....	15
2.3 MOFO BRANCO OU PODRIDÃO BRANCA DA HASTE .....	16
2.4 CONTROLE DA DOENÇA .....	18
2.5 CONTROLE QUÍMICO .....	19
2.6 CONTROLE BIOLÓGICO .....	21
2.6.1 <i>Trichoderma</i> spp. ....	23
<b>3 ARTIGO A - INIBIÇÃO DA SCLEROTINIA SCLEROTIORUM POR FUNGICIDAS IN VITRO E O CONTROLE QUÍMICO DO MOFO BRANCO NA CULTURA DA SOJA</b> .....	27
3.1 INTRODUÇÃO .....	28
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.2.1 Isolamento dos Fitopatógenos .....	29
3.2.2 Inibição do Crescimento Micelial de <i>S.sclerotiorum</i> por Fungicidas .....	29
3.2.3 Inibição da Germinação Carpogênica de <i>S.sclerotiorum</i> por Fungicidas .....	30
3.2.4 Inibição da Germinação de Ascósporos de <i>S.sclerotiorum</i> por Fungicidas em Placas de Petri.....	31
3.2.5 Controle Químico do Mofo Branco na Cultura da Soja .....	32
3.2.6 Análise Estatística .....	33
3.3 RESULTADOS .....	33
3.3.1 Inibição do Crescimento Micelial de <i>S.Sclerotiorum</i> por Fungicidas.....	33
3.3.2 Inibição Da Germinação Carpogênica De <i>S.Sclerotiorum</i> Por Fungicidas.....	34
3.3.3 Inibição Da Germinação De Ascósporos De <i>S.Sclerotiorum</i> Por Fungicidas Em Placas De Petri.....	36
3.3.4 Controle Químico Do Mofo Branco Na Cultura Da Soja .....	36
3.4 DISCUSSÃO .....	38
3.5 CONCLUSÃO .....	42
3.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	42

<b>4 ARTIGO B - ANTAGONISMO DO TRICHODERMA sp. À SCLEROTINIA SCLEROTIURUM IN VITRO E CONTROLE BIOLÓGICO DO MOFO BRANCO NA CULTURA DA SOJA</b> .....	45
4.1 INTRODUÇÃO.....	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.2.1 Antagonismo de Trichoderma sp. Frente a isolados de S. Sclerotiorum de Diferentes Regiões Brasileiras.....	48
4.2.2 Influência dos Extratos de Trichoderma sp. Para Inibição do Crescimento Micelial de Diferentes Isolados de S. Sclerotiorum.....	49
4.2.3 Influência dos Extratos de Trichoderma sp. Na Inibição da Geminação Carpogênica e Germinação de Ascósporos de S. Sclerotiorum.....	51
4.2.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) dos Extratos de Trichoderma sp. TH25 e TH42, Cultivados em Meio Líquido BD e Arroz.....	52
4.2.5 Controle Biológico do Mofó Branco na Cultura da Soja.....	52
4.2.6 Análise Estatística.....	53
4.3 RESULTADOS.....	54
4.3.1 Antagonismo de Trichoderma sp. Frente a Isolados de S. Sclerotiorum de Diferentes Regiões Brasileiras.....	54
4.3.2 Influência dos Extratos de Trichoderma sp. Na Inibição do Crescimento Micelial de Diferentes Isolados de S. Sclerotiorum.....	55
4.3.3 Influência dos Extratos de Trichoderma sp. Na Inibição da Geminação Carpogênica e Germinação de Ascósporos de S. Sclerotiorum.....	58
4.3.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) dos Extratos de Trichoderma sp. TH25 e TH42, Cultivados em meio Líquido BD e Arroz.....	59
4.3.5 Controle Biológico Do Mofó Branco Na Cultura Da Soja.....	63
4.4 DISCUSSÃO.....	65
4.5 CONCLUSÃO.....	69
4.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	69
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	73
<b>6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a leguminosa mais cultivada no mundo devido ao seu alto teor de proteína, emprego na extração de óleo para alimentação humana, manufatura de muitos produtos processados e semiprocessados, bem como na produção de biodiesel. Possui também outras utilidades como adubo verde, forragem, silagem, feno e pastagem (SEDIYAMA et al, 2009). A produção mundial da cultura da soja na safra 2010/11 foi de 263,5 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor, responsável por cerca de 28% desse volume, com produção de 74,5 milhões de toneladas. Entre os Estados brasileiros, o Mato Grosso é o maior produtor com 20,4 milhões de toneladas, em seguida o Paraná com 15,4 milhões de toneladas e Rio Grande do Sul com 11,6 milhões de toneladas (EPAGRI, 2011).

Entre os fatores limitantes na produção de soja, estão as doenças. Dentre elas, a podridão branca ou mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary com perdas de até 30% em lavouras de soja (NASSER et al., 1999). *S. sclerotiorum* trata-se de um fungo habitante de solo e considerado como um dos mais destrutivos, podendo infectar aproximadamente 408 espécies de plantas (BOLAND e HALL, 1994). Sobrevive na forma de escleródios no solo e em restos culturais, onde germinam e colonizam matéria orgânica formando mais escleródios. Em condições de temperaturas baixas e elevada umidade no solo, um único escleródio pode produzir um ou vários apotécios, onde são formadas ascas contendo ascósporos. Esses esporos podem ser ejetados a longas distâncias e alojar-se em qualquer parte das plantas, iniciando novos sítios de infecção (BARDIN e HUANG, 2001; HEGEDUS e RIMMER, 2005; DHINGRA et al., 2009).

Para o controle de *S. sclerotiorum* ainda existem algumas barreiras, como ausência de cultivares resistentes para a maioria das culturas hospedeiras de importância econômica (BARDIN e HUANG, 2001). O controle químico pode ser ineficiente devido às dificuldades em realizar uma aplicação com boa cobertura das plantas e coincidir com a liberação de ascósporos (MORTON e HALL, 1989). Segundo Mueller et al. (2002), mesmo com essas dificuldades, a aplicação de fungicidas pode auxiliar no gerenciamento das táticas de controle, reduzindo significativamente o número de escleródios viáveis e podendo ser introduzida como medida preventiva, por meio de tratamento de sementes e aplicação durante o período vegetativo ou reprodutivo. Esta flexibilidade em função das épocas de aplicação pode beneficiar na redução da incidência da doença.

No entanto, métodos alternativos de controle vêm sendo desenvolvidos com objetivo de complementar o uso de fungicidas, como o controle biológico (FERNANDES et al., 2006). Em períodos anteriores, o objetivo do controle de doenças de plantas era eliminar completamente o patógeno com o uso contínuo de produtos químicos, muitas vezes, de modo indiscriminado e sem mensurar as consequências posteriores. Essa prática levou a modificações no ambiente, como o surgimento de patógenos resistentes, ocorrência de surtos de doenças consideradas anteriormente secundárias, redução da população de microrganismos benéficos, e efeitos deletérios (nocivos) ao homem, aos animais e ao ambiente, devido ao acúmulo de resíduos no solo, na água e nos alimentos (GRIGOLETTI JUNIOR et al., 2000).

O controle biológico vem recebendo destaque devido à utilização de microrganismos não fitopatogênicos como fungos e bactérias, para o biocontrole da doença, bem como na destruição de estruturas de resistência como os escleródios (ETHUR et al., 2006). Esse método de controle pode manter o equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, quando na presença do patógeno, não sofra danos significativos (GRIGOLETTI JUNIOR et al., 2000).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são caracterizados como micoparasitas de *S. sclerotiorum*, capazes de colonizar micélios e escleródios (HUANG e ERICKSON, 2008). A eficiência desse fungo para o controle de fitopatógenos é observada, principalmente, em relação àqueles com estruturas de resistência difíceis de serem atacadas por microrganismos como esporos, escleródios, clamidósporos e microescleródios (MELO, 1996).

Esses fungos são produtores de muitos metabólitos, considerados importantes antibióticos (VINALE et al., 2008). Weidling (1934) foi o pioneiro em relatar a produção desses metabólitos produzidos pelo *Trichoderma* spp., descobrindo o potencial desse fungo como agente de controle biológico devido ao mecanismo de interação de antibiose. Produzem metabólitos como peptaibois e peptídeos N-acilados (DANIEL e RODRIGUES FILHO, 2007), assim como konigininas e fosfolipases A<sub>2</sub> (SOUZA et al., 2008).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o controle químico por meio de fungicidas e o controle biológico por meio de *Trichoderma* sp., no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, germinação dos apotécios e dos ascósporos, e controle do mofo branco em condições de campo, para elucidar questões básicas que auxiliem no desenvolvimento de táticas para o controle integrado do mofo branco na cultura da soja.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CULTURA DA SOJA

A soja é uma planta pertencente à classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae, gênero e espécie, *Glycine max*. O gênero *Glycine* tem várias espécies originárias das regiões como África, Ásia oriental e Austrália. Existem relatos de que a domesticação da soja teve início há cerca de 1100 anos a.c., na região nordeste da China, logo introduzida na Coréia, Japão, Europa, América do Norte, até chegar ao Brasil. Os primeiros relatos sobre a soja no Brasil datam de 1882, na Bahia (SEDIYAMA et al., 2009).

A produção brasileira de soja vem crescendo e se difundindo pelo Brasil desde 1970, avançando do sul do País para o sudeste, centro-oeste, norte e nordeste. Nas safras de 2006/07 a 2010/11, as participações dos estados têm variado em relação a produção de soja. Mato Grosso e Paraná aumentaram sua produção e mantiveram as primeiras posições. Enquanto os Estados de Goiás, Bahia, Maranhão, Santa Catarina e Tocantins melhoraram suas participações. Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo tiveram comportamento contrário. Os onze estados citados são responsáveis por 97% da produção do país, tendo representantes em todas as regiões. Os outros 16 estados aumentaram sua participação de 1,8% para 2,8% (EPAGRI, 2011).

A introdução da soja no cerrado brasileiro foi possível mediante seleção genética de linhagens com alelos que condicionam floração tardia, alta tolerância ao alumínio e uso eficiente de cálcio. A identificação e seleção de genótipos com período juvenil longo possibilitaram a exploração do potencial produtivo da cultura nessa região, por permitir um período vegetativo maior e conseqüentemente, maior acúmulo de matéria seca, resultando em maiores produtividades de grãos (DESTRO et al., 2001).

A soja apresenta grande diversidade genética e morfológica devido ao grande número de cultivares, proveniente dos programas de melhoramento genético que visam genótipos mais produtivos, resistentes a pragas, doenças e adaptados a diversas condições edafoclimáticas (NOGUEIRA et al., 2009).

É a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal no mundo, em função da qualidade e baixo custo de produção (WILCOX, 1987). Em geral, possui 40% de proteína e 20% de óleo, sendo que o teor médio das cultivares no Brasil é de 38% de proteína e de 19% de óleo (SEDIYAMA et al., 2009).

Nas últimas três décadas foi a cultura que apresentou maior expansão no Brasil, e hoje corresponde a 49% da área plantada em grãos do país. A tecnificação dos produtores e os avanços tecnológicos no manejo da cultura são responsáveis por esse aumento da produtividade. O uso crescente na alimentação humana e fabricação de rações para animais também influenciaram nesse aumento. A soja é considerada um produto de destaque na agricultura nacional e na balança comercial. O cultivo de soja no país tem se orientado para atingir padrões com práticas de agricultura sustentável, através da utilização de técnicas como o plantio direto e sistemas de integração-lavoura-pecuária. Técnicas que possam maximizar o uso intensivo da terra, reduzindo a necessidade de exploração de novas áreas para o cultivo, conseqüentemente contribuindo para preservação do meio ambiente. Constitui-se também como alternativa na fabricação do biodiesel, que são combustíveis que podem reduzir as emissões dos gases poluentes responsáveis pelo efeito estufa na atmosfera (MAPA, 2011).

A produção mundial da cultura da soja na safra 2010/11 foi de 263,5 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor, responsável por cerca de 28% desse volume, com produção de 74,5 milhões de toneladas. Entre os Estados brasileiros a maior produção foi no Mato Grosso com 20,4 milhões de toneladas, em seguida o Paraná com 15,4 milhões e Rio Grande do Sul com 11,6 milhões de toneladas. O Brasil é auto-suficiente na produção de soja, com exportação de 31,8 milhões de toneladas e consumo de 39,1 milhões de toneladas, do total de 74 milhões de toneladas produzidos na safra 2010/11. As exportações brasileiras se diferenciam por produto em relação ao seu destino, pois no ano de 2010, o óleo de soja brasileiro foi exportado para 148 países, o farelo para 85 países e o grão para 80 países (EPAGRI, 2011).

## 2.2 DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA

As doenças bióticas, na agricultura, são relatadas desde seu início e seus agentes causais disseminaram-se com a prática da monocultura. Mesmo as melhores práticas para controle e as novas tecnologias de cultivo não são suficientes para resolver todos os problemas fitopatológicos (CAVALCANTI et al., 2005).

A grande expansão de área cultivada proporcionou um aumento no número e severidade das doenças que afetam a soja (HARTMAN et al., 1999). A cultura pode ser colonizada por vários tipos de microrganismos, sendo que alguns estabelecem uma relação patogênica. São conhecidos aproximadamente 125 microrganismos patogênicos à soja, mas cerca de 40 são considerados de importância econômica. Alguns desses patógenos podem

incidir ao mesmo tempo na lavoura em diferentes níveis, que variam de safra a safra (SINCLAIR e BACKMAN, 1989; DHINGRA et al., 2009).

Roese et al. (2001) realizaram um levantamento de doenças na cultura da soja mais comuns nos municípios da região Oeste do Estado do Paraná e foram identificadas vinte e um agentes causais de doenças, sendo quinze de etiologia fúngica, um de etiologia bacteriana, um de etiologia viral e quatro associadas a nematóides. Dentre essas doenças, as mais frequentes foram míldio, oídio, crestamento bacteriano e galhas, causadas por *M. javanica* e *M. incognita*. No teste de sanidade de sementes verificou-se que sementes das 16 cultivares de soja testadas, todas apresentaram *Fusarium* sp., *Colletotrichum dematium* e *Phomopsis* sp.

Wrather e Koenning (2009) relataram as perdas causadas pela ocorrência de vinte quatro doenças na cultura da soja entre os anos de 1996 a 2007 nos Estados Unidos, as quais provocaram aproximadamente 129,8 milhões de toneladas de perda. Dentre elas, o mofo branco causou perdas de 4,9 milhões de toneladas.

### 2.3 MOFO BRANCO OU PODRIDÃO BRANCA DA HASTE

O mofo branco ou podridão branca da haste é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (DHINGRA et al., 2009). Sobrevive na forma de escleródios no solo e em restos culturais, podendo germinar miceliogenicamente (BARDIN e HUANG, 2001). Essa germinação ocorre na presença de hospedeiros suscetíveis ou substratos formados por tecidos mortos ou senescentes. A temperatura ótima para o desenvolvimento do micélio situa-se entre 18°C e 25°C. O escleródio também pode germinar carpogenicamente formando apotécios, que emergem na superfície do solo e liberam os ascósporos. Em condições de alta umidade relativa, normalmente, acima de 70% e temperatura ao redor de 20°C, os apotécios podem liberar ascósporos durante várias semanas, os quais são responsáveis pela infecção da parte aérea das plantas (LEITE, 2005).

Boland e Hall (1994) relataram o grande número de plantas hospedeiras de *S. sclerotiorum*, as quais pertencem a 408 espécies de 278 gêneros e 75 famílias de plantas.

O fungo *S. sclerotiorum* foi descrito pela primeira vez por Anton de Bary em 1884 (PURDY, 1979). Mas o primeiro relato da ocorrência da doença foi em 1921 no Brasil, Estado de São Paulo na cultura da batata (CHAVES, 1964). Em 1947 ocorreram relatos da doença na cultura da soja na Hungria (GRAU e HARTMAN, 1999). No Brasil, até o ano de 1976, o patógeno foi relatado atacando principalmente hortaliças, mas a partir da

safrá 1976-1977 no centro-sul do Paraná, foi detectado em lavouras de soja. Na safrá de 1982-83, foi relatado na cultura da soja na região do Alto Paranaíba (MG). Disseminou-se para o Distrito Federal e região, nos cultivos de verão (soja) e de inverno (feijão), em sistema de cultivo com pivô central (NASSER e SPEHAR, 2001).

Em 1996, o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary também foi identificado pela primeira vez como agente patogênico na cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar Deltapine, irrigado sob pivô central, em Paracatu, MG. Foram observados sintomas característicos de murcha, necrose e podridão úmida da haste, do pecíolo da folha e da maçã. No interior do capulho, em 95% das plantas inspecionadas, foram observados micélios brancos de aspecto cotonoso e escleródios escuros irregulares do patógeno. Apartir do isolado do patógeno realizou-se o teste de patogenicidade em algodoeiro, na cultivar Deltapine, de onde o patógeno foi reisolado, completando-se, assim, os postulados de Koch (CHARCHAR et al., 1999).

Bueno et al. (2005) relataram a ocorrência de *S. sclerotiorum* em *Aster ericoides* L. da família Asteracea, uma planta ornamental perene originária da América do Norte, muito cultivada em jardins, vasos ou como flores de corte.

Homechin (1982) relatou plantas daninhas como hospedeiras de *S. sclerotiorum*, como erva-mate (*Borreria alata* Aubl), corda de viola (*Ipomoea nil* (L.) Roth), amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) e caruru (*Amaranthus deflexus* L.).

Atualmente, o fungo *S. sclerotiorum* está disseminado em todo o país, com maior incidência principalmente nos estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, em locais que apresentam condições climáticas favoráveis ao patógeno, ou seja, alta umidade relativa e temperatura amena, característico de regiões acima de 800 m de altitude (ALMEIDA et al., 2005; ITO e PARISI, 2009).

Na cultura da soja, é uma doença que provoca grandes perdas, principalmente nos cultivos sob irrigação por aspersão (DHINGRA et al., 2009). Segundo Wrather e Koenning (2009), causou perdas de 4,9 milhões de toneladas nos anos de 1996 a 2007 nos Estados Unidos. Em Estados brasileiros tiveram relatos de áreas com cultivo de soja com 45% de contaminação pelo fungo, na safrá de 2008-09 (ITO e PARISI, 2009).

A disseminação da doença é facilitada pela contaminação de sementes ou grãos com escleródios do fungo, que são difíceis de separar durante a colheita e beneficiamento. Durante o desenvolvimento da cultura, a fase mais vulnerável é a floração plena R2 e o início de formação das vagens (R3), ambos de acordo com a escala de Fehr e Caviness (1977). O ambiente ideal para o desenvolvimento da doença é a alta umidade

relativa e temperaturas entre 10°C a 21°C. Dependendo da ocorrência de condições ideais para o patógeno nos estádios iniciais da cultura, pode ocorrer tombamento pré e pós-emergente de plântulas de soja (DHINGRA et al., 2009). Essas condições de alta umidade e temperatura amena, normalmente, são observadas durante a cultura da soja, principalmente, sob condições de excesso de precipitação aliado a temperaturas moderadas (LEITE, 2005).

Como sintomas característicos têm-se a podridão úmida coberta por um micélio branco cotonoso na superfície do tecido do hospedeiro (CARDOSO, 1990). Inicialmente são manchas de anasarca que, posteriormente, passam para coloração castanho claro e logo desenvolvem abundante formação de micélio. Em alguns dias, o micélio transforma-se numa massa compactada, rígida e de coloração escura, os escleródios. Esses podem ser formados externamente na superfície da planta e no interior da haste e vagens infectadas (ALMEIDA et al., 2005).

A produção de grãos ou sementes em sistemas irrigados ou de sequeiro nos cerrados têm enfrentado grandes problemas devido à ocorrência do mofo branco. Por esse motivo, um novo método de detecção de *S. sclerotiorum* foi desenvolvido para obter resultados de modo mais rápido. Desenvolveu-se um meio de cultura denominado neon, capaz de identificar o patógeno por meio da mudança de coloração (PERES et al., 2002). O método foi considerado bastante eficiente na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão e soja, em trabalhos desenvolvidos na Embrapa Cerrados (NASSER et al., 1999).

## 2.4 CONTROLE DA DOENÇA

O controle integrado de doenças é a adoção conjunta de diferentes métodos, como uso de sementes sadias, erradicação de plantas com sintomas, rotação de culturas, manejo da fertilidade e da irrigação, controle químico e plantio de cultivares resistentes que, quando empregados de forma conjunta, resultam em maior eficiência no controle e representam menor custo financeiro e ambiental (AGRIOS, 2005; SILVA, 2006).

É praticamente impossível erradicar o fungo *S. sclerotiorum* das áreas infestadas, mas existem várias práticas culturais que podem auxiliar no manejo integrado do mofo branco, permitindo o cultivo com produtividade (GÖRGEN et al, 2010). Práticas como sombreamento da lavoura, espaçamento de plantas, densidade de semeadura, arquitetura da planta e utilização de palhada densa, que representa uma das principais ferramentas no controle físico por agir sobre a germinação dos escleródios e por reduzir a formação de apotécios (FURLAN, 2009).

Em áreas com ocorrência da doença recomenda-se fazer rotação e sucessão da soja com culturas como milho, aveia branca ou trigo e eliminar plantas daninhas hospedeiras do patógeno (ALMEIDA et al., 2005).

A utilização de sementes certificadas diminuem os riscos de introdução do patógeno na área, assim como a realização do tratamento das sementes com fungicidas (HENNING et al., 2009).

A cobertura de palhada sobre o solo das áreas cultivadas também pode minimizar os danos causados pelo patógeno. Gorgen et al. (2009) avaliaram os efeitos da cobertura vegetal com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e aplicação de *Trichoderma harzianum*. Nos tratamentos sobre palhada verificou-se redução de até 98% de apotécios, conseqüentemente, houve redução da incidência da doença, constatando-se a eficiência e viabilidade do uso da palhada de *B. ruziziensis* para o controle do mofo-branco na cultura da soja em áreas de Cerrado.

O aumento do espaçamento para redução do mofo branco tem sido uma recomendação (FURLAN, 2009; ALMEIDA et al., 2005). No entanto, em um trabalho desenvolvido por Napoleão et al. (2006) sobre a intensidade do mofo branco sob diferentes espaçamentos e cultivares de feijoeiro observou-se que a porcentagem de plantas infectadas e a severidade da doença não diferiram estatisticamente quanto ao hábito de crescimento da cultivar, ao espaçamento ou à interação entre eles.

A eficiência do controle químico e biológico do mofo branco depende principalmente da época e modo de aplicação. As pulverizações devem ser realizadas uniformemente, com boa distribuição nos tecidos da planta e, se possível, alcançando a superfície do solo, onde surgem os apotécios. A primeira pulverização deve ser feita preventivamente na abertura das primeiras flores, no estágio R1, quando normalmente podem surgir os primeiros apotécios. Deve ser realizada quando há histórico da doença na área e as condições forem favoráveis. Além disso, a qualidade da aplicação do produto químico ou biológico é tão importante quanto a época, porque é preciso atingir as partes inferiores da planta e a superfície do solo, além de proteger as flores para uma maior eficiência (FURLAN, 2009).

## 2.5 CONTROLE QUÍMICO

As doenças causadas por fungos formadores de escleródios apresentam grande dificuldade de controle com aplicação de fungicidas, e o custo de aplicação,

geralmente, faz com que o uso de fungicidas seja inviável. Alguns fungicidas considerados eficientes para controle em condições de laboratório e casa de vegetação, quando empregados a campo podem não apresentar a mesma eficiência, tendo como prováveis causas o contato inadequado do fungicida com os escleródios e necessidade de elevadas dosagens para inviabilizá-los (COLEY-SMITH e COOKE, 1971).

O controle químico pode ser ineficiente devido às dificuldades em realizar uma aplicação com boa cobertura das plantas e coincidir com a liberação de ascósporos. No entanto, o nível de controle está diretamente relacionado com o número de flores no dossel das plantas que são atingidas pelo fungicida, assim como os escleródios e apotécios no solo (MORTON e HALL, 1989), pois segundo Almeida et al. (2005) as infecções iniciam-se com mais frequência a partir das inflorescências.

Mesmo com todas essas dificuldades, a aplicação do controle químico auxilia no gerenciamento das táticas de manejo da doença e apresenta uma flexibilização das épocas de aplicação, quando comparado aos métodos de controle cultural (MUELLER et al., 2002).

O uso de fungicidas se torna mais importante quando outras medidas não são suficientes para assegurar o controle (FURLAN, 2009). Segundo Bardin e Huang (2001), devido à falta de cultivares resistentes à doença, a utilização do controle químico por meio da aplicação de fungicidas, tem sido um método eficiente para redução do mofo branco.

Smith et al. (2008) obtiveram resultados positivos do controle químico da *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura do amendoim, assim como Vieira et al. (2001) e Vieira et al. (2003) na cultura do feijoeiro, Costa e Costa (2004) em trabalhos *in vitro*, Nunes Junior (2011), Campos et al. (2011) e Jaccoud Filho et al. (2011) na cultura da soja.

Mueller et al. (2002) desenvolveram um trabalho sobre a eficiência de fungicidas sobre a *S. sclerotiorum* em várias cultivares de soja. Foram testados os fungicidas benomil, tebuconazole, tiofanato metílico e vinclozolina, *in vitro* e em campos experimentais. Nas cultivares onde a incidência da doença em campo foi alta, não foi observado controle consistente da doença, no entanto, em baixa incidência da doença as aplicações controlaram até 50%.

Nunes Junior et al. (2011) avaliaram a eficácia de fungicidas no controle de mofo branco na cultura da soja no Estado de Goiás e relataram a redução da doença quando aplicado os fungicidas procimidona, fluzinam, fluopyram, dimoxystrobina+boscalid e picoxystrobina+nimbus.

A utilização do tratamento de sementes com fungicidas também é recomendado para redução da *S. sclerotiorum* (TU, 1989; ALMEIDA et al., 2005; HENNING et al., 2009). Vrisman et al. (2011) relataram o controle de 95% do patógeno por meio de tratamento de sementes com fungicidas.

## 2.6 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico, considerado como método alternativo de controle, vem recebendo destaque para o biocontrole de *S. sclerotiorum* (ETHUR et al., 2005). Trata-se da prática da redução do inóculo dos fitopatógenos ou das atividades determinantes da doença provocada por esses nos seus estados de atividade ou dormência. Ocorre pela ação de um ou mais organismos de forma natural ou pela manipulação do ambiente, do hospedeiro ou do antagonista. Um ou mais agentes de biocontrole são introduzidos por meio de práticas agrícolas que tornem o ambiente favorável a esses. Pode-se ainda adequar o hospedeiro às atividades antagônicas dos microrganismos, pela introdução de massas de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos ou agentes benéficos (BIZI, 2007). Segundo Bettiol e Ghini (1995), a definição mais simples e direta do controle biológico é o controle de um microrganismo através de outro microrganismo.

A utilização desse método de controle natural de doenças de plantas e pragas se destaca no agronegócio pela substituição ou complementação dos produtos químicos. A aplicação melhora e/ou aumenta a qualidade do produto agrícola e contribui para a preservação dos recursos naturais, aumentando a sustentabilidade dos agroecossistemas sem causar poluição ambiental (PEIXOTO, 2005). Segundo Agrios (2005) existe a relação entre a supressão de doença de planta e a diversidade ou abundância da comunidade microbiana.

Em épocas que datam de, aproximadamente, 4000 a.C., quando ocorria baixa produtividade, os chineses deixavam o solo sob repouso, para aumentar intuitivamente as chances da recuperação da população de antagonistas (KHAN et al., 1971).

Cook e Baker (1983) relataram o costume de se recorrer a procedimentos curiosos para tratamento de ferimentos de podas de árvores, como aplicação de fezes e urina, pincelamento de mistura de esterco, cal e cinza, e até a vedação do ferimento com lama. Esse material aplicado continha uma diversidade de microrganismos desconhecidos, mas que, de alguma forma, exerciam antagonismo contra os patógenos-alvo.

As primeiras pesquisas envolvendo a introdução consciente de antagonistas para controle biológico de doenças de plantas tiveram início no século XX, entre as décadas

de 1920-1940 (ROMEIRO, 2007). Hartley (1921) introduziu fungos previamente selecionados em viveiros de mudas de essências florestais para controle de tombamento. Henry (1931) selecionou actinomicetos, bactérias e fungos para aplicação em solo estéril, para conferir proteção relativa de plantas de trigo frente a *Helminthosporium sativum*.

A microbiota presente no solo ou no substrato pode exercer efeitos diretos e indiretos na produtividade e na qualidade dos produtos agrícolas (SIQUEIRA e FRANCO, 1988). As populações microbianas nativas, presentes em substratos para mudas desempenham funções similares às do solo, seja decompondo os resíduos orgânicos com liberação de nutrientes e CO<sub>2</sub>, seja produzindo e liberando substâncias estimuladoras do crescimento vegetal, seja estabelecendo simbiose mutualista com plantas ou realizando controle biológico de pragas e doenças (SILVEIRA et al., 2002).

Como mecanismos de controle biológico de fitopatógenos por microrganismos antagônicos, estão envolvidos processos como antibiose, competição, parasitismo, indução de mecanismos de resistência e premunização (BEDENDO et al, 2011). Na antibiose, a interação dos microrganismos resulta na produção de metabólitos de um dos microrganismos com efeito antagônico sobre outro, usualmente denominados antibióticos. A competição resulta da interação entre dois ou mais organismos, os quais disputam o mesmo substrato, espaço ou oxigênio e no parasitismo (BETTIOL e GHINI, 1995). A indução de mecanismos de resistência refere-se à ativação dos mecanismos latentes de resistência de uma planta por meio de agentes externos bióticos. Premunização é um fenômeno exclusivo de vírus e consiste na proteção de uma planta contra o patógeno pela colonização antecipada dessa planta por uma estirpe fraca do mesmo patógeno (BEDENDO et al, 2011). Esses mecanismos podem ocorrer de modo simultâneo, durante o ciclo de vida do antagonista. A capacidade para produzir substâncias e o efeito fungicida ou fungistático podem variar entre espécies e isolados da mesma espécie. Antes de lançar mão de estratégias para aumentar a efetividade desses agentes, é importante conhecer quais são as características passíveis de manipulação para tornar o biocontrole viável (MARTINS-CORDER e MELO, 1998).

A aplicação de micoparasitas para atacar escleródios e reduzir a população no solo é uma forma de biocontrole, e o sucesso deste método de controle depende da manutenção e estabelecimento da população dos antagonistas (BIN et al., 1991)

### 2.6.1 *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* tem ampla distribuição no mundo, em praticamente todos os tipos de solos e habitats naturais, especialmente, naqueles que contém ou são formados de matéria orgânica. Trata-se de um microrganismo necrotrófico que tem apresentado grande eficácia no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos (MELO, 1998). Na sua fase teleomórfica, é classificado como ascomiceto da ordem Hypocreales e gênero *Hypocrea* (MASSOLA JUNIOR e KRUGNER, 2011). São microrganismos de vida livre que são altamente interativos nos solos, nas raízes e superfície foliar. Evoluíram como simbioses de plantas oportunistas, proliferando, competindo e sobrevivendo em solos e outros ecossistemas complexos. São capazes de colonizar as raízes, invadindo as camadas superficiais da raiz, porém sem penetração, pelo menos em parte. Mas podem provocar reações de defesa da planta. Apesar de aparentemente terem a capacidade de atacar plantas, eles são geralmente avirulentos. As reações de defesa das plantas podem tornar-se sistêmicas e proteger a planta de uma série de fitopatógenos, mesmo quando o *Trichoderma* spp. cresce somente nas raízes. Essa colonização da raiz também pode aumentar o crescimento das raízes e da planta toda, aumentando assim a produtividade. Fungos desse gênero ajudam as plantas, aumentando a absorção de nutrientes, indicando uma interação de simbiose ao invés de uma relação parasitária (HARMAN et al., 2004). Suas colônias desenvolvem-se rapidamente, inicialmente com superfície lisa, quase translúcida, tornando-se posteriormente flocosas ou compactas. A coloração da colônia é variável com tons de verde, amarelo, amarelo esverdeado e, por vezes, com tonalidade muito clara (GAMS e BISSET, 1998). A coloração é conferida pela pigmentação e pela quantidade de conídios produzidos, podendo ainda ser influenciada pelo pH e componentes do meio de cultivo. Seu micélio compõe-se de hifas hialinas bem ramificadas com parede lisa. Na maioria das espécies, ocorre a formação de clamidósporos, que são esporos assexuais, intercalados nas hifas e ocasionalmente terminais (MELO, 1991; HOWELL, 2003).

Todas essas características, como crescimento em meios de cultivo, produção de micélio aéreo esparso, com pústulas conidiogênicas brancas ou verdes, tipo de ramificação dos conidióforos e modo de disposição das fialides, são empregadas na classificação e identificação das espécies do gênero (BISSET, 1991).

Tem sido considerado um micoparasita ideal para o controle de fitopatógenos por apresentar características como ser inócuo ao ser humano, não causar

impactos negativos ao meio ambiente e ter estruturas de reprodução de fácil propagação (MELO, 1996).

Atua como antagonista, por meio de mecanismos de antibiose produzindo metabólitos voláteis ou não, de micoparasitismo e de competição por espaço, nutrientes e oxigênio (HJELJORD e TRONSMO, 2005). Segundo Martins-Corder e Melo (1998), a capacidade para produzir tais metabólitos e o seu efeito fungistático pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie. Podem competir com outros microorganismos, por exsudados de sementes que estimulam a germinação de propágulos de fungos fitopatogênicos de plantas.

Um alto grau de adaptabilidade é observado em isolados dentro do gênero *Trichoderma*, pois esses fungos são comuns em solos do mundo todo, podendo ser encontrado em diferentes solos e condições ambientais. Esta variação considerável, juntamente com sua capacidade ao cultivo em quaisquer substratos, faz com que os isolados de *Trichoderma* sejam bons antagonistas para uma variedade de aplicações no controle biológico. No entanto, a caracterização genética desse gênero ainda é incompleta, e as classificações morfológicas são insuficientes. O potencial dos agentes de controle biológico com suas características antagonicas pode ser identificado e analisado para utilização em aplicações específicas. Mesmo após uma seleção cuidadosa, os materiais isolados como melhores antagonistas, podem mostrar desempenho variável em ensaios de campo (HJELJORD e TRONSMO, 2005).

Mesmo com algumas dificuldades, o uso de *Trichoderma*, em geral apresenta resultados positivos em relação ao controle de patógenos radiculares como *Sclerotium rolfsii*, *Rosellinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia*. Esse biocontrolador pode afetar a viabilidade de escleródios e parasitar as hifas de *Rhizoctonia solani*, através da produção de uma gama de enzimas líticas e de antibióticos. No entanto, para o controle biológico de *Pythium* deve haver um cuidado especial, pois os propágulos desse patógeno respondem rapidamente aos exsudados das sementes em germinação e a penetração no tecido do hospedeiro pode ocorrer antes do antagonista se desenvolver na espermosfera. No caso do *Fusarium*, o ataque ocorre vagarosamente, sendo menos importante na espermosfera e mais agressivo no hipocótilo. Nesse contexto, o uso de agentes de biocontrole requer métodos de aplicação e doses adequadas para garantia da proteção em cada caso (MELO, 1996).

Estudos realizados comprovam a eficiência de isolados de *Trichoderma* como antagonistas de *Rhizoctonia solani* (HENIS et al., 1978; CHET e BAKER, 1980; ELAD et al., 1982; ASRAN-AMAL et al. 2005), como no caso de Hadar et al. (1979) que obteve um

isolado de *Trichoderma* que atacava diretamente o micélio do patógeno e quando aplicado no solo reduzia a ocorrência de tombamento de plantas de feijão, berinjela e tomate. Segundo Ridout et al. (1986), o *Trichoderma* spp. libera  $\beta$ -(1,3) glucanase e quitinase, e enzimas dos complexos celulolíticos (exo e endo-  $\beta$ -1-4-glucanase,  $\beta$ -glucosidase) e hemicelulolíticos (xilanase e  $\beta$ -xilosidase). *Trichoderma virens* produz um grupo de metabólitos, os quais apresentam atividade biológica que podem ser reguladores de crescimento de plantas, antimicrobianos, herbicidas, micotoxinas ou medicamentos (MACIAS et al., 2000). Peptaibois e peptídeos N-acilados são metabólitos, frequentemente, produzidos por *Trichoderma* spp., sendo essas substâncias caracterizadas por possuir elevada taxa de aminoácidos alfa-dialquilados, que são ativos contra bactérias gram-positivas (DANIEL e RODRIGUES FILHO, 2007). Wiest et al. (2002) desenvolveram um trabalho sobre identificação de peptaibois e relataram uma caracterização preliminar do peptaibol sintetase de *Trichoderma virens*.

Além disso, eles inibem ou degradam pectinases e outras enzimas que são essenciais para fungos fitopatogenos de plantas (HARMAN et al., 2004). O *Trichoderma* spp. pode ainda atuar como promotor de crescimento e florescimento de plantas, melhorando o rendimento de grãos (MELO, 1996). Também pode conferir velocidade e maior porcentagem da germinação de sementes, aumento do peso seco e da altura das plantas (OKLEIFELD e CHET, 1992; LYNCH et al., 1991; MELO, 1996).

Kerkeni et al. (2007) relataram a redução significativa do tombamento na cultura do pepino através do uso de biocontroladores como *Trichoderma* spp. Assim como Bettioli (2006), que relata a eficiência desse antagonista no controle de *Pythium* sp., bem como, Datnoff et al. (1995); Larkin e Fravel (1998); e Cotxarrera et al. (2002) que relataram a redução significativa dos danos causados por *Fusarium oxysporum*.

Segundo estudos de Ethur et al. (2001) de seleção de isolados de *Trichoderma* spp., esses apresentam grande potencial antagônico em relação à *S. sclerotiorum*, reduzindo o desenvolvimento de escleródios no solo e os danos causados pelo patógeno.

Trabalhos de Fernandes et al. (2006) constataram uma grande variabilidade de isolados de *Trichoderma* spp. permitindo uma seleção de indivíduos com características específicas para uma condição desejada de antagonismo. Foram constatadas diferenças significativas entre vários isolados de *Trichoderma* em relação à capacidade de inibir a germinação e parasitar escleródios de *S. sclerotiorum* em condições de temperatura amena.

Vários outros trabalhos relatam o potencial do *Trichoderma* contra *S. sclerotiorum*, como Menendez e Godeas (1998), Abdullah et al. (2008), Gorgen et al. (2009), Louzada et al. (2009), Paula Junior et al. (2009), Figueirêdo et al. (2010), Carvalho et al. (2011), dentre outros. No entanto, ainda existem muitos obstáculos em relação à padronização dos materiais utilizados, que seguem desde as etapas de seleção dos agentes de biocontrole até a formulação dos produtos para vendas em larga escala, e a vulnerabilidade do estabelecimento desses quando aplicados em condições de campo. O processo de seleção desses microrganismos de forma localizada para diferentes regiões e climas específicos, poderia facilitar o estabelecimento desses quando aplicados em locais ou regiões de maior favorabilidade em relação à temperatura, umidade, precipitação, condições químicas e físicas do solo. Assim como, desenvolver inóculos com maior resistência e proteção física (peletização). Dessa forma a utilização do controle biológico se tornaria uma tática de controle mais eficaz, principalmente quando em associação a outras medidas de controle.

### 3 ARTIGO A

#### INIBIÇÃO DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* POR FUNGICIDAS *IN VITRO* E O CONTROLE QUÍMICO DO MOFO BRANCO NA CULTURA DA SOJA

**Resumo:** O mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* está disseminado na maioria das regiões produtoras de soja do Brasil e provoca perdas de milhões de toneladas anuais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* de fungicidas na inibição de *S. sclerotiorum* e avaliar o controle químico do mofo branco na cultura da soja. Foram desenvolvidos quatro ensaios, sendo 1) inibição do crescimento micelial *in vitro* de *S. sclerotiorum* sob diferentes concentrações de fungicidas, 2) inibição da germinação carpogênica, 3) inibição da germinação de ascósporos e 4) controle do mofo branco na cultura da soja em condições de campo. Os tratamentos avaliados foram fluazinam, procimidona, iprodione, tiofanato metílico, carbendazim, cloreto de benzalcônio + fluazinam e um produto comercial à base de *Trichoderma harzianum*. Para inibição do crescimento micelial e inibição da germinação carpogênica, o fluazinam foi o único fungicida com inibição de 100% ( $p < 0,05$ ). Na inibição da germinação dos ascósporos, o procimidona e o cloreto de benzalcônio apresentaram inibição de 13,5 e 13,9%, respectivamente. Esses mesmos fungicidas foram os mais eficientes na redução da produção de ascósporos/apotécio representando 65,6% e 82,4%. O fluazinam, o procimidona e o cloreto de benzalcônio + fluazinam apresentaram maior eficiência ( $p < 0,05$ ) no controle do mofo branco em condições de campo, quando aplicados no início do florescimento e 15 dias após. Na safra 2009-10, esses três fungicidas reduziram a incidência do mofo branco, em 71, 73 e 73%, respectivamente, em comparação com a testemunha. Na safra 2010-11, reduziram a incidência em 77, 75 e 77% respectivamente.

**Palavras-chave:** *Glycine max.* Ascósporo. Escleródio. Apotécio. *Trichoderma* sp.

**Abstract:** *Sclerotinia sclerotiorum* white mold is widespread in most regions of soybean production in Brazil and causes production losses of millions tons annually. The present paper evaluates the effect of fungicides on *S. sclerotiorum* inhibition and the damage caused by the fungus in soybean. Tests were developed about, 1) different concentrations of fungicides on mycelial growth inhibition of *S. sclerotiorum*, 2) carpogenic germination inhibition, 3) ascospores germination inhibition and 4) white mold control in soybeans under field conditions. Treatment evaluated was fluazinam, procymidone, iprodione, thiophanate methyl, carbendazim, fluazinam + benzalkonium chloride and *Trichoderma* sp. biological treatment.. Fungicide fluazinam was the only one inhibit 100% ( $p < 0.05$ ) the *S. sclerotiorum* mycelial growth and carpogência germination inhibition. Procymidone and benzalkonium chloride inhibit ascospores germination by 13,5 and 13,9%, respectively. These same fungicides were most effective to reduce the production of ascospores per apothecia, reducing 65,6% and 82,4%. Fluazinam, procymidone and benzalkonium chloride + fluazinam were more efficient ( $p < 0,05$ ) on white mold control under field conditions, when treated twice during the flowering in interval of 15 days. These fungicides have reduced disease incidence by 71, 73 and 73% compared to control, in the 2009-10 crop. In 2010-11 crop, white mold incidence reduced by 77, 75 and 77%, respectively.

**Keywords:** *Glycine max.* Ascospore. Sclerotia. Apothecia. *Trichoderma* sp.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é considerado um dos patógenos mais destrutivos, podendo infectar mais de 408 espécies, pertencentes a 278 gêneros e 75 famílias de plantas (BOLAND e HALL, 1994). Sobrevive na forma de escleródios no solo e em restos culturais, podendo germinar miceliogenicamente ou carpogenicamente (BARDIN e HUANG, 2001). Para tanto, depende de condições de temperatura amena e alta umidade. Os apotécios possuem várias ascas e em condições ideais, liberam os ascósporos que infectam tecidos acima do solo, resultando em podridão das hastes, folhas, flores e vagens (DHINGRA et al., 2009).

A podridão branca da haste ou mofo branco causado pelo fungo *S. sclerotiorum* está se tornando cada dia mais importante na cultura da soja (DHINGRA et al., 2009), chamando a atenção de produtores e pesquisadores em países como Brasil (LOBO JUNIOR e ABREU, 2000) e Estados Unidos, com perdas de aproximadamente 1,6 milhões de toneladas somente no ano de 2004 (WRATHER e KOENNING, 2009).

Os métodos convencionais para controle da doença incluem o manejo cultural, uso de cultivares resistentes e controle químico (BARDIN e HUANG, 2001). Com relação ao controle químico, existem alguns relatos sobre resultados inconsistentes devido a algumas dificuldades nas aplicações (HUNTER et al., 1978; FERRAZ et al., 2003), mas segundo Tu (1989) vários fungicidas são considerados eficientes para o controle do patógeno, com recomendação de aplicação durante a fase de florescimento. Mueller et al. (2002), também, relataram o uso de fungicidas no manejo da doença como uma tática de controle, devido a flexibilização das épocas de aplicação, quando comparado aos métodos de controle cultural.

Métodos alternativos como o controle biológico também vêm sendo utilizados (HJELJORD e TRONSMO, 2005) por meio da aplicação de fungos como *Trichoderma* spp. que é caracterizado como um micoparasita de *S. sclerotiorum*, capaz de colonizar micélios e escleródios (HUANG e ERICKSON, 2008).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de fungicidas e de um produto biológico a base de *Trichoderma* sp. na inibição do crescimento micelial em diferentes concentrações, inibição da germinação carpogênica, inibição da germinação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* e controle do mofo branco na cultura da soja sob condições de campo.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Isolamento dos Fitopatógenos

O isolado de *S. sclerotiorum* foi obtido através da coleta de plantas doentes em campos de produção de soja, no município de Mauá da Serra – PR. Os escleródios desenvolvidos nas plantas doentes foram retirados, submetidos à assepsia (3 min em álcool 50% e 3 min em hipoclorito de sódio a 1%) e incubados por sete dias em meio de cultura BDA (batata - dextrose – ágar) acrescido de 33,0 mg de estreptomicina (FERRAZ et al., 2003) à temperatura de  $20 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Após a purificação do isolado, foram produzidos escleródios, os quais foram separados e armazenados à temperatura de  $7,0 \pm 3$  °C, para uso nos experimentos.

Nos isolados que apresentaram contaminação bacteriana foi utilizada a metodologia de purificação com canudo plástico. Os canudos foram cortados em 0,5 cm de comprimento e submetidos à assepsia. No centro de cada placa de Petri, um canudo foi introduzido até a metade da profundidade total do meio de cultura. Os escleródios, depois de submetidos à assepsia, foram alocados dentro do canudo em contato com o meio de cultura. Devido ao crescimento superficial no meio de cultura, o crescimento bacteriano se limita pela barreira física (canudo) e mantém-se na parte interna do canudo, enquanto o micélio do fungo *S. sclerotiorum* penetra e se desenvolve dentro do meio de cultura, sob o canudo, passando para parte externa sem apresentar contaminação bacteriana.

### 3.2.2 Inibição do Crescimento Micelial de *S.Sclerotiorum* por Fungicidas

Os produtos químicos foram homogeneizados em meio cultura (BDA) fundente, segundo a metodologia utilizada por Sarma et al. (2007). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos (sete produtos + testemunha) e cinco repetições (placas de Petri), separadamente para cada concentração (0,1; 1,0; 10; 100 e 1000  $\mu\text{L}$  de p.c.L<sup>-1</sup> em água destilada).

Os tratamentos foram representados por T1 (testemunha), T2 (fluazinam), T3 (procimidone), T4 (iprodione), T5 (tiofanato metílico), T6 (carbendazim), T7 (cloreto de benzalcônio + fluazinam) e T8 (produto comercial a base de *Trichoderma harzianum*). Após o preparo das placas com os tratamentos, um disco de colônia de *S. sclerotiorum* de 8,0 mm de diâmetro e sete dias de idade, foi repicado para o centro de cada placa. Posteriormente, as

placas foram incubadas por 72 horas em câmaras BOD à temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Nas placas testemunhas foi realizado o mesmo procedimento exceto a adição do produto.

Após o período de incubação realizou-se a avaliação da porcentagem de inibição do crescimento micelial da *S. sclerotiorum* foi realizado por meio da mensuração do diâmetro médio das colônias em comparação com a testemunha.

### 3.2.3 Inibição da Germinação Carpogênica de *S.sclerotiorum* por Fungicidas

O teste foi realizado em caixas tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), segundo a metodologia de Costa e Costa (2004) com modificações em relação ao número de escleródios/gerbox. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos (item 3.2.2) e quatro repetições (gerbox). Inicialmente o solo foi peneirado, umedecido e autoclavado por duas horas à temperatura de  $120^\circ\text{C}$  e pressão de 1 atm. Após a completa secagem do solo em estufa a temperatura de  $56^\circ\text{C}$  por 24 horas, as caixas foram preenchidas com 200 mL de solo e 60 mL de água destilada e esterilizada. Posteriormente, foram alocados 100 escleródios/gerbox sobre o solo e adicionado 40 mL de solo sobre os escleródios, formando uma camada de aproximadamente 2,0 mm de solo sobre esses.

As soluções com os produtos foram preparadas nas doses recomendadas, em frascos borrifadores de 60 mL. Os tratamentos e as doses utilizadas foram T1 (testemunha), T2 (fluazinam - 1,0 L de p.f./ha), T3 (procimidone – 1,0 Kg de p.f./ha), T4 (iprodisone – 1,0 L de p.f./ha), T5 (tiofanato metílico – 1,0 L de p.f./ha), T6 (carbendazin – 1,0 L de p.f./ha), T7 (cloreto de benzalcônio – 1,5 L de p.f./ha + fluazinam – 1,0 L de p.f./ha) e T8 (produto comercial a base de *Trichoderma harzianum* – 0,2 Kg de p.f./ha). Foram borrifados aproximadamente 240  $\mu\text{L}$  da solução em cada gerbox (200 L/ha) e incubados à temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 45 dias e fotoperíodo de 12 horas (luz fluorescente). Inicialmente avaliou-se o número de escleródios germinados, estipes, apotécios e posteriormente procedeu-se o cálculo da inibição comparando-se os tratamentos com a testemunha. As variáveis avaliadas foram inibição da germinação dos escleródios (IGE), inibição da germinação carpogênica (IGC), número de apotécios (NA) e número de estipes (NE). Na avaliação da inibição da germinação dos escleródios (IGE) foi considerado como “escleródio germinado” quando houve germinação de estipes e/ou apotécios, independente de ter ocorrido germinação de somente uma estipe ou mais, ou um apotécio ou mais.

Neste mesmo ensaio, procedeu-se também a avaliação do efeito da aplicação dos fungicidas no solo sobre a germinação dos ascósporos, posteriormente produzidos dentro dos apotécios. Dos gerbox, nos quais foram aplicados os fungicidas no solo, foram retirados cinco apotécios/repetição (gerbox), colocados em microtubos contendo 1,0 mL de água destilada e esterilizada e macerados com auxílio de uma pinça. A suspensão de ascósporos foi utilizada para determinar o número de ascósporos produzidos por apotécio, com auxílio de hemacitômetro. Também foram adicionados 0,1 mL da suspensão em placas de Petri contendo ágar-água e incubados em câmara BOD à temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , em escuro total por seis horas. Após o período de incubação avaliou-se o número de ascósporos germinados com auxílio de microscópio estereoscópico e calculou-se a porcentagem de inibição de acordo com a testemunha.

#### 3.2.4 Inibição da Germinação de Ascósporos de *S.sclerotiorum* por Fungicidas em Placas de Petri

Neste ensaio avaliou-se a eficiência dos fungicidas aplicados em contato direto com os ascósporos nas placas de Petri contendo ágar-água. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos (item 3.2.2) e cinco repetições (placas de Petri). A obtenção dos apotécios foi segundo a metodologia descrita no item 3.2.3, mas com a montagem de apenas cinco gerbox. Após o 45º dia as caixas foram abertas para identificar os apotécios maduros, por meio da liberação dos ascósporos. Entre os cinco gerboxs, foram selecionados 10 apotécios maduros, os quais foram cortados pelos estipes, colocados em cadinho de cerâmica com 10 mL de água destilada e esterilizada, e macerados (TOLÊDO-SOUZA e COSTA, 2003). Posteriormente foram adicionados 0,1 mL da suspensão de ascósporos nas placas de Petri contendo meio de cultra ágar-água e foram borrifadas aproximadamente 160  $\mu\text{L}$  (200L/ha) da solução dos fungicidas obtidos da mesma forma do item 3.2.3. As placas de Petri foram incubadas em câmara BOD à temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , em escuro total por seis horas para a determinação da germinação dos ascósporos com auxílio de microscópio estereoscópico e posterior cálculo da porcentagem de inibição de acordo com testemunha.

### 3.2.5 Controle Químico do Mofo Branco na Cultura da Soja

Os ensaios foram conduzidos em condições de campo no município de Mauá da Serra – PR, latitude 23°51'06", longitude 51°10'40" e altitude 970 m. A cultivar de soja semeada foi a BRS283, sob sistema de plantio direto, após aveia na safra 2009/10 e após trigo na safra 2010/11.

Inicialmente, na área experimental foram avaliados superficialmente vinte e cinco pontos com 1,0 m<sup>2</sup> cada, para contagem do número de escleródios/m<sup>2</sup> e para confirmação da viabilidade dos escleródios (inóculo inicial). Os escleródios encontrados foram submetidos à assepsia (3 min em álcool a 50% e 3 min em hipoclorito de sódio a 1%) e lavados três vezes com água destilada e esterilizada. Após secagem em câmara de fluxo laminar, foram colocados sobre meio de cultura Neon (PERES et al., 2002) e incubados a 20 ± 2 °C, em escuro total por sete dias. Os escleródios viáveis foram identificados pela formação do halo amarelado no meio de cultura Neon, resultante da reação do ácido oxálico, produzido pela *S. sclerotiorum*, com o azul de bromofenol, contido no meio de cultura.

A área experimental foi subdividida em parcelas de 4,0 x 6,0 m (24 m<sup>2</sup>), totalizando uma área de 768 m<sup>2</sup>. O delineamento experimental do ensaio foi em blocos casualizados com oito tratamentos (item 3.2.3) e quatro repetições. As aplicações foram realizadas com auxílio de um pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub>. A aplicação do produto biológico foi realizada nos estádios V3 e R1 e os fungicidas, aplicados no estádio R1 e 15 dias após (R3).

Para manutenção do ensaio, nos estádios R2 e R4 foram realizadas aplicações de azoxistrobina (200 g de i.a./L) + ciproconazol (80 g de i.a./L), para controle da ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.

Aos 95 DAS realizaram-se as avaliações de incidência (porcentagem de plantas com sintomas) e severidade do mofo branco, por meio da escala de notas de Grau et al. (1982) sendo: 0 = sem sintomas; 1 = lesão em ramos laterais; 2 = lesão na haste principal; 3 = lesão na haste principal resultando na morte da planta. As notas foram transformadas em valores angulares e posteriormente para o índice de intensidade de infecção ( $I' = \text{sen}^2(\omega)$ ) proposto por Amaral (1969). Foram avaliados quatro pontos/parcela e 40 plantas por ponto.

Aproximadamente aos 120 DAS foi realizado a colheita manual, colhendo-se 4,0 m de duas linhas centrais, totalizando 8,0 m lineares em cada parcela. Avaliaram-se o peso de grãos/parcela e umidade.

### 3.2.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi testada utilizando Hartley. A análise de variância foi realizada pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Para verificar a correlação dos dados foi calculado o Coeficiente de Correlação de Pearson (r).

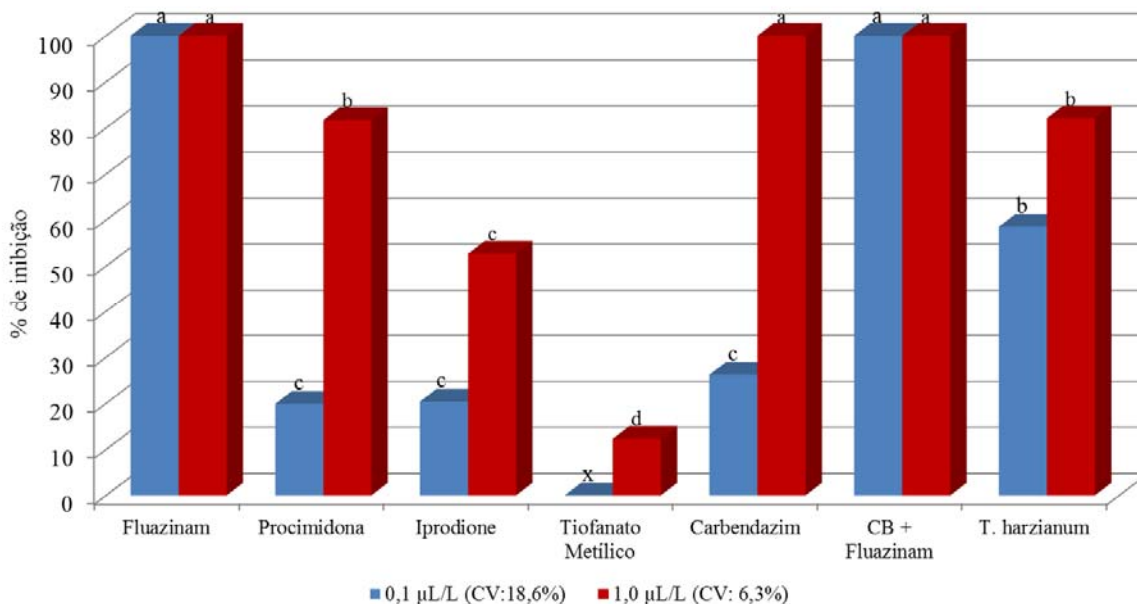
## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Inibição do Crescimento Micelial de *S.Sclerotiorum* por Fungicidas

A inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi crescente de acordo com o aumento da concentração dos produtos. Na concentração de 0,1µL/L (Figura 1) o tratamento com fluazinam e cloreto de benzalcônio + fluazinam apresentaram 100% de inibição em relação à testemunha e diferenciaram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos demais tratamentos. Seguido do *Trichoderma*, carbendazim, iprodione e procimidona com 58,5; 23,8; 20,4 e 19,9% de inibição, respectivamente. O tratamento com fungicida tiofanato metílico não apresentou inibição do crescimento micelial na concentração de 0,1µL/L. Na segunda concentração de 1,0 µL/L, o fluazinam, carbendazim e a mistura de fluazinam + cloreto de benzalcônio apresentaram 100% de inibição, diferindo-se dos demais ( $p < 0,05$ ) seguido do procimidona, iprodione, *Trichoderma* e tiofanato metílico com 81,7; 52,7; 20,7 e 12,3% de inibição, respectivamente.

Nas concentrações de 10, 100 e 1000 µL/L, todos os produtos testados apresentaram inibição de 100%, com exceção do *T. harzianum*, que apresentou 92,6% de inibição na concentração de 10 µL/L (dados não apresentados).

**Figura 1** – Porcentagem de inibição de crescimento micelial *in vitro* da *Sclerotinia sclerotiorum* em função da concentração dos produtos homogeneizados no meio de cultura BDA. As médias seguidas da mesma letra nas colunas de mesma cor não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. (CB) cloreto de benzalcônio, (CV) coeficiente de variação.



### 3.3.2 Inibição da Germinação Carpogênica de *S.Sclerotiorum* por Fungicidas

A avaliação da inibição da germinação dos escleródios (IGE) corresponde à porcentagem de escleródios que germinaram em apotécio ou estipe, independente da quantidade desses. Os fungicidas fluazinam, cloreto de benzalcônio + fluazinam, iprodione e carbendazim apresentaram as maiores porcentagens de inibição dos escleródios, com 63, 61, 46 e 44% de inibição, respectivamente (Tabela 1).

Na inibição da germinação carpogênica procedeu-se a contagem total dos apotécios, onde os fungicidas fluazinam (100% de inibição), cloreto de benzalcônio + fluazinam (82%) e iprodione (63%) apresentaram os melhores resultados e diferenciaram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao carbendazim, procimidona, tiofanato metílico e *T. harzianum* (Tabela 1).

**Tabela 1** –Porcentagem de inibição da germinação dos escleródios (IGE), inibição da geminação carpogênica (IGC), inibição da germinação de ascósporos (IGA) e número de ascósporos produzidos por apotécio (ASC/APO x 1000), após aplicação de fungicidas no solo em gerbox. Londrina-PR, 2011.

Tratamentos	IGE		IGC		IGA		ASC/APO <sup>3</sup>	
Testemunha	-	-	-	-	-	-	98,0	a
Fluazinam	63,9	a	100,0	a	-	-	0,0	-
Procimidona	22,2	b	34,0	b	13,5	a	33,6	b
Iprodione	46,5	a	63,1	a	1,1	c	23,4	b
Tiofanato metílico	0,7	c	18,5	b	0,4	c	32,8	b
Carbendazim	44,4	a	39,4	b	9,8	b	28,2	b
CB <sup>1</sup> + Fluazinam	61,8	a	82,8	a	13,9	a	17,1	b
<i>T. harzianum</i> <sup>2</sup>	0,0	-	6,9	b	0,6	c	58,0	a
CV (%)	31,8		38,9		5,6		5,8	

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. (1) cloreto de benzalcônio, (2) produto comercial formulado à base de *T. harzianum*, (3) dados transformados em log x.

As aplicações não influenciaram no desenvolvimento do número de estipes, os quais variaram de 3,3 a 16,5% de germinação e não observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos (dados não apresentados).

Nesse mesmo ensaio macerou-se os apotécios crescidos em cada tratamento e avaliou-se o número de ascósporos germinados. Calculou-se a porcentagem de inibição da germinação em comparação com a testemunha. Os fungicidas cloreto de benzalcônio + fluazinam e o procimidona foram os tratamentos mais eficiente com 13,9 e 13,5% de inibição da germinação diferenciando-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos demais. No restante dos tratamentos foi observada baixa porcentagem de inibição, variando de 9,8% (carbendazin) a 0,6% (*T. harzianum*). No tratamento com fungicida fluazinam não apresentou formação de ascósporos para avaliação da germinação, pois não houve desenvolvimento de apotécios no gerbox.

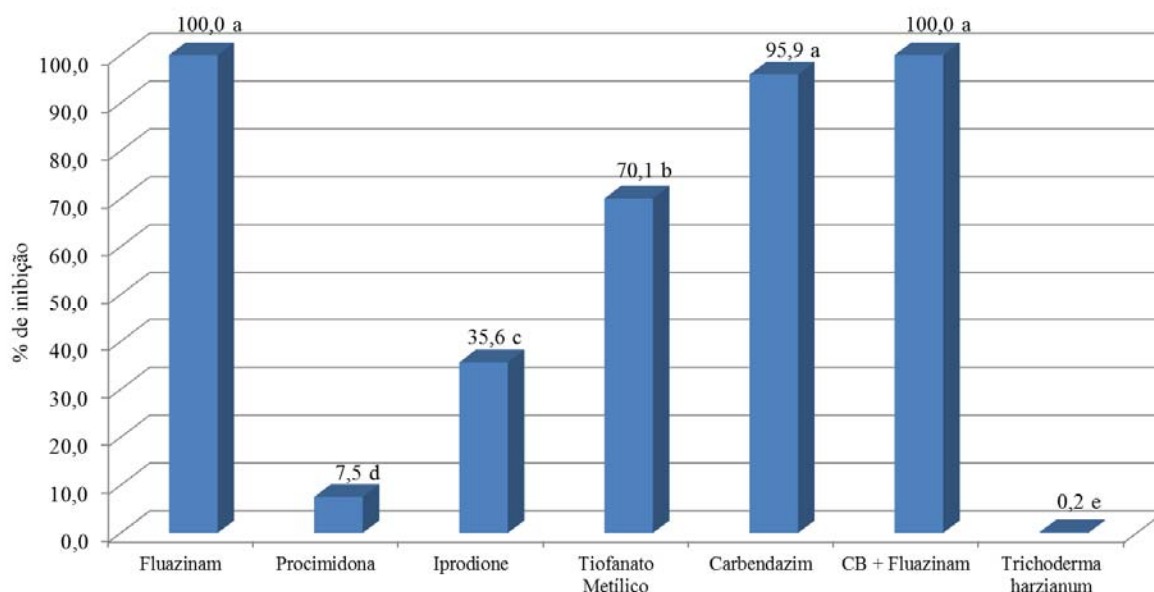
Na avaliação da redução do número de ascósporos produzidos por apotécio, os tratamentos com fungicida cloreto de benzalcônio + fluazinam e o procimidona produziram 17,1 e 33,6 mil ascósporos/apotécio, respectivamente, enquanto a testemunha produziu 98,0 mil ascósporos/ apotécio. Houve uma redução da produção de ascósporos de 82,4% e 65,6% nesses tratamentos. No entanto, todos fungicidas não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, mas diferiram da testemunha (98,0 mil ascósporos/apotécio) e do tratamento com *T. harzianum* (58,0 mil ascósporos/apotécio).

### 3.3.3 Inibição da Germinação de Ascósporos de *S.Sclerotiorum* por Fungicidas em Placas de Petri

Os tratamentos com fluazinam e a mistura de cloreto de benzalcônio + fluazinam apresentaram 100% de inibição da geminação dos ascósporos e foram estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) ao tratamento com carbendazim com 95,9% de inibição (Figura 2).

Os produtos tiofanato metílico (70,1%), iprodione (35,7%), procimidona (7,5%) e *T. harzianum* (0,2%) apresentaram diferentes porcentagens de inibição e diferiram ( $p < 0,05$ ) significativamente entre si. No tratamento com produto comercial a base de *T. harzianum* foi observada a menor porcentagem de inibição de ascósporos, o qual não diferiu da testemunha.

**Figura 2** – Porcentagem da inibição da germinação *in vitro* dos ascósporos de *S. sclerotiorum* após tratamento com fungicidas no meio de cultura ágar-água, (CB) cloreto de benzalcônio.



### 3.3.4 Controle Químico do Mofo Branco na Cultura da Soja

Na safra 2009-10 observou-se concentração de inóculo inicial na área experimental de aproximadamente 20 escleródios/m<sup>2</sup> com 95% de viabilidade dos mesmos. Nessa safra, todos os tratamentos foram eficientes no controle do mofo branco (Tabela 2) quando comparados ( $p < 0,05$ ) à testemunha (79,5% de incidência). Os tratamentos mais

eficientes foram procimidona (21,3%), mistura de fluazinam + cloreto de benzalcônio (21,3%) e fluazinam (22,5% de incidência), os quais apresentaram redução da incidência de 73,1; 73,1% e 71,6, respectivamente, em comparação à testemunha. Para severidade do mofo branco, a testemunha apresentou 73,9%, diferindo-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos tratamentos procimidona (7,8%), fluazinam + cloreto de benzalcônio (11,5%), fluazinam (13,6% de severidade), e com redução da severidade de 89,4; 84,4% e 81,5, respectivamente. Os melhores resultados de produtividade foram observados nos mesmos tratamentos fluazinam + cloreto de benzalcônio, fluazinam, procimidona, além do carbendazim, os quais foram superiores ( $p < 0,05$ ) aos demais. Observou-se correlação negativa forte entre incidência x produtividade e severidade x produtividade, apresentando coeficiente de correlação  $r = -0,60$  e  $r = -0,76$ , respectivamente (dados não apresentados).

Na safra 2010-11 observou-se concentração de inóculo inicial de 11 escleródios/m<sup>2</sup> com 83% de viabilidade dos mesmos e os resultados foram semelhantes à safra 2009-10 em relação à incidência e severidade, onde os tratamentos com fluazinam, procimidona e mistura de fluazinam + cloreto de benzalcônio se sobressaíram aos demais. No entanto, não foram observadas diferenças significativas de produtividade entre os tratamentos. Provavelmente, porque a incidência e severidade da doença não atingiram níveis que pudessem influenciar a produtividade causando perdas. Assim como no ensaio 1, observou-se correlação negativa forte entre incidência x produtividade e severidade x produtividade, apresentando coeficiente de correlação  $r = -0,69$  e  $r = -0,69$ , respectivamente (dados não apresentados).

**Tabela 2** – Incidência e severidade do mofo branco tratadas com diferentes fungicidas e produtividade da soja safras 2009-10 e 2010-11. Mauá da Serra, PR.

Tratamentos	Incidência		Severidade		Produtividade	
	%		$I^{,3}$		Kg/ha	
Testemunha	79,4	a	73,9	a	2594,0	b
Fluazinam	22,5	d	13,6	c	3131,0	a
Procimidona	21,3	d	7,8	c	3046,0	a
Iprodione	40,0	c	43,5	b	2346,0	b
Tiofanato metílico	60,0	b	63,0	a	2751,0	b
Carbendazim	55,0	b	34,0	b	3087,0	a
CB <sup>1</sup> + Fluazinam	21,3	d	11,5	c	3250,0	a
<i>T. harzianum</i> <sup>2</sup>	61,9	b	61,3	a	2548,0	b
CV (%)	24,0		29,2		15,4	

Tratamentos	Incidência		Severidade		Produtividade	
	%		$I^{,3}$		Kg/ha	
Testemunha	36,3	a	57,5	a	3042,8	a
Fluazinam	8,1	c	3,1	d	3860,8	a
Procimidona	8,8	c	1,5	d	4132,8	a
Iprodione	18,8	b	8,0	c	3783,0	a
Tiofanato metílico	29,4	a	36,3	b	3517,6	a
Carbendazim	25,0	b	9,7	c	3677,1	a
CB <sup>1</sup> + Fluazinam	8,1	c	1,2	d	3562,7	a
<i>T. harzianum</i> <sup>2</sup>	33,8	a	56,4	a	3650,6	a
CV (%)	13,7		26,7		16,4	

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. (1) cloreto de benzalcônio, (2) produto comercial formulado à base de *T. harzianum*, (3) índice de intensidade de infecção em porcentagem.

O produto comercial à base de *T. harzianum* não apresentou resultados eficientes de redução dos danos causados pelo mofo branco na cultura da soja em condições de campo, pois não diferenciou-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da testemunha na maioria dos parâmetros avaliados, com exceção da incidência da doença na safra 2009-10.

### 3.4 DISCUSSÃO

Oliveira et al. (1999) desenvolveram um trabalho de inibição micelial de *S. sclerotiorum*, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA homogeneizado com fluazinam, procimidona, carbendazim, iprodione, nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{L/L}$ . Na avaliação, após 72 h de incubação, relataram inibição de 100% com todos fungicidas e

concentrações, corroborando os resultados deste trabalho com exceção do tratamento com procimidona e iprodione na concentração de 1,0 µL/L que apresentaram 81,7 e 52,7% de inibição, respectivamente.

Mueller et al (2002), por meio da mesma metodologia, testaram os fungicidas benomil, vinclozolin tebuconazol e tiofanato metílico. No tratamento com fungicida tiofanato metílico observou-se crescimento do patógeno até mesmo nas maiores concentrações, diferindo dos resultados apresentados neste trabalho, que nas concentrações acima de 10 µL/L inibiu 100% o crescimento micelial da *S. sclerotiorum*.

Trabalho similar foi desenvolvido por Paula Junior et al (2009) com os fungicidas fluazinam e procimidona nas concentrações de 0,1 a 1000 µL/L. O fluazinam apresentou inibição de 73 a 100% nas concentrações de 0,1 a 1000 µL/L. O procimidona, em concentrações mais baixas (0,1 a 10 µL/L), apresentou inibição nula ou quase nula e somente a 100 e 1000µL/L apresentou inibição de aproximadamente 85 e 100 %, respectivamente. Nos resultados observados neste trabalho, o fluazinam inibiu 100% em todas as concentrações, de 0,1 a 1000 µL/L, o procimidona a 0,1 µL/L inibiu 19,9%, a 1,0 µL/L inibiu 81,7% e nas concentrações de 10 a 1000 µL/L, inibiu 100%.

Costa e Costa (2004) testaram a eficiência de vários fungicidas com aplicação sobre o solo para inibir a germinação miceliogênica e carpogênica dos escleródios. Entre os fungicidas avaliados, o fluazinam apresentou inibição de 100% dos apotécios, o procimidona 95%, o iprodione 85% e o tiofanato metílico, inibição menor que 85%. No entanto, na inibição de estipes, o fluazinam apresentou as menores porcentagens, não diferindo estatisticamente da testemunha. O tiofanato metílico e o procimidona foram intermediários, e o iprodione apresentou a melhor porcentagem de inibição de estipes. Os autores relatam sobre eficiência do fluazinam em inibir totalmente a formação dos apotécios, mas não na formação de estipes, corroborando os resultados obtidos neste trabalho, onde ocorreu a inibição da germinação carpogênica em 100%, mas não ocorreu inibição da germinação de estipes. No entanto, a eficiência do controle da doença se baseia na inibição do apotécio, pois mesmo que ocorra formação de estipes, se não ocorrer o desenvolvimento de apotécios não haverá liberação dos ascósporos e, conseqüentemente, não ocorrerá a doença.

Pesquisas sobre a ação de fungicidas agindo na germinação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* são escassos. Nesse trabalho, além de observar o efeito positivo da aplicação dos tratamentos químicos para inibição da germinação dos escleródios em apotécios, observou-se também o efeito sobre o número de ascósporos produzidos e germinados. A diminuição observada do número de ascósporos produzidos e a diminuição da

germinação dos mesmos podem resultar na redução de plantas infectadas em condições de campo quando aplicado fungicida eficiente, devido a menor quantidade de inóculo a ser liberado e com menor viabilidade.

Muitos trabalhos *in vivo* foram desenvolvidos avaliando-se a efetividade dos fungicidas fluazinam e procimidona para o controle de doenças causadas por *S. sclerotiorum* em culturas como feijoeiro (PAULA JUNIOR et al., 2009; VIEIRA et al., 2001; VIEIRA et al., 2003), amendoim (RYLEY et al., 2000; SMITH et al., 2008), alface (MATHERON e PORCHAS, 2004) e batata (JOHNSON e ATALLAH, 2006).

O fluazinam influencia os processos de infecção, como germinação de esporos, formação de apressórios, penetração e crescimento das hifas e a esporulação dos patógenos nas plantas, apresentando uma atividade de desacoplamento sobre a fosforilação oxidativa mitocondrial. O procimidona atua na paralização do crescimento das hifas, induzindo ao engrossamento das mesmas e provocando o rompimento da parede celular com ejeção do conteúdo citoplasmático, inibe a síntese de proteínas, de ácidos nucléicos, de lipídeos e a germinação dos esporos (PICININI e GOULART, 2002). Segundo Reis et al. (2010) os fungicidas do grupo dicarboximida (procimidona) também apresentam outro provável mecanismos de ação que é a peroxidação dos lipídeos interagindo com a enzima flavina-redutase do citocromo-c. O transporte de elétrons de NADPH para o citocromo-c é bloqueado pela ação do fungicida e como resultado, o NADPH, assim como os fosfolipídeos essenciais que circundam o centro da enzima flavina são oxidados, provavelmente, por um produto intermediário da enzima flavina ou radicais livres.

No presente trabalho observaram-se algumas diferenças significativas na eficiência dos fungicidas fluazinam e procimidona nos testes *in vitro* de inibição do crescimento micelial, germinação carpogênica e germinação dos ascósporos nas placas de Petri (aplicação direta do fungicida sobre os ascósporos). O controle desses fungicidas foi estatisticamente igual ( $p < 0,05$ ) somente nos ensaios de campo, nos dois anos de cultivo. Picinini e Goulart (2002) relataram a ação de ambos os fungicidas para inibição da germinação de esporos, mas os resultados mais eficientes para inibição da germinação de ascósporos apresentados neste trabalho foram observados com fluazinam. Essa diferença observada nos testes *in vitro* e em campo, provavelmente, seja devido ao modo de ação dos produtos. O fluazinam é fungicida protetor residual, não penetrante (contato), age no patógeno sobre a superfície da planta inibindo o desenvolvimento de suas estruturas e impedindo a penetração. O procimidona é um fungicida sistêmico de ação penetrante no interior da planta. Normalmente, a ação ocorre pós-penetração do fungo ou pós-sintoma/sinal.

Mueller et al. (2004) relataram recomendações convencionais do uso de fungicidas para o controle do mofo branco, com aplicações no início do florescimento e possível reaplicação após a floração, reduzindo a incidência da doença e aumentando o rendimento. Entretanto, existe uma grande dificuldade do controle de doenças causadas por fungos formadores de escleródios, por meio de aplicações de fungicidas específicos a ponto de inativar os escleródios presentes no campo (COSTA e COSTA, 2004). Segundo Hunter et al. (1978) e Ferraz et al. (2003), resultados inconsistentes sobre o controle do mofo branco por fungicidas são provavelmente gerados em função da cobertura inadequada do produto no dossel das plantas, flores, caules e folhas, onde normalmente ocorre a deposição dos ascósporos. De acordo com Tu (1989) o fungicida deve ser aplicado com volume de calda suficiente para fornecer cobertura completa das flores, caules e folhas, especialmente nas estruturas mais próximas à superfície do solo.

Em relação à utilização de agentes de biocontrole, estudos de Ethur et al. (2001) relatam o grande potencial antagônico de *Trichoderma* spp. em relação à *S. sclerotiorum*. Fernandes et al. (2006) constataram uma grande variabilidade de isolados de *Trichoderma* spp. o que permitiu uma seleção de indivíduos com características específicas para uma condição desejada de antagonismo. Diferenças significativas entre vários isolados de *Trichoderma* foram observadas em relação à capacidade de inibir a germinação e parasitar escleródios de *S. sclerotiorum* em condições de temperatura amena.

Vários fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas podem sintetizar diversos metabólitos capazes de promover a fungistase. Esses metabólitos podem ser de natureza volátil ou não volátil, sendo que os primeiros têm a vantagem de maior facilidade de difusão no ambiente solo, por meio de poros ou filmes d'água (LOBO JUNIOR e ABREU, 2000). No presente trabalho, resultados eficientes foram observados com o uso do *Trichoderma* sp. como por exemplo nos testes *in vitro* de inibição micelial, germinação carpogênica e germinação de ascósporos. No entanto, observou-se que o controle da *S. sclerotiorum* em condições de campo com aplicação do produto comercial a base de *T. harzianum* não apresentou eficiência. A utilização do controle biológico se torna vulnerável em condições de campo devido a grande sensibilidade do estabelecimento dos agentes biocontroladores.

### 3.5 CONCLUSÃO

O fungicida fluazinam apresentou maior eficiência na inibição *in vitro* do crescimento micelial, inibição da germinação carpogênica dos escleródios, inibição da germinação dos ascósporos e no controle do mofo branco em campo na cultura da soja. O fungicida procimidona apresentou potencial igual ao fluazinam no controle do mofo branco em condições de campo, nos dois anos de cultivo.

### 3.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMARAL, E. Novo índice de intensidade de infecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.4, p.1-2, 1969.

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

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, p.93–108, 1994.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri – Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, p.18-24, 2001.

COSTA J.R.; COSTA J.L. da S. Efeito da aplicação de fungicidas no solo sobre a germinação carpogênica e miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, p.133-138, 2004.

DHINGRA, O.D.; MENDONÇA, H.L.; MACEDO, D.M. Doenças e seu controle. In: Sedyama, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Mecenias, Londrina, pp.133-156. 2009.

ETHUR, L.Z.; CEMBRANEL, C.Z; SILVA, A.C.F. da. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.885-887, 2001.

FERNANDES, A.O.; MORANDI, M. A. B.; DOS SANTOS, E. R.; DE ALMEIDA, E.G. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea* para o controle biológico do mofo-branco do feijoeiro (*Sclerotinia sclerotiorum*) em cultivo de outono-inverno. **Anais da Jornada Acadêmica da Embrapa Meio Ambiente**, p.39. 2006.

FERRAZ, L.C.L.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; NASSER, L.C.B. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.17-26, 2003.

GRAU, C. R.; RADKE, V. L.; GILLESPIE, F. L. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.66, p.506–508, 1982.

- HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G.E.; Kubicek, C.P. ***Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications***, Taylor & Francis, Londres, pp.115-133, 2005.
- HUANG, H.; ERICKSON, R.S. Factors affecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal antagonists. ***Journal of Phytopathology***, v.156, p.628–634, 2008.
- HUNTER, J.E.; ABAWI, G.S.; CROSIER, D.C. Effects of timing, coverage, and spray oil on control of white mold of snap bean with benomyl. ***Plant Disease Reporter***, v.62, p.633-637, 1978.
- JOHNSON, D. A.; ATALLAH, Z. K. Timing fungicide applications for managing *Sclerotinia* stem rot of potato. ***Plant Disease***, v.90, p.755-758, 2006.
- LOBO JUNIOR, M.; ABREU M. S. de. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e ph's. ***Ciência e Agrotecnologia***, v.24, p.521-526, 2000.
- MATHERON, M. E.; PORCHAS, M. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. ***Plant Disease***, v.88, p.665-668, 2004.
- MUELLER, D.S.; DORRANCE, A.E.; DERKSEN, R.C.; OZKAN, E.; KURLE, J.E.; GRAU, C.R.; GASKA, J. M.; HARTMAN, G.L.; BRADLEY, C.A.; PEDERSEN, W.L. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. ***Plant Disease***, v.86, p.26-31, 2002.
- MUELLER, D.S.; BRADLEY, C.A.; GRAU, C.R.; GASKA, J.M.; KURLE, J.E.; PEDERSEN, W.L. Application of thiophanate-methyl at different host growth stages for management of *Sclerotinia* stem rot in soybean. ***Crop Protection***, v.23, p.983–988, 2004
- OLIVEIRA, S.H.F.; KIMATI, H.; TOFOLI, J.G. Ação diferencial de fungicidas no ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum* do feijoeiro. ***Summa Phytopathologica***, v.25, p.256-261, 1999.
- PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; ROCHA, P.R.R.; BERNARDES, A.; COSTA, E.L., CARNEIRO, J.E.S.; VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. White mold intensity on common bean in response to plant density, irrigation frequency, grass mulching, *Trichoderma* spp., and fungicide. ***Summa Phytopathologica***, v.35, p.44-48, 2009.
- PERES, A.P.; NASSER, L.C.; MACHADO, J.C. Utilização de meio seletivo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja. ***Fitopatologia Brasileira***, v.27, p.123-127, 2002.
- PICININI, E.C.; GOULART, A.C.P. Novos fungicidas para tratamento de sementes, ***Revisão Anual de Patologia de Plantas***, v.10, p.33-66, 2002.
- REIS, E.M.; REIS, A.C.; CARMONA, M.A. ***Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas***. Ed. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, pp. 226. 2010.

RYLEY, M.J.; KYEL, N.A.; TATNELL, J.R. Evaluation of fungicides for the management of *Sclerotinia* blight of peanut. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.51, p.917-924, 2000.

SARMA, B.K.; AMEER BASHA, S.; SINGH, D.P.; SINGH, U.P. Use of non-conventional chemicals as an alternative approach to protect chickpea (*Cicer arietinum*) from *Sclerotinia* stem rot. **Crop Protection**, v.26, p.1042-1048, 2007.

SMITH, D.L.; GARRISON, M.C.; HOLLOWELL, J.E.; ISLEIB, T.G.; SHEW, B.B. Evaluation of application timing and efficacy of the fungicides fluazinam and boscalid for control of *Sclerotinia* blight of peanut. **Crop Protection**, v.27, p.823-833, 2008.

TOLÊDO-SOUZA, E. D. de; COSTA, J. L. da S. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.33, p.57-63, 2003.

TU, J.C. Management of white mold of white bean in Ontario. **Plant Disease**, v.73, p.281-285, 1989.

VIEIRA, R.F.; PAULA JÚNIOR, T.J. de; PERES, A.P.; MACHADO, J. da C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.770-773, 2001.

VIEIRA, R.F.; PINTO, C.M.F.; PAULA JÚNIOR, T.J. de. Chemigation with benomyl and fluazinam and their fungicidal effects in soil for white mold control on dry beans. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.245-250, 2003.

WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R. **Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007**. Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2009/yields/>. Acesso em: 22 dez. 2011.

## 4 ARTIGO B

### **Antagonismo *in vitro* do *Trichoderma* sp. frente a *Sclerotinia sclerotiorum* e controle biológico do mofo branco na cultura da soja**

**Resumo:** Avaliaram-se o antagonismo de dois isolados de *Trichoderma* sp. em confrontação direta com nove isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* de diferentes regiões brasileiras; a eficiência dos extratos de *Trichoderma* sp. para inibição do crescimento micelial dos isolados de *S. sclerotiorum*, da germinação carpogênica e germinação de ascósporos; e a eficiência do *Trichoderma* sp. para controle do mofo branco na cultura da soja em condições de campo. No teste de antagonismo, o isolado TH25 apresentou as maiores porcentagens de inibição dentre os nove isolados de *S. sclerotiorum*. Os extratos de *Trichoderma* sp. TH42-L, TH25-M e TH42-M foram os mais eficientes na inibição do crescimento micelial da *S. sclerotiorum* com uma variação de inibição de 80 a 100% de acordo com o isolado de *S. sclerotiorum*. Para inibição da germinação carpogênica, os extratos TH25-L e TH42-L apresentaram redução de 42 e 38% ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Os isolados selvagens de *Trichoderma* sp. reduziram a incidência e severidade do mofo branco em condições de campo. No ensaio 1 (aplicação inverno/verão) os produtos biológicos apresentaram redução de 37% ( $p < 0,05$ ) da incidência da doença e no ensaio 2 (aplicação verão) os produtos biológicos apresentaram redução de 39% ( $p < 0,05$ ) da incidência. No teste de antagonismo de confrontação direta não observou-se variabilidade dos isolados de *S. sclerotiorum*. No entanto, no teste de extratos observaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** *Glycine max.* Ascósporo. Escleródio. Apotécio. Fluazinam.

**Abstract:** Antagonism of two *Trichoderma* strains were evaluated in direct confrontation on nine *S. sclerotiorum* strains from different Brazilian regions; as efficiency of *Trichoderma* sp. extracts for mycelial growth inhibition of different *S. sclerotiorum* strains; carpogenic germination and ascospores germination inhibition; and the efficiency of *Trichoderma* sp. on white mold control in soybeans. *Trichoderma* strain TH25 had the highest percentages of inhibition among the nine *S. sclerotiorum* strains. *Trichoderma* sp. extracts TH42-L, TH25-M and TH42-M were the most effective on mycelial growth inhibiting of *S. sclerotiorum*, which was ranging by 80 to 100%, according to the *S. sclerotiorum* strain. TH25-L and TH42-L extracts decreased by 42 and 38% the germination carpogenic inhibition ( $p < 0.05$ ), respectively. Commercial products and wild strains of *Trichoderma* reduced white mold incidence and severity on soybeans under field conditions. Biologic products reduced the disease incidence on the test 1 (treatment winter/summer) by 37% reduction ( $p < 0,05$ ) and test 2 (treatment summer) by 39% ( $p < 0,05$ ) reduction. Antagonism test of direct confrontation did not observed the variability of *S. sclerotiorum* strains. However, extracts test showed significant differences ( $p < 0,05$ ).

**Keywords:** *Glycine max.* Ascospore. Sclerotia. Apothecia. Fluazinam.

## 4.1 INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um patógeno necrotrófico homotático (BOLTON et al., 2006) identificado como agente causador de doenças em diversas culturas, tais como, soja, feijão, girassol, canola, amendoim e várias outras culturas das famílias das Liliáceas e Brássicas (BOLAND e HALL, 1994). Nas safras de 1996 a 2007, as perdas na produção de soja nos Estados Unidos atingiram aproximadamente 4,9 milhões de toneladas devido à ocorrência do mofo branco (WRATHER e KOENNING, 2009). Os elevados danos causados, a falta de cultivares resistentes, e as dificuldades do controle da doença tem sido um estímulo para as pesquisas sobre esse patógeno (BOLTON et al., 2006).

A utilização excessiva de agroquímicos está sendo repensada e a sociedade se conscientiza cada vez mais com relação à preservação do meio ambiente, buscando novas alternativas para a proteção das plantas contra patógenos (CAVALCANTI et al., 2005) com o objetivo de sistematizar uma integração dos métodos de controle de doenças.

O controle biológico é um dos métodos alternativos que vêm sendo utilizados para o controle de doenças de plantas (HJELJORD e TRONSMO, 2005). É utilizado como uma estratégia de manejo de doenças em áreas agrícolas, principalmente, por manter o potencial de inóculo em níveis baixos, conseqüentemente, reduzindo a incidência ou a severidade de doenças produzidas por *S. sclerotiorum* (ABDULLAH et al., 2008).

Como mecanismos de ação dos agentes biocontroladores, estão envolvidos processos como antibiose, competição, parasitismo, indução de mecanismos de resistência e premunização. O mecanismo de antibiose é definido como a interação entre organismos os quais secretam metabólitos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento de indivíduos, normalmente, de outra espécie (BEDENDO et al, 2011).

Segundo Hjeljord e Tronsmo (2005) o fungo *Trichoderma* spp. atua como antagonista por meio de antibiose produzindo metabólitos voláteis ou não, por micoparasitismo, competição por espaço, nutrientes e oxigênio. A capacidade para produzir tais metabólitos e o seu efeito fungistático pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie (MARTINS-CORDER e MELO, 1998). Esse fungo é caracterizado como um micoparásita de *S. sclerotiorum*, capaz de colonizar micélios e escleródios (HUANG e ERICKSON, 2008).

Vários trabalhos como os de Görgen et al. (2009), Louzada et al. (2009) e Figueirêdo et al. (2010) têm sido desenvolvidos para avaliação do potencial do *Trichoderma* spp. na inibição da *S. sclerotiorum*.

Görge et al. (2009) avaliaram os efeitos da aplicação de *Trichoderma harzianum* na redução da densidade de inóculo de *S. sclerotiorum* e na incidência do mofo-branco, verificando-se a eficiência do agente biocontrolador. Assim como, Louzada et al. (2009) que avaliaram uma coleção de 230 isolados monospóricos de *Trichoderma* sp. com potencial para controle da *S. sclerotiorum* e foi observado potencial antagônico de 10% dos isolados. Avaliações ao microscópio eletrônico de varredura mostraram que nem todos promoveram o hiperparasitismo dos patógenos, sugerindo a existência de outros mecanismos de antagonismo, como antibiose ou competição. Figueirêdo et al. (2010) também testaram oito isolados de *Trichoderma* sp. e todos apresentaram potencial antagônico à *S. sclerotiorum*.

Segundo Faria et al. (2002), a seleção dos isolados é uma importante etapa nos programas de controle biológico devido a especificidade existente no antagonismo entre os fungos ou microrganismos em geral. Padrões de variabilidade em relação ao crescimento e morfologia das colônias foram observados em isolados de *Trichoderma* sp. por Peres e Melo (1995). Ethur et al. (2001) desenvolveram um trabalho de seleção e observaram uma variação de 76 pontos percentuais na inibição entre os isolados de *Trichoderma* sp. visando o controle *in vitro* de *S. sclerotiorum*.

Trabalhos desenvolvidos por Atallah et al. (2004); Arbaoui et al. (2008) e Gomes et al. (2011) também relataram grande variação ou diversidade genética entre os isolados de *S. sclerotiorum*, comparados por análises de PCR.

Devido ao grande potencial do *Trichoderma* spp. e seus metabólitos, em antagonizar o fungo *S. sclerotiorum*; a variabilidade existente dentro dessas populações de antagonistas e fitopatógenos; e os relatos sobre os danos causados pela doença na cultura da soja; objetivou-se: a) avaliar o antagonismo de dois isolados de *Trichoderma* sp. pelo teste de confrontação direta frente a isolados de *S. sclerotiorum* de diferentes regiões brasileiras; b) avaliar extratos de *Trichoderma* sp. para inibição do crescimento micelial de diferentes isolados de *S. sclerotiorum* e sua variabilidade; c) avaliar extratos de *Trichoderma* sp. na inibição da germinação carpogênica e germinação de ascósporos de *S. sclerotiorum*; e d) avaliar o efeito da aplicação de *Trichoderma* sp. no controle do mofo branco na cultura da soja em condições de campo.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Antagonismo de *Trichoderma* sp. Frente a Isolados de *S. Sclerotiorum* de Diferentes Regiões Brasileiras

Dois isolados de *Trichoderma* sp., TH25 e TH42, foram obtidos através de amostras de solos proveniente de diferentes áreas de cultivos de milho. O isolamento do fungo *Trichoderma* sp. foi realizado por meio do método de diluição seriada. Foram pesados 10 g de solo, colocadas em Erlenmeyer com 90 mL de água destilada esterilizada, e homogeneizado em agitador a 200 rpm, por 15 minutos. Dessa suspensão, 1,0 mL foi transferido para tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água destilada esterilizada, e assim sucessivamente, fazendo-se diluições em série até  $10^{-3}$ . Das suspensões, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e plaqueadas em meio de Martin modificado (HOMECHIN, 1987), sendo espalhadas uniformemente na placa de Petri com alça de Drigalsky e incubados em câmaras BOD, à temperatura de 25°C por sete dias. Após a formação das colônias, aquelas identificadas como *Trichoderma* sp. através das características morfológicas e estruturais, foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar).

Os isolados do fungo *S. sclerotiorum* foram obtidos através da coleta de plantas doentes em campos de produção de soja nos Estados do Rio Grande do Sul (município de Vacaria e Não-Me-Toque), Paraná (município de Castro, Guarapuava, Mauá da Serra, Pinhão e Manuel Ribas) e Goiás (município de Montividiu e São Manuel do Passa Quatro). Os escleródios crescidos nas plantas doentes foram retirados, submetidos à assepsia (três minutos em álcool 50% e três minutos em hipoclorito de sódio 1%) e incubados por sete dias em placas de Petri contendo meio de cultura BDA com 33,0 mg de estreptomicina (FERRAZ et al., 2003) à temperatura de  $20 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Nos isolados que apresentaram contaminação bacteriana foi utilizada a metodologia de purificação com canudo plástico. Os canudos foram cortados em 0,5 cm de comprimento e submetidos à assepsia. No centro de cada placa de Petri, um canudo foi introduzido até a metade da profundidade total do meio de cultura. Os escleródios, depois de submetidos à assepsia, foram alocados dentro do canudo em contato com o meio de cultura. Devido ao crescimento superficial no meio de cultura, o crescimento bacteriano se limita pela barreira física (canudo) e mantém-se na parte interna ao canudo, enquanto o micélio do fungo *S. sclerotiorum* penetra no meio e se desenvolve sob o canudo, passando para parte externa sem contaminação bacteriana.

Após a purificação, cada isolado foi repicado novamente e os escleródios produzidos foram separados, lavados e secos em fluxo laminar para armazenamento à temperatura de  $7,0 \pm 3$  °C, para uso nos experimentos.

O delineamento experimental foi em esquema fatorial 9x2 (nove isolados de *S. sclerotiorum* X dois isolados de *Trichoderma* sp.) com 18 tratamentos e 5 repetições.

O teste foi realizado por meio da técnica da cultura pareada, de acordo com a metodologia descrita por Bell et al. (1982), em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Inicialmente, foram cultivados os isolados de *Trichoderma* sp. ( $25 \pm 2$  °C e incubação de sete dias) e os isolados de *S. sclerotiorum* ( $20 \pm 2$  °C e incubação de sete dias), em meio de cultura BDA e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, foram retirados discos de 0,8 mm da região da borda da colônia de *Trichoderma* sp. e *S. sclerotiorum*, os quais foram repicados a seis centímetros de distância, na borda de novas placas contendo meio BDA e incubadas em câmaras BOD à temperatura de  $20 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Nas placas testemunhas foram repicados somente discos do patógeno nas bordas e seis centímetros do lado oposto do disco, foi feita uma marcação com tinta.

A avaliação procedeu-se aproximadamente 21 dias após a montagem do bioensaio, por meio da escala de notas proposta por Bell et al. (1982), onde a nota 1 representa o crescimento do antagonista ocupando 100% da placa, nota 2 o antagonista ocupa 75% da placa, nota 3 ocupa 50% da placa, nota 4 ocupa 25% da placa e nota 5 representa o patógeno ocupando 100% da placa.

#### 4.2.2 Influência dos Extratos de *Trichoderma* sp. Para Inibição do Crescimento Micelial de Diferentes Isolados de *S. sclerotiorum*

Os isolados de *Trichoderma* sp. e *S. sclerotiorum* foram obtidos segundo a metodologia descrita no item 4.2.1.

Na produção dos extratos, inicialmente, os isolados de *Trichoderma* sp. foram reativados e cultivados por sete dias em meio BDA à temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Utilizaram-se frascos Erlenmeyers de 1000 mL contendo 500 mL de meio de cultura líquido BD (batata-dextrose) e outros, contendo 500 mL de arroz com casca. Realizou-se a esterilização em autoclave durante 20 minutos, a 120 °C e 1,0 atm. Com o auxílio de um furador de 0,8 cm de diâmetro foram cortados discos de colônia do *Trichoderma* sp. e adicionados cinco discos por Erlenmeyers. Os Erlenmeyers foram fechados e protegidos com filme plástico e incubados a temperatura de  $25 \pm 2$  °C por aproximadamente 21 dias.

Paralelamente, dois frascos controle foram preparados e incubados com os respectivos meios de cultivo sem adição do fungo.

Após 21 dias de incubação procedeu-se a extração, iniciando-se pela adição de NaCl no meio líquido e no meio sólido (arroz com casca), adicionados metanol até a superfície do meio. O *Trichoderma* cultivado em meio líquido (BD) foi filtrado sob vácuo, obtendo-se o micélio e o líquido. Ao micélio adicionou-se metanol (500 mL) e após 12 horas, foi triturado e filtrado sob vácuo, obtendo-se os extratos metanólicos do micélio (TH25-M e TH42-M). O líquido foi particionado com acetato de etila obtendo-se os extratos do meio líquido (TH25-L e TH42-L). O *Trichoderma* cultivado em meio sólido (arroz com casca) foi deixado em repouso com metanol, posteriormente triturado e filtrado sob vácuo obtendo o extrato metanólico do arroz (TH25-S e TH42-S). O mesmo procedimento foi realizado com os controles do meio sólido e do líquido (BRANCO-S e BRANCO-L).

Os extratos foram solubilizados em 0,5 mL de DMSO e 0,5 mL de água destilada na proporção de 4,0 mg de extrato/mL de DMSO + água. Dessas soluções padronizadas foram tomados volumes de 1,0 mL e utilizados no teste.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 9x2x3 (nove isolados de *S. sclerotiorum* X dois isolados de *Trichoderma* X três extratos: meio líquido, micélio e sólido), com 54 tratamentos e 5 repetições (placas de Petri).

Frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura BDA, foram autoclavados durante 20 min, a 120 °C e 1,0 atm. Posteriormente, os extratos foram homogeneizados no meio de cultura fundente, segundo a metodologia utilizada por Quiroga et al. (2001).

Após o preparo das placas com os extratos, um disco de colônia de *S. sclerotiorum* de 8,0 mm de diâmetro e sete dias de idade, foi repicado para o centro de cada placa. Posteriormente, as placas foram incubadas por aproximadamente 72 horas em câmaras BOD à temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

Nas placas testemunhas foi realizado o mesmo procedimento exceto a adição do extrato, mas foram adicionados BDA + 0,5 mL de DMSO + 0,5 mL de água destilada e esterilizada. Nas placas representadas como controle positivo foram adicionados meio de cultura BDA + 0,1 µL do fungicida comercial Frownicide (500 g de i.a. fluazinam/L de p.f.).

Avaliou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por meio da mensuração do diâmetro médio das colônias, comparando-se as placas com adição dos extratos com a testemunha (DMSO + água destilada e esterilizada).

#### 4.2.3 Influência dos Extratos de *Trichoderma* sp. na Inibição da Geminação Carpogênica e Germinação de Ascósporos de *S. sclerotiorum*

A produção dos extratos foi realizada segundo a metodologia descrita no item 4.2.2 e os escleródios de *S. sclerotiorum* foram obtidos de campos de produção de soja do município de Mauá da Serra-PR.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e quatro repetições. Cada repetição foi representado por um gerbox. O teste foi realizado em caixas tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), segundo a metodologia de Costa e Costa (2004) com modificações em relação ao número de escleródios/gerbox.

Inicialmente o solo foi peneirado, umedecido e autoclavado durante duas horas à temperatura de 120 °C e pressão de 1,0 atm. Após a completa secagem do solo em estufa a 56 °C por 48 horas, as caixas foram preenchidas com 200 mL de solo e 60 mL de água destilada e esterilizada. Posteriormente, foram alocados 100 escleródios/gerbox sobre o solo e adicionados 40 mL de solo sobre os escleródios, formando uma camada de aproximadamente 2,0 mm de solo sobre os mesmos.

Borrifou-se aproximadamente 240 µL da solução dos extratos (4,0 mg de extrato/mL de solução) em cada gerbox e foram incubados à temperatura de  $20 \pm 2$  °C, por 45 dias e fotoperíodo de 12 horas (luz fluorescente). As variáveis avaliadas foram a inibição da germinação carpogênica dos escleródios (IGC), número de apotécios (NA) e número de estipes (NE).

Posteriormente foi avaliada a germinação dos ascósporos produzidos. Cinco apotécios/repetição foram retirados e colocados em microtubos contendo 1,0 mL de água destilada esterilizada, onde foram macerados com auxílio de uma pinça. Adicionou-se 0,1 mL dessa suspensão em placas de Petri contendo ágar-água, espalhadas com auxílio de alça de Drigalski e incubados em câmara BOD à temperatura de  $20 \pm 2$  °C, em escuro total por seis horas. Após esse período avaliou-se o número de ascósporos germinados com auxílio de microscópio estereoscópico e calculou-se a porcentagem de inibição comparado à testemunha. A partir dessa suspensão de ascósporos, também foi avaliado o número de ascósporos produzidos por apotécio, com auxílio de hemacitômetro.

#### 4.2.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) dos Extratos de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42, Cultivados em Meio Líquido BD e Arroz

Os extratos dos isolados de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42 a partir de cultivo líquido e sólido foram solubilizados em metanol grau HPLC e codificados: M - micélio crescido no meio BD, L - parte líquida do meio BD, e o S - meio sólido (arroz com casca). As amostras, após a solubilização em metanol ficaram em repouso por 15 min, e em seguida foram filtradas em filtro em PTFE / PHOBIC, polipropileno com diâmetro de poro de 0,5 mm.

Os extratos foram analisados utilizando-se um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência SHIMADZU, modelo CC – 6AD, conectado no detector UV-Vis, SHIMADZU, modelo SPD – 10<sup>a</sup> (Departamento Química, UEL-PR), tendo como condições cromatográficas: eluente metanol e água Milli-Q com proporções 7:3, respectivamente, com 0,1 % de ácido acético, vazão de 0,7 mL.min<sup>-1</sup>. A coluna utilizada foi ODS C<sub>18</sub> 4,6 x 250 mm (analítica) com temperatura de 22 °C. O volume de injeção foi de 20 µL e a eluição foi monitorada no comprimento de onda de 220 e 254 nm durante 60 minutos.

#### 4.2.5 Controle Biológico do Mofo Branco na Cultura da Soja

Os ensaios foram conduzidos em condições de campo na safra 2010/11, no município de Mauá da Serra – PR, latitude 23°51'06", longitude 51°10'40" e altitude 970 m. A cultivar de soja semeada foi a BRS283, sob sistema de plantio direto após trigo.

Inicialmente na área experimental foram avaliados superficialmente vinte e cinco pontos com 1,0 m<sup>2</sup> cada para contagem do número de escleródios/m<sup>2</sup> e para confirmação da viabilidade dos escleródios (inóculo inicial). Os escleródios encontrados foram submetidos à assepsia (três min. em álcool a 50% e três min. em hipoclorito de sódio a 1%) e lavados três vezes com água destilada esterilizada. Após secagem em câmara de fluxo laminar, foram colocados sobre meio de cultura Neon (PERES et al., 2002) e incubados a 20 ± 2 °C, em escuro total por sete dias. Os escleródios viáveis foram identificados pela formação do halo amarelado no meio de cultura Neon, resultante da reação do ácido oxálico, produzido pela *S. sclerotiorum*, com o azul de bromofenol, contido no meio.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com seis tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos e as doses utilizadas foram T1 (testemunha 0,0 p.f./ha), T2 (fluazinam – 1,0 L de p.f./ha), T3 (biológico comercial 1 - 0,2 Kg de p.f./ha),

T4 (biológico comercial 2 – 1,0 L de p.f./ha), T5 (biológico selvagem - TH25 –  $10^6$  conídios/ml), T6 (biológico selvagem 2 - TH42 –  $10^6$  conídios/ml). Desenvolveram-se dois ensaios com o delineamento citado: Ensaio 1 – aplicações dos tratamentos no início do inverno durante a cultura do trigo e aplicações no início do verão durante a cultura da soja, e Ensaio 2: aplicações dos tratamentos somente no início do verão durante a cultura da soja. A área experimental foi subdividida em parcelas com 4,0 x 6,0 m (24 m<sup>2</sup>), totalizando uma área de 576 m<sup>2</sup> para cada ensaio. As aplicações foram realizadas com auxílio de pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub>. No caso dos tratamentos com agentes biocontroladores, a aplicação procedeu-se no estágio V3 e R1, e no caso do tratamento químico com fluazinam, a aplicação foi realizada no estágio R1 e 15 dias após (R3).

Para manutenção do ensaio, nos estádios R2 e R4 foram realizadas aplicações de azoxistrobina (200 g de i.a./L) + ciproconazol (80 g de i.a./L), para controle da ferrugem asiática, causada por *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.

Aos 95 DAS realizaram-se as avaliações de incidência (porcentagem de plantas com sintomas) e severidade do mofo branco, por meio da escala de notas de Grau et al. (1982) sendo: 0 = sem sintomas; 1 = lesão em ramos laterais; 2 = lesão na haste principal; 3 = lesão na haste principal resultando na morte da planta. As notas foram transformadas em valores angulares e posteriormente para o índice de intensidade de infecção ( $I' = \text{sen}^2(\omega)$ ) proposto por Amaral (1969). Avaliaram-se quatro pontos/parcela e 40 plantas por ponto.

Aproximadamente aos 120 DAS foi realizado a colheita manual, colhendo-se 4,0 m de duas linhas centrais, totalizando 8,0 m lineares em cada parcela e avaliaram-se o peso de grãos/parcela e umidade.

#### 4.2.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi testada utilizando-se Hartley. A análise estatística foi realizada quando houve variância entre as médias e foi aplicado o teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Para verificar a correlação dos dados foi calculado o Coeficiente de Correlação de Pearson (r).

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Antagonismo de *Trichoderma* sp. Frente a isolados de *S. sclerotiorum* de Diferentes Regiões Brasileiras

No teste de antagonismo, em geral, o isolado TH25 apresentou as maiores porcentagens de crescimento (Tabela 3), embora alguns tratamentos não tenham diferenciado estatisticamente do isolado TH42.

Na comparação de médias entre os isolados de *S. sclerotiorum* confrontadas com o *Trichoderma* sp. TH42, apenas o isolado de *S. sclerotiorum* obtido do município de Guarapuava-PR diferenciou-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das demais, apresentando 95% de crescimento. No teste de confrontação com o isolado de *Trichoderma* sp. TH25, não observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o crescimento dos nove isolados de *S. sclerotiorum*, com porcentagens de crescimento variando de 80 a 100%.

**Tabela 3** –Crescimento micelial de *Trichoderma* sp. (%) confrontadas com *S. sclerotiorum* isolados de diferentes regiões brasileiras, avaliadas pela escala de notas de Bell et al. (1982) e transformadas em porcentagem. Londrina-PR, 2011.

<i>S. sclerotiorum</i>	TH25	TH42
Mauá da Serra-PR	100,0 A a	75,0 B b
Guarapuava-PR	100,0 A a	95,0 A a
Não-Me-Toque-RS	80,0 A a	65,0 B a
Manuel Ribas-PR	100,0 A a	70,0 B b
Pinhão-PR	95,0 A a	75,0 B b
São Miguel do Passa Quatro-GO	90,0 A a	60,0 B b
Castro-PR	90,0 A a	90,0 B a
Vacaria-RS	80,0 A a	70,0 B a
Montividiu-GO	100,0 A a	55,0 B b
CV (%)	15,9	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

#### 4.3.2 Influência dos Extratos de *Trichoderma* sp. na Inibição do Crescimento Micelial de Diferentes Isolados de *S. sclerotiorum*

De acordo com a análise de variância apresentada (Tabela 4), observou-se interação significativa a 5% de probabilidade de erro pelo teste F, para todas as fontes de variação. Houve interação tripla entre os fatores avaliados: isolados de *S. sclerotiorum* X isolados de *Trichoderma* sp. X extratos.

**Tabela 4** –Análise de variância para delineamento fatorial 9x2x3 da inibição micelial de nove isolados de *S. sclerotiorum* tratadas com extratos de dois isolados de *Trichoderma* sp., cultivadas em meio líquido BD (extrato do líquido e do micélio) e arroz com casca (extrato do arroz). Londrina-PR, 2011.

Fontes de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
<i>S. sclerotiorum</i> (S)	8	19969	2496	16**
<i>Trichoderma</i> sp. (T)	1	34907	34907	231**
Extratos (E)	2	51891	25945	172**
S x T	8	7987	998	6**
S x E	16	11938	746	4**
T x E	2	25519	12759	84**
S x E x T	16	6834	427	2**
Tratamento	53	159046	3001	19**
Resíduo	212	31904	150	
Total	269	191531		
C.V. (%)	16			

(\*) significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F

(\*\*) significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F

Na tabela 5 são apresentados os dados de inibição micelial dos nove isolados de *S. sclerotiorum* frente aos extratos de micélio, líquido e arroz, separadamente para TH25 e TH42.

Na comparação de médias entre os extratos TH25-S (arroz), TH25-L (líquido) e TH25-M (micélio) (comparação na linha na Tabela 5), os que apresentaram maior porcentagem de inibição foram os extratos de micélio, que diferenciaram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos extratos do arroz e do líquido. Entre os extratos TH42-S, TH42-L e TH42-M, a maior porcentagem de inibição, foi observada nos extratos do líquido e do micélio. Em geral, os extratos que apresentaram a maior porcentagem de inibição micelial da *S. sclerotiorum* foram os extratos TH25-M, TH42-L e TH42- M.

Na comparação das médias entre os isolados de *S. sclerotiorum* (comparação na coluna na Tabela 5), quando tratadas com o extrato do *Trichoderma* sp. TH25-S as maiores porcentagens de inibição foram observadas pelos isolados de *S. sclerotiorum* dos municípios de Não-Me-Toque-RS, Manuel Ribas-PR, Pinhão-PR, São Miguel do Passa Quatro-GO, Castro-PR e Vacaria-RS, variando de 41,5 a 61,3% de inibição. Quando utilizado o extrato TH25-L, a porcentagem de inibição foi maior para os isolados de *S. sclerotiorum* dos municípios de Não-Me-Toque-RS (89% de inibição), Mauá da Serra-PR (81,5%) e Guarapuava (75%). Para o restante dos extratos TH25-M (micélio), TH42-S (arroz), TH42-L (líquido) e TH42-M (micélio), os isolados de *S. sclerotiorum* não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre si, na inibição de crescimento micelial.

**Tabela 5** – Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (%) após tratamento com extratos de dois isolados de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42, cultivados em arroz com casca (extrato do arroz) e meio líquido BD (extrato do líquido e do micélio). Londrina-PR, 2011.

<i>S. sclerotiorum</i>	<i>Trichoderma</i> TH25		
	Arroz	Líquido	Micélio
Mauá da Serra-PR	24,4 B c	81,5 A b	100,0 A a
Guarapuava-PR	32,4 B c	75,0 A b	100,0 A a
Não-Me-Toque-RS	61,3 A b	89,4 A a	100,0 A a
Manuel Ribas-PR	57,7 A b	54,0 B b	100,0 A a
Pinhão-PR	43,2 A c	65,9 B b	91,0 A a
São Miguel do Passa Quatro-GO	49,4 A b	38,1 C b	87,0 A a
Castro-PR	41,5 A c	64,9 B b	82,3 A a
Vacaria-RS	41,5 A c	68,4 B b	84,8 A a
Montividiu-GO	11,2 C b	20,7 C b	90,2 A a

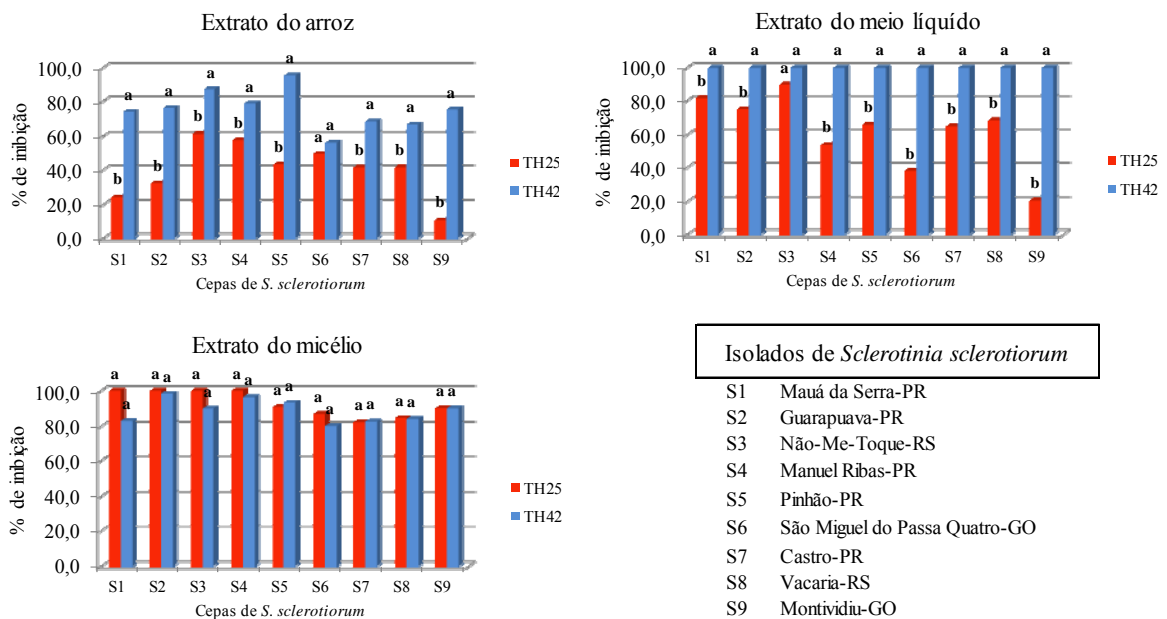
<i>S. sclerotiorum</i>	<i>Trichoderma</i> TH42		
	Arroz	Líquido	Micélio
Mauá da Serra-PR	74,0 B b	100,0 A a	83,1 A a
Guarapuava-PR	76,2 B b	100,0 A a	98,4 A a
Não-Me-Toque-RS	87,0 B a	100,0 A a	90,0 A a
Manuel Ribas-PR	78,8 B b	100,0 A a	96,3 A a
Pinhão-PR	95,6 A a	100,0 A a	93,4 A a
São Miguel do Passa Quatro-GO	56,3 B c	100,0 A a	80,1 A b
Castro-PR	68,5 B b	100,0 A b	82,7 A a
Vacaria-RS	66,7 B b	100,0 A a	84,1 A a
Montividiu-GO	75,4 B b	100,0 A a	90,1 A a

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, 5% de probabilidade de erro.

Nas placas controle positivo (BDA + Frownicide) observou-se 100% de inibição micelial da *S. sclerotiorum*. Apenas em alguns tratamentos com extratos foram observados essa porcentagem de inibição, como por exemplo, os tratados com extratos TH42 – L (líquido). No entanto não se diferenciaram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos tratamentos com os extratos TH42-M (micélio). Nos extratos BRANCO-S e BRANCO-M, os quais foram produzidos a partir do arroz e do meio líquido BD sem o cultivo do *Trichoderma* sp., observaram-se crescimentos normais dos isolados de *S. sclerotiorum*, igual a testemunha sem adição dos extratos.

Na análise da comparação de médias entre os extratos TH25-S e TH42-S (extrato do arroz) (Figura 3) observou-se diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em todas os isolados de *S. sclerotiorum*, com exceção do isolado do município de São Miguel do Passa Quatro-GO, os quais TH25-S (49,4%) e TH42-S (56,3%) não diferiram estatisticamente. Entre os extratos TH25-L e TH42-L (extrato líquido) também se diferenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) para todas os isolados de *S. sclerotiorum*, com exceção do isolado do município de Não-Me-Toque-RS.

**Figura 3** – Porcentagem da inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* após tratamento com extratos de dois isolados de *Trichoderma* sp., cultivados em arroz com casca (TH25-S e TH42-S do extrato do arroz) e meio líquido BD (TH25-L e TH42-L do extrato do líquido e TH25-M e TH42-M do extrato do micélio). Comparação de médias entre TH25 e TH42. Médias seguidas de mesma letra entre cada isolado de *S. sclerotiorum*, não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, 5% de probabilidade de erro.



Entre os extratos TH25-M e TH42-M (extrato do micélio) não houve diferença significativa entre os mesmos para todos os isolados de *S. sclerotiorum*. Em geral, nessa comparação, a maioria dos extratos do TH42 apresentaram as maiores inibições miceliais de *S. sclerotiorum*.

#### 4.3.3 Influência dos extratos de *Trichoderma* sp. na inibição da germinação carpogênica e germinação de ascósporos de *S. sclerotiorum*

Em relação à inibição da germinação carpogênica (Tabela 6) todos os extratos apresentaram eficiência diferindo-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da testemunha, no entanto TH25-L e TH42-L foram os melhores tratamentos com 42,7 e 38,3% de inibição, respectivamente. Os extratos TH25-S, TH42-S, TH25-M e TH42-M apresentaram eficiência intermediária, estatisticamente iguais entre si ( $p < 0,05$ ).

Nos resultados da contagem dos ascósporos, em todos os tratamentos foram observados redução do número de ascósporos produzidos por apotécio em comparação à testemunha (156,4 mil ascósporos/apotécio), com exceção do extrato TH42-S (144,5 mil ascósporos/apotécio) o qual não diferiu estatisticamente da testemunha ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos que apresentaram menor número de ascósporos foram TH25-S e TH25-M.

**Tabela 6** – Porcentagem de inibição da germinação carpogênica e número de ascósporos/apotécio (ASC/APO x 1000), após tratamento com extratos dos isolados de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42. Londrina-PR, 2011.

Tratamentos	IGC	ASC/APO
Testemunha	- -	156,4 a
TH25-S	11,8 b	65,5 d
TH42-S	5,9 b	144,5 a
TH25-M	10,3 b	51,5 d
TH42-M	23,5 b	98,0 c
TH25-L	42,7 a	106,5 c
TH42-L	38,3 a	122,5 b
C.V.	57,8	12,2

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, 5% de probabilidade de erro. (S) extrato do arroz, (M) extrato do micélio e (L) extrato do meio líquido.

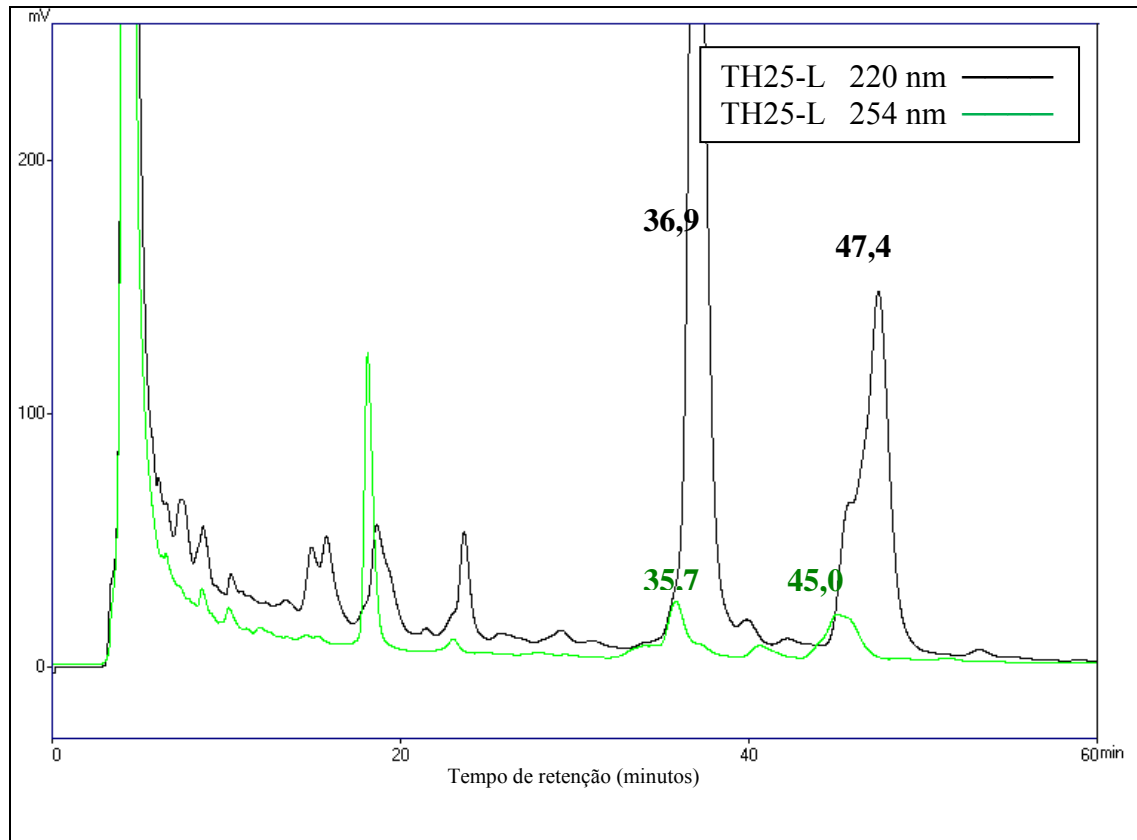
Observou-se uma correlação positiva fraca entre os dados de inibição da germinação carpogênica e o número de ascósporos por apotécio, apresentando coeficiente de correlação  $r = 0,26$ .

Nos resultados de número de estipes não se observou diferenças significativa entre os tratamentos. Assim como os dados da germinação dos ascósporos, os quais não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a testemunha e os tratamentos com adição dos extratos (dados não apresentados).

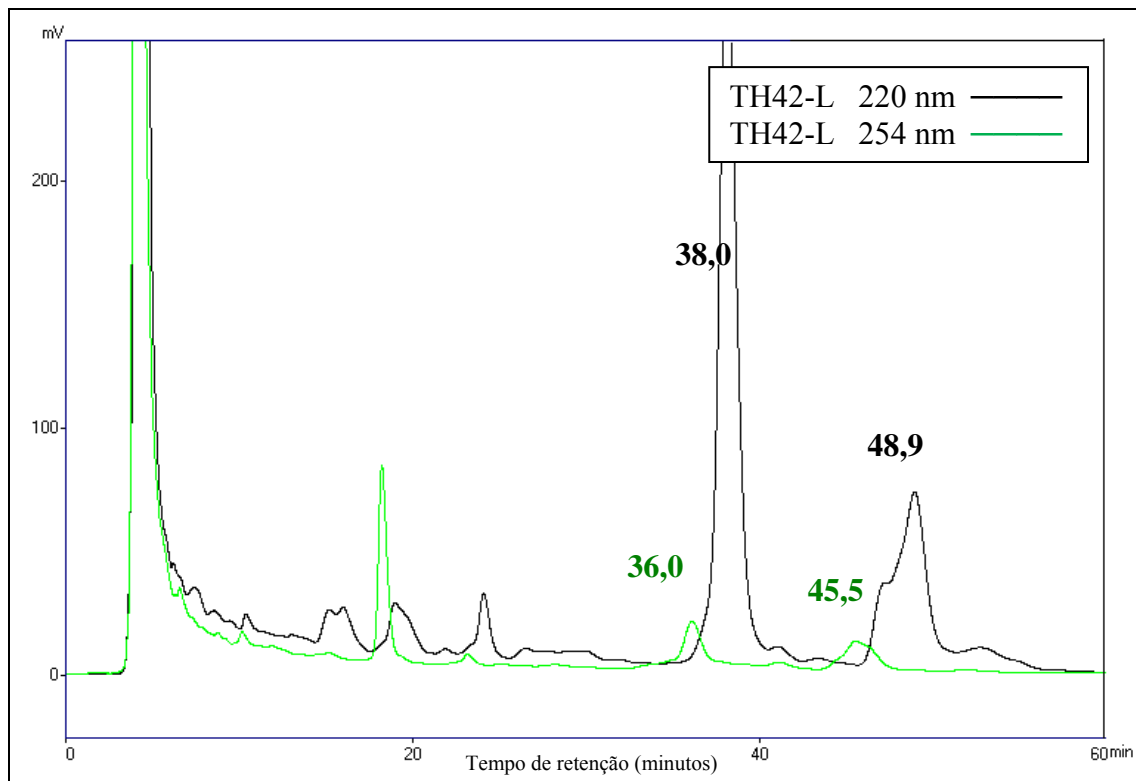
#### 4.3.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) dos Extratos de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42, Cultivados em meio Líquido BD e Arroz

Os cromatogramas das Figuras 4 a 9 representam a comparação das absorções dos metabólitos dos extratos dos isolados TH25 e TH42 do *Trichoderma* sp. em comprimentos de onda 220 nm e 254 nm. Os compostos presentes nos extratos têm maior absorção no comprimento de 220 nm. Esses apresentam dois picos semelhantes nos cromatogramas mencionados, com a faixa de tempo de retenção 36-38 e 47-49 min no comprimento de onda 220 nm, e dois picos na faixa 35-36 e 44-45 min em 254 nm. Esses resultados demonstram que os isolados TH25 e TH42 do *Trichoderma* sp. biossintetizam substâncias que são excretadas para o meio BDL que foi extraído com acetato de etila, formando TH25-L e TH42-L (Figura 4 e 5). Esses picos são os mesmos contidos nos extratos do micélio TH25-M e TH42-M extraídos com metanol (Figura 5 e 6). Possivelmente, os picos são das substâncias responsáveis pela atividade antifúngica responsável por inibir o crescimento do micélio da *Sclerotinia sclerotiorum* e inibir a germinação carpogênica.

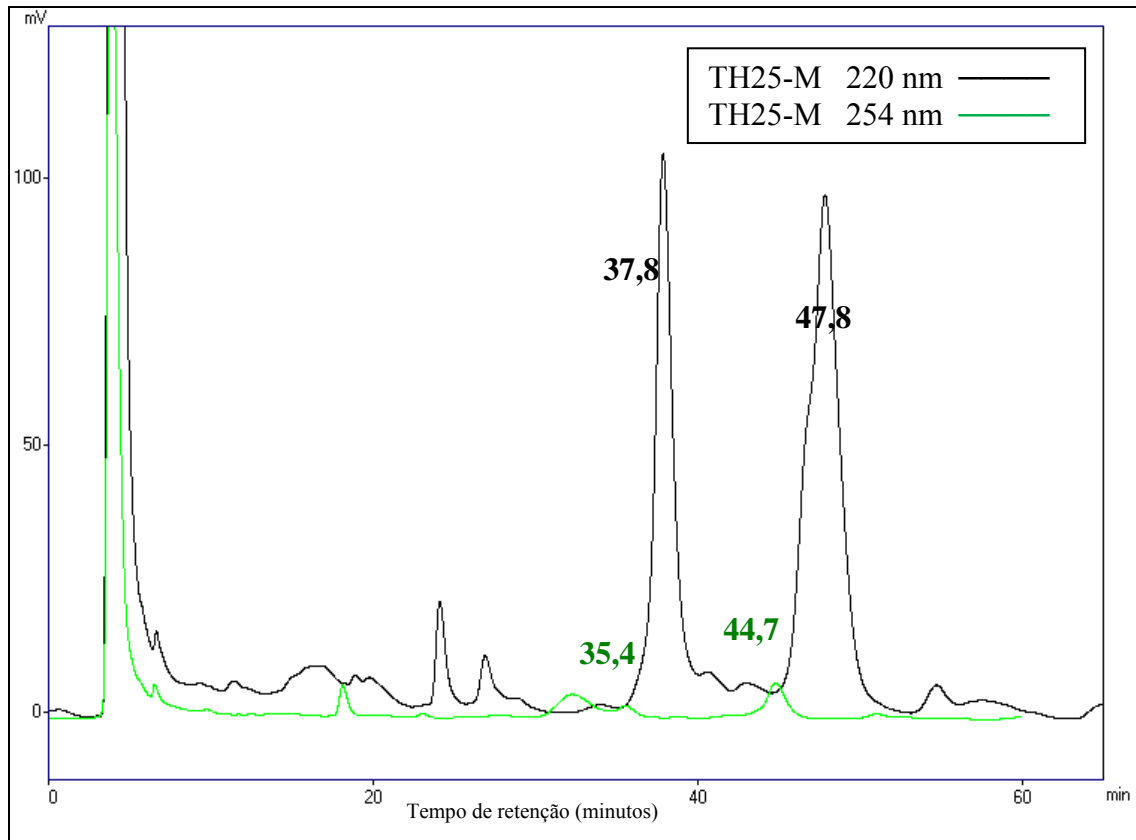
**Figura 4** – Cromatograma obtido dos extratos do líquido TH25-L a 220nm e TH25-L a 254nm.



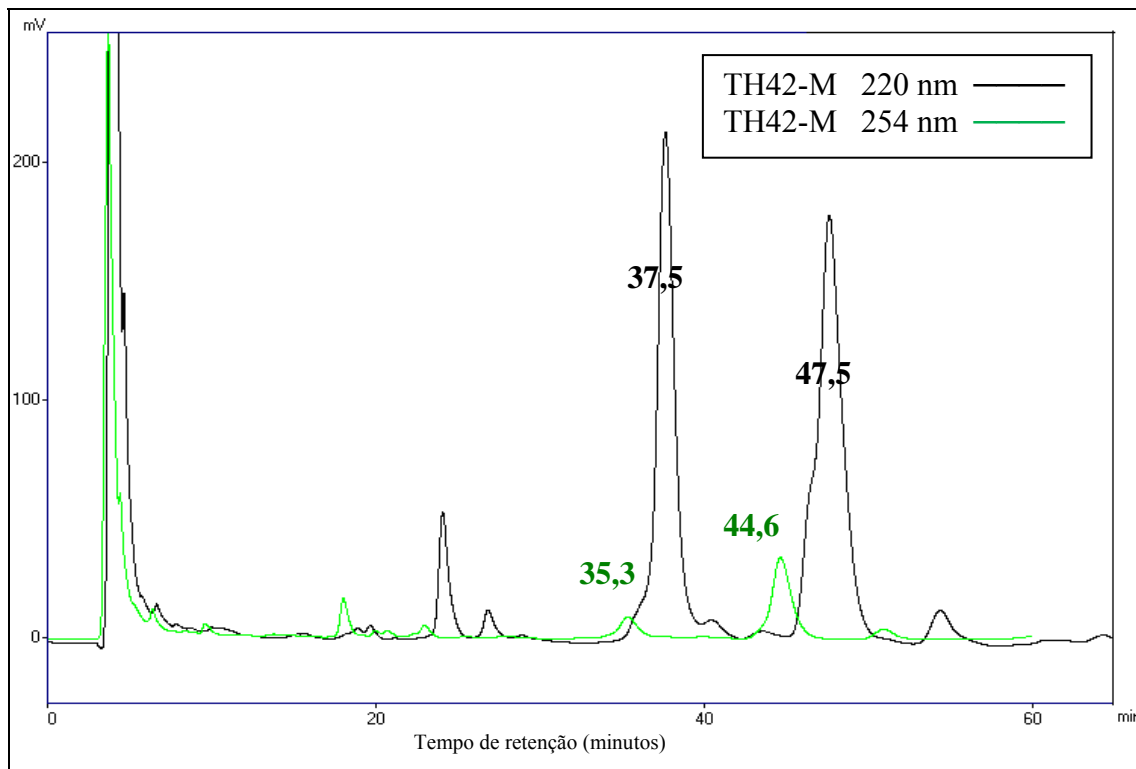
**Figura 5** - Cromatograma obtido dos extratos do líquido TH42-L a 220nm e TH42-L a 254nm.



**Figura 6** – Cromatograma obtido dos extratos do micélio TH25-M a 220nm e TH25-M a 254nm.



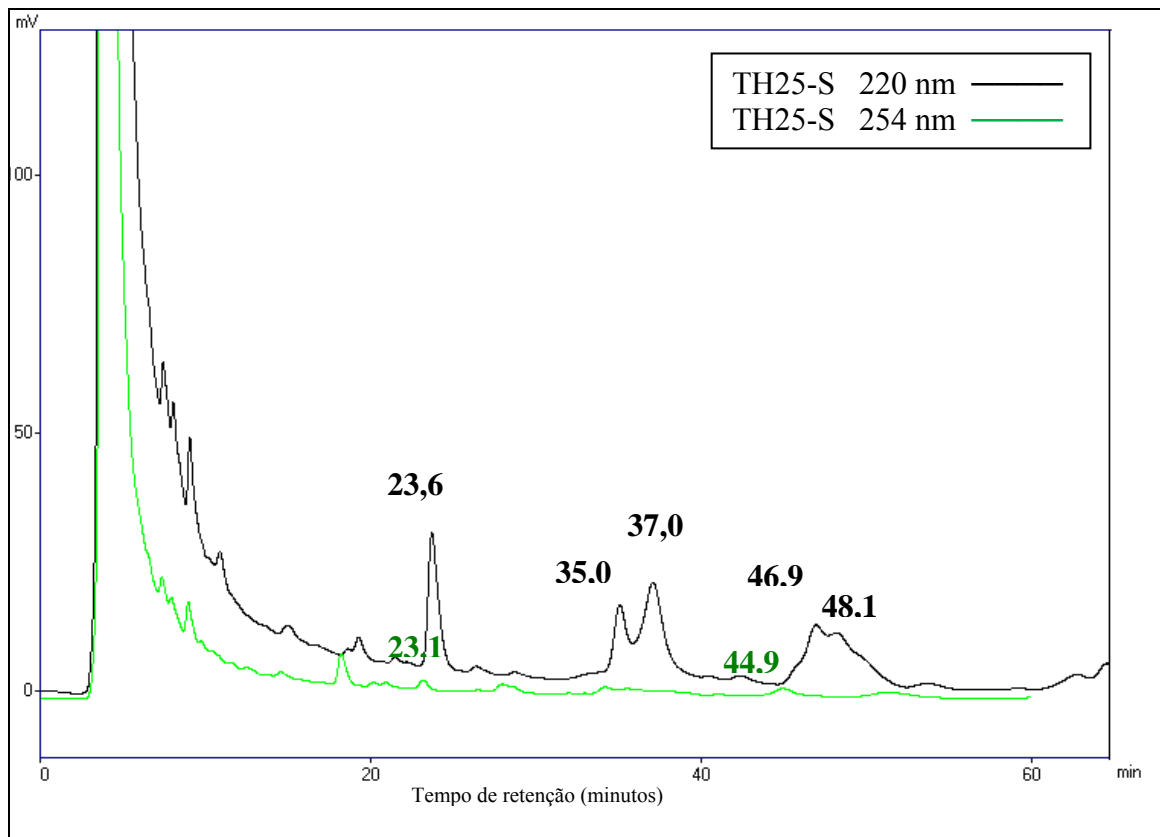
**Figura 7** – Cromatograma obtido dos extratos do micélio TH42-M a 220nm e TH42-M a 254nm.



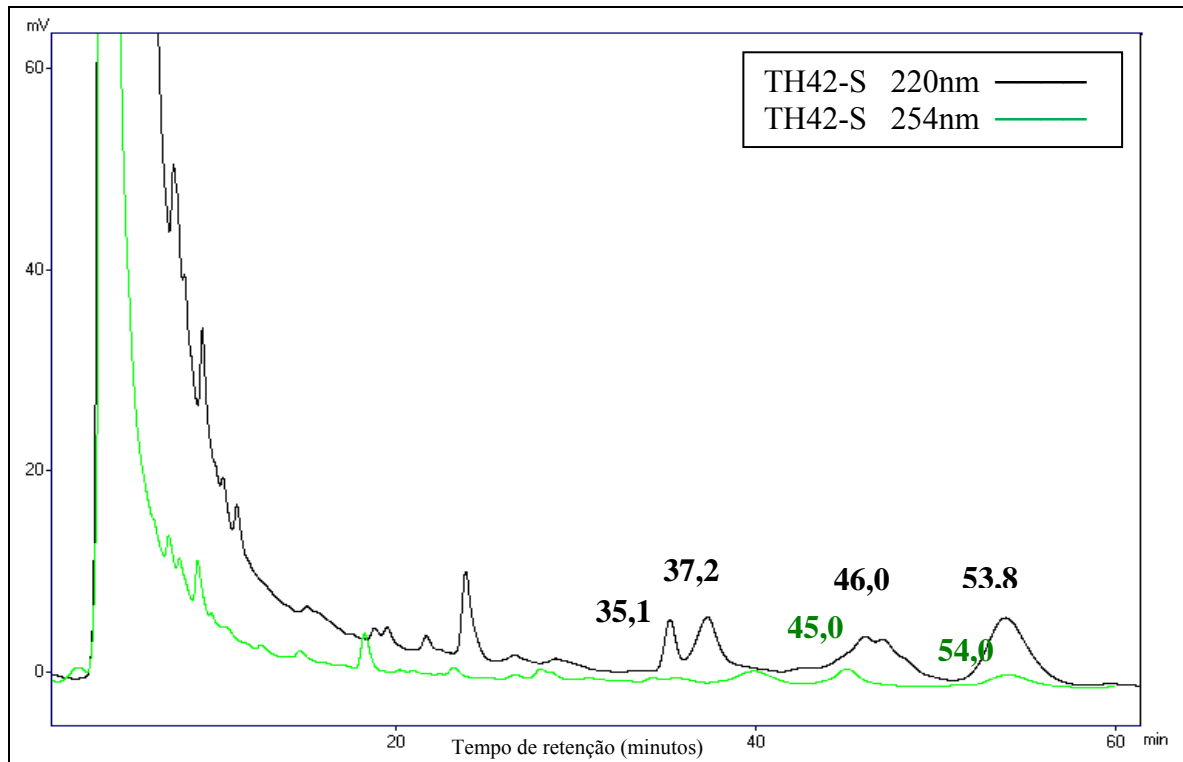
Observando os picos representados nos cromatogramas mencionados acima, constatou-se que há diferença entre os extratos, sugerindo que os isolados de *Trichoderma* sp. TH25-S e TH42-S (Figura 8 e 9) do cultivo sólido em arroz com casca podem diferenciar-se de acordo com perfil químico dos extratos do cultivo líquido BD (extrato do líquido e do micélio).

A comparação dos extratos dos isolados TH25 e TH42 do *Trichoderma* sp. nos cultivos líquidos e sólidos permitiu observar que houve maior concentração de substâncias no cultivo em meio líquido, em função da maior intensidade dos picos.

**Figura 8** – Cromatograma obtido dos extratos do arroz TH25-S a 220nm e TH25-S a 254nm.



**Figura 9** – Cromatograma obtido dos extratos do arroz TH42-S a 220nm e TH42-S a 254nm.



#### 4.3.5 Controle Biológico do Mofo Branco na Cultura da Soja

Nos resultados da incidência do mofo branco do ensaio 1 (Tabela 7), observou-se a eficiência ( $p < 0,05$ ) da aplicação dos tratamentos em relação à testemunha (48,1% de incidência), com exceção do produto biológico comercial 2, formulado a base de *Trichoderma* sp., o qual não diferenciou-se ( $p < 0,05$ ) da testemunha. O produto biológico comercial 1, os isolados selvagens TH25 e TH42, e o fungicida fluazinam apresentaram resultados eficientes de 37,5; 30,0; 32,5 e 14,4% de incidência, respectivamente, os quais diferiram estatisticamente da testemunha ( $p < 0,05$ ). O isolado TH25 apresentou redução na incidência da doença de 37,6% em relação à testemunha e o isolado TH42 redução de 32,4%. Na avaliação da severidade os produtos biológicos e o fungicida fluazinam diferenciaram-se da testemunha ( $p < 0,05$ ). Os produtos biológicos comerciais 1 e 2 apresentaram 35,0 e 41,3% de severidade da doença e os isolados selvagens TH25 e TH42 apresentaram 34,8 e 35,7%, respectivamente. O fungicida fluazinam apresentou 8,8% de severidade, diferenciando-se estatisticamente de todos os tratamentos, assim como nos resultados de incidência. Na produtividade não se observou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, inclusive a testemunha.

No ensaio 1, observou-se correlação negativa forte entre incidência x produtividade e severidade x produtividade, apresentando coeficiente de correlação  $r = - 0,92$  e  $r = - 0,88$ , respectivamente (dados não apresentados).

**Tabela 7** – Incidência e severidade do mofo branco, produtividade na cultura da soja tratadas com *Trichoderma* sp. e fungicida fluazinam, em dois ensaios: ensaio 1 (aplicação inverno/verão) e ensaio 2 (aplicação verão). Mauá da Serra-PR, 2011.

Tratamentos	Incidência		Severidade		Produtividade	
	%		$I^3$		Kg/ha	
Testemunha	48,1	a	56,1	a	3164,3	a
Fluazinam	14,4	c	8,8	c	3496,8	a
Comercial 1 <sup>1</sup>	37,5	b	35,0	b	3237,6	a
Comercial 2 <sup>1</sup>	40,0	a	41,3	b	3201,8	a
Selvagem TH25 <sup>2</sup>	30,0	b	34,8	b	3260,2	a
Selvagem TH42 <sup>2</sup>	32,5	b	35,7	b	3320,1	a
CV (%)	19,5		7,0		15,7	

Tratamentos	Incidência		Severidade		Produtividade	
	%		$I^3$		Kg/ha	
Testemunha	40,6	a	46,7	a	3092,8	a
Fluazinam	11,9	c	12,9	c	3611,6	a
Comercial 1 <sup>1</sup>	36,3	a	32,8	b	3217,4	a
Comercial 2 <sup>1</sup>	38,1	a	34,5	b	3182,0	a
Selvagem TH25 <sup>2</sup>	28,8	b	28,7	b	3267,4	a
Selvagem TH42 <sup>2</sup>	24,4	b	28,8	b	3331,4	a
CV (%)	8,7		24,0		9,1	

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. (1) produto comercial formulado à base de *T. harzianum*, (2) isolado selvagem de *T. harzianum*, (3) índice de intensidade de infecção em porcentagem.

Os resultados do ensaio 2 foram semelhantes ao ensaio 1, portanto não foi observado diferença das aplicações inverno/verão ou somente verão. Nos dados de incidência, os dois produtos biológicos comerciais 1 e 2 (36,3 e 38,1%), não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da testemunha (40,6%), enquanto os tratamentos com os isolados selvagens TH25 e TH42, observaram-se 28,8 e 24,4% de incidência, e no tratamento com fungicida fluazinam, observou-se a maior eficiência apresentando apenas 11,9%. Na avaliação da severidade, os

produtos biológicos e o fungicida fluazinam também diferenciaram-se da testemunha ( $p < 0,05$ ). Os produtos biológicos comerciais 1 e 2 apresentaram 32,8 e 34,8% de severidade. Os isolados selvagens TH25 e TH42 apresentaram 28,7 e 28,8%, respectivamente, e o fungicida fluazinam, 12,9% de severidade. Os resultados de incidência e severidade do tratamento com fungicida fluazinam foram os melhores, diferenciando-se estatisticamente dos demais. Nos resultados de produtividade, não observou-se diferença significativa entre os tratamentos. Assim como no ensaio 1, observou-se correlação negativa forte entre incidência x produtividade e severidade x produtividade, apresentando coeficiente de correlação  $r = -0,96$  e  $r = -0,95$ , respectivamente (dados não apresentados).

#### 4.4 DISCUSSÃO

A eficiência do fungo *Trichoderma* spp. para inibição de fitopatógenos é avaliada em muitos trabalhos, como por exemplo de Weidling (1934) Datnoff et al. (1995); Melo, (1996); Larkin e Fravel, (1998); Cotxarrera et al. (2002), Bettioli (2006) e Kerkeni et al. (2007) e a sua utilização em programas de controle biológico de doenças de plantas é cada vez mais comum e consolidada.

De acordo com Hjeljord e Tronsmo (2005), o antagonismo do *Trichoderma* spp. sobre os fitopatógenos pode ocorrer por meio da competição por espaço, nutrientes e oxigênio. Possui também a capacidade de micoparasitar fungos como a *S. sclerotiorum*, entrelaçando e penetrando no micélio (BETTIOLI, 2006).

Especificamente, para o controle ou inibição do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* causador do mofo branco na cultura da soja, trabalhos desenvolvidos por Gørgen et al. (2009), Louzada et al. (2009) e Figueirêdo et al. (2010) relatam a efetividade do *Trichoderma* spp.

Figueirêdo et al. (2010) desenvolveram um trabalho de confrontação direta de *S. sclerotiorum* X *Trichoderma* sp. com avaliação da classe de antagonismo pela escala de notas de Bell et al. (1982). Dos oito isolados de *Trichoderma* sp. avaliadas, em três delas observou-se nota 1, representando o crescimento micelial do biocontrolador em 100% da placa de Petri, inclusive sobre o patógeno. Em outros cinco isolados, observou-se nota 2, representando 75% de crescimento. Resultado similar foi observado neste trabalho, onde o isolado TH25 *Trichoderma* sp. apresentou 80 a 100% na presença de *S. sclerotiorum*. Com o isolado TH42, observaram-se resultados menores de crescimento, variando de 55 a 95%.

Trabalho similar de confrontação direta de *S. sclerotiorum* X *T. harzianum* foi desenvolvido por Abdullah et al. (2008), no qual a avaliação do antagonismo foi realizada por meio de imagens feitas por microscópio eletrônico de varredura. Após, aproximadamente, três dias de incubação, observaram o crescimento de hifas lineares e paralelas de *S. Sclerotiorum* tentando romper a barreira de micélios do *T. harzianum*. No entanto, observaram-se hifas de *T. harzianum* entrelaçando nas hifas da *S. sclerotiorum*, produzindo apressórios e estruturas semelhantes a ganchos que permitem sua penetração. Segundo os autores os resultados e as imagens sugerem uma interação de parasitismo. Possivelmente, o crescimento micelial do *Trichoderma* sp. sobre a *S. sclerotiorum*, observado nas placas de Petri no presente trabalho de confrontação direta, seja devido a interação de micoparasitismo existente entre eles.

Como citado anteriormente, Louzada et al. (2009), a partir de 40 amostras de solo, estabeleceram uma coleção de 230 isolados monospóricos de *Trichoderma* spp., com o objetivo de selecionar isolados com potencial para controle biológico de doenças causadas por *S.sclerotiorum*. Foram desenvolvidos testes de confrontação direta com avaliações ao microscópio eletrônico de varredura e com auxílio da escala de nota de Bell et al. (1982), no qual foram observados potencial antagônico em 10% dos isolados de *Trichoderma*. Nas avaliações ao microscópio eletrônico, sete isolados selecionados *in vitro* mostraram que nem todos promoveram o hiperparasitismo dos patógenos, sugerindo a existência de outros mecanismos de antagonismo, possivelmente a antibiose ou competição.

Os fungos do gênero *Trichoderma* têm crescimento rápido, são produtores de esporos, além de fonte de enzimas que atacam a parede celular (celulases, quitinases, glucanases, etc), e produzem antibióticos (VINALE et al., 2008) como konigininas e fosfolipases A<sub>2</sub> (SOUZA et al., 2008).

Weidling (1934) foi o pesquisador a desenvolver os primeiros trabalhos relatando a capacidade de *Trichoderma* spp. em produzir metabólitos, descobrindo o potencial desse fungo como agente de controle biológico por seu mecanismo de interação de antibiose. Neste trabalho, foram retirados extratos dos isolados de *Trichoderma* sp. e por meio da análise da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram observados maior concentração de substâncias ou possíveis metabólitos nos cultivos líquidos baseados na área dos picos, visualizados nos cromatogramas.

Segundo Macias et al. (2000), *Trichoderma virens* produz um grupo de metabólitos com esqueletos carotanos juntos com cicloneotriol, chamados trichocarenos A,

B, C e D, os quais apresentam atividades biológica, podendo ser reguladores de crescimento de plantas, antimicrobianos, herbicidas, micotoxinas ou medicamentos.

Peptaibois e peptídeos N-acilados são metabólitos, frequentemente encontrado em *Trichoderma* spp. e caracterizados por possuir elevada taxa de aminoácidos alfa-dialquilados, que são ativos contra bactérias gram-positivas (DANIEL e RODRIGUES FILHO, 2007). Wiest et al. (2002) desenvolveram um trabalho sobre identificação de peptaibois e relataram uma caracterização preliminar do peptaibol sintetase de *Trichoderma virens*. A identificação completa do gene responsável para a produção de peptaibol facilitaria os estudos sobre sua estrutura e sua função, conseqüentemente, contribuiria para maiores descobertas sobre sua atividade no biocontrole.

Nos resultados do presente trabalho com aplicação dos extratos houve altas taxas de inibição do crescimento micelial, sendo que a maioria dos tratamentos apresentou porcentagens acima de 80% e para inibição da germinação carpogênica as taxas variaram de 10 a 23%.

Provavelmente, a inibição observada no crescimento micelial e germinação carpogênica, seja devido à presença de metabólitos nos extratos, como foi observado nos picos durante a leitura da cromatografia (HPLC), os quais podem representar as possíveis substâncias ou metabólitos presentes no extrato. O desenvolvimento de trabalhos em relação ao isolamento das possíveis substâncias presentes nos extratos de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42 são essenciais para maiores esclarecimentos do potencial dessas substâncias para inibição de *S. sclerotiorum* e redução dos danos causados por esse fitopatógeno.

Em relação ao potencial de *Trichoderma* spp. para uso em condições em campo para controle do mofo branco, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas nos dias atuais, devido os danos causados pela doença em várias regiões brasileiras, principalmente, em regiões com elevada altitude ou em campos de produção com uso de pivô central.

Em vários trabalhos são observados resultados significativos em relação à eficiência *Trichoderma* sp., mas alguns com diferenciações no modo de aplicação em relação ao presente trabalho, que baseou-se apenas em aplicações por meio de pulverizações na parte aérea da planta. Como por exemplo, Görden et al. (2009) testaram a aplicação de *Trichoderma harzianum* com associação de palhada de *Brachiaria ruziziensis* para redução da densidade de inóculo de *S. sclerotiorum* e redução da incidência de mofo-branco na cultura da soja. Constataram que a interação do biocontrole com uso da palhada é eficiente e viável podendo reduzir a incidência do mofo-branco da soja. De acordo com os autores o manejo das áreas infestadas por meio de palhada pode ser essencial para o sucesso do controle biológico

em grandes culturas, sendo que os antagonistas dependem do ambiente onde é aplicado, para um melhor estabelecimento e sobrevivência permanente. Menendez e Godeas (1998) observaram a eficiência do *T. harzianum* por meio de aplicação no sulco com 40% de controle em relação à testemunha para germinação de sementes e 62,5% de redução no número de escleródios germinados. Paula Junior et al. (2009) desenvolveram testes com *Trichoderma* sp. *in vitro* e em campo por meio de aplicação via água de irrigação, onde a maioria dos isolados do antagonista foi eficaz contra *S. sclerotiorum in vitro*, mas em campo, a aplicação de *Trichoderma* não reduziu a incidência e severidade da doença e não aumentou o rendimento de grãos.

Nos dados apresentados nesse trabalho, observou-se a eficiência da aplicação dos isolados selvagens de *Trichoderma* sp., embora essa eficiência tenha sido menor à aplicação do fungicida fluazinam.

Trabalhos desenvolvidos com o controle biológico de doenças de plantas, especificamente com a utilização de *Trichoderma* sp. para controle do mofo branco, estão sendo muito estudados devido ao potencial do biocontrolador, mas ainda existem muitos obstáculos em relação a padronização dos materiais utilizados, que seguem desde as etapas de seleção dos agentes de biocontrole até a formulação dos produtos para vendas em larga escala. Como comentado anteriormente, a utilização do controle biológico se torna vulnerável em condições de campo devido a grande sensibilidade do estabelecimento dos agentes biocontroladores. O processo de seleção desses microrganismos de forma localizada para diferentes regiões e climas específicos, poderia facilitar o estabelecimento desses quando aplicados em locais ou regiões de maior favorabilidade em relação à temperatura, umidade, precipitação, condições químicas e físicas do solo, e outros.

O sucesso da aplicação dos agentes de controle biológico depende de interações complexas com os patógenos e as plantas. Recentes avanços e técnicas modernas, como a proteômica e a metabolômica podem fornecer novas informações sobre as interações do *Trichoderma*. A aplicação dos metabólitos de *Trichoderma* para proteção das culturas para indução das defesas do hospedeiro pode tornar-se uma realidade no futuro próximo, podendo ser produzidos em grandes quantidades e escala industrial (VINALLE et al., 2008).

#### 4.5 CONCLUSÃO

Todos os extratos de *Trichoderma* sp. apresentaram eficiência significativa para inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, na inibição da germinação carpogênia e na redução do número de ascósporos produzidos por apotécio.

Em campo, a aplicação dos isolados selvagens de *Trichoderma* sp. reduziram a incidência e severidade do mofo branco. No teste de antagonismo de confrontação direta, não observou-se variabilidade dos isolados de *S. sclerotiorum*. No entanto, no teste de extratos observaram-se diferenças significativas entre os isolados de *S. sclerotiorum* quando aplicados os extratos menos eficientes.

#### 4.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, p. 1354– 1359, 2008.

AMARAL, E. Novo índice de intensidade de infecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.4, p.1-2, 1969.

ARBAOUI, M.; KRAIC, J.; HUSZAR, J. Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different conditions. **Pol'nohospodárstvo**, v.54, p.36-39, 2008.

ATALLAH, Z. K.; LARGET, B.; CHEN, X.; AND JOHNSON, D. A. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology**, v. 9, p.737-742, 2004.

BEDENDO, I.P.; MASSOLA, N.S.; AMORIM, L. Controle cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4.ed. v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p.367-388.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHABELL, D.K.; WELLS, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, n.4, p.379-382, 1982.

BETTIOL, W. Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. **Fitosanidad**, v.10, n.2, p.85-98, 2006.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.16, n.2, p.93–108, 1994.

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

- CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri – Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, p.18-24, 2001.
- CAVALCANTI, L.S.; DIPIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, 2005. 263p.
- COSTA, J. R.; COSTA, J.L. da S. Efeito da aplicação de fungicidas no solo sobre a germinação carpogênica e miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, p.133-138, 2004.
- COTXARRERA, L. et al. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 467-476, 2002.
- DANIEL, J. F. S.; RODRIGUES FILHO, E . Peptaibols of *Trichoderma*. **Natural Product Reports**, v. 24, p.1128-1141, 2007.
- DATNOFF, L.E.; NEMEC, S.; PERNEZNY, K. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. **Biological Control**, v.5, p.427-431, 1995.
- ETHUR, L.Z.; CEMBRANEL, C.Z; DA SILVA, A.C.F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.885-887, 2001.
- FARIA, A.Y.K.; CASSETARI NETO, D.; ALBUQUERQUE, M.C.A. Atividade antagônica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* a patógenos de sementes de algodoeiro. **Revista Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 6, n. 1, p. 59-68, 2002.
- FERRAZ, L.C.L.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; NASSER, L.C.B. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.17-26, 2003.
- FIGUEIRÊDO, G.S. de; FIGUEIRÊDO, L.C. de; CAVALCANTI, F.C.N.; SANTOS, A.C. dos; COSTA, A.F. da; OLIVEIRA, N.T. de. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n.1, p.1-9, 2010.
- GOMES, E.V.; NASCIMENTO, L.B. do; FREITAS, M.A. de; NASSER. L.C.B.; PETROFEZA, S. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. **Journaul of Phytopathology**, v.159, p.94–99, 2011.
- GÖRGEN, C.A.; SILVEIRA NETO, A.N.; CARNEIRO, L.C.; RAGAGNIN, V.; LOBO JUNIOR, M. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.12, p.1583-1590, 2009.
- GRAU, C.R.; RADKE, V.L.; GILLESPIE, F.L. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.66, p.506–508, 1982.

- HJELJORD, L.; TRONSMO, A.; 2005. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G.E.; Kubicek, C.P. ***Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications***, Taylor & Francis, Londres, pp.115-133.
- HOMECHIN, M. **Potencial e emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum* para o controle de patógenos de soja (*Glycine max* L.)**. 1987. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade de São Paulo - ESALQ. Piracicaba.
- HUANG, H.; ERICKSON, R.S. Factors affecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal antagonists. **Journal of Phytopathology**, v.156, p.628–634, 2008.
- KERKENI, A.; DAAMI-REMADI, M.; TARCHOUN, N.; KHEDHER, M.B. *In vitro* and *in vivo* suppression of *Pythium ultimum* the causal agent of the cucumber damping-off by some compost fungi. **Asian Journal of Agricultural Research**, v.1, n.2, p.50-58, 2007.
- LARKIN, R.P.; FRAVEL, D.R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. **Plant Disease**, v.82, p.1022-1028, 1998.
- LOUZADA, G.A.S.; ;CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v. 9, n.3, p.145-149, 2009.
- MACIAS, F.A.; VARELA, R.M.; SIMONET, A.M.; CUTLER, H.G., CUTLER, S.J.; EDEN, M.A.; HILL, R.A. Bioactive Carotenes from *Trichoderma virens*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.9, p.1197-1200, 2000.
- MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo “in vitro” de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.1, p.1-7, 1998.
- MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas**, v.4, p.261-295, 1996.
- MENENDEZ, A.B.; GODEAS, A. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742) **Mycopathologia**, v.142, p.153–160, 1998.
- PAULA JÚNIOR, T.J., VIEIRA, R.F., ROCHA, P.R.R., BERNARDES, A., COSTA, E.L., CARNEIRO, J.E.S., VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L. White mold intensity on common bean in response to plant density, irrigation frequency, grass mulching, *Trichoderma* spp., and fungicide. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.44-48, 2009.
- PERES, E.; MELO I.S. de. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I – Aspectos citológicos. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.52, n.1, p.56-59, 1995.
- PERES, A.P.; NASSER, L.C.; MACHADO, J.C. Utilização de meio seletivo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, 123-127, 2002.
- QUIROGA, E.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p. 89-96, 2001.

SOUZA, A.D.L.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A.Q.L.; PEREIRA, J.O.; CALGAROTTOE, A.K.; MASOE, V.; MARANGONIE S.; SILVA, S.L. da. Koninginins, phospholipase A2 inhibitors from endophytic fungus *Trichoderma konigin*. **Toxicon**, v.51 p.240–250, 2008.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

WEIDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v.24 p.1153-1179, 1934.

WIEST, A.; GRZEGORSKI, D.; XU, B.; GOULARD, C.; REBUFFAT, S.; EBBOLE, D.J.; BODO, B.; KENERLEY, C. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.23, p. 20862–20868, 2002.

WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R. Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007. Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2009/yields/>. Acesso em: 22 dez. 2011.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fluazinam e o procimidona apresentaram maior eficiência para o controle do mofo branco na cultura da soja em condições de campo. Para inibição do crescimento micelial, inibição da germinação carpogênica e dos ascósporos, apenas o fluazinam foi eficiente.

Os extratos de *Trichoderma* sp. inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, inibiram a germinação carpogênica e reduziram o número de ascósporos produzidos por apotécio, *in vitro*, devido a ação de possíveis metabólitos presentes nos extratos. Trabalhos posteriores serão desenvolvidos para o isolamento dos possíveis metabólitos existentes nos extratos de *Trichoderma* sp. TH25 e TH42. Os isolados selvagens de *Trichoderma* sp. reduziram a incidência e a severidade do mofo branco, mas apresentaram menor eficiência que a aplicação dos fungicidas fluazinam.

## 6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, p. 1354–1359, 2008.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**, 5. ed. Burlington: Elsevier Academic, 2005. 922p.
- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A. Doenças da soja. In: KIMATI H.; AMORIM L.; BERGAMIN FILHO A.; CAMARGO L.E. A.; REZENDE J.A.M. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4.ed. v.2. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663p.
- ASRAN-AMAL, A.; ABD-ELSALAM, K.A.; OMAR, M.R.; ALY, A.A. Antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* and use of M13 microsatellite-primed PCR to evaluate the antagonist genetic variation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.112, n.6, p.550–561, 2005.
- BARDIN S.D.; HUANG H.C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.88–98, 2001.
- BECKER, J.O.; COOK, R.J. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased growth response of wheat by fluorescent *Pseudomonas*. **Phytopathology**, v.59, n.8, p.1147-1151, 1988.
- BEDENDO, I.P.; MASSOLA, N.S.; AMORIM, L. Controle cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4.ed. v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p.367-388.
- BETTIOL, W. Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. **Fitosanidad**, v.10, n.2, p.85-98, 2006.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: KIMATI H.; AMORIM L.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3.ed. v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-727.
- BIN, L.; KNUDSEN, G.R. ESCHEN, D.J. Influence of an antagonistic strain of *Pseudomonas fluorescens* on growth and ability of *Trichoderma harzianum* to colonize sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. **Phytopathology**, v.81, p.994-1000, 1991.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*: II infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, v.69, n.11, p.2357-2372, 1991.
- BIZI, R.M. **Utilização de fungos no controle biológico de doenças**. Disponível em: <<http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/contbio03.html>>. Acesso em: 15 de mai. 2007.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, p.93–108, 1994.

BUENO, C.J.; AMBRÓSIO, M.M. de Q.; SOUZA, N.L. de. Ocorrência de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em *Aster ericoides* L. (White Show) no estado de São Paulo, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p.293-294, 2006.

CAMPOS, H.D.; SILVA, L.H.C.P.; CABRAL, D.A.C.; SILVA, J.R.C.; RIBEIRO, G.C.; SILVA, R.S. Eficácia de fungicidas para controle do mofo branco na cultura da soja na safra 2010/2011, Montividiu - GO. REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 32., 2011, São Pedro. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2011. p. 151-153

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. de; LOBO JÚNIOR, M.; GERALDINE A.M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.822-828, 2011.

CAVALCANTI, L.S.; DIPIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, 2005. 263p.

CHARCHAR, M.J.D.; ANJOS, J.R.N. dos; OSSIPI, E. Ocorrência de nova doença do algodoeiro irrigado, no Brasil, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.6, p.1101-1106, 1999.

CHET, I.; BAKER, R. Indication of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, v.70, n.9, p.994-998, 1980.

COLEY-SMITH, J.R.; COOKE, R.C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Plant Pathology**, v.9, p.65-92, 1971.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: APS, 1983. 539p.

COSTA, J.R.; COSTA, J.L. da S. Efeito da aplicação de fungicidas no solo sobre a germinação carpopogênica e miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, p.133-138, 2004.

COTXARRERA, L.; TRILLAS-GAY, M.I.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 467-476, 2002.

DANIEL, J.F.S.; RODRIGUES FILHO, E. Peptaibols of *Trichoderma*. **Natural Product Reports**, v. 24, p.1128-1141, 2007.

DATNOFF, L.E.; NEMEC, S., PERNEZNY, K. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. **Biological Control**, v.5, p.427-431, 1995.

DESTRO, D.; PÍPOLO, V.C.; KIIHL, R.A.S.;ALMEIDA, L.A. Photoperiodism and genetic control of the long juvenile period in soybean: a review, **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, p.72-92, 2001.

- DHINGRA, O.D.; MENDONÇA, H.L.; MACEDO, D.M. Doenças e seu controle. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**, Londrina: Mecenaz, 2009. p.133-156.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, p.719-725,1982.
- EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**. Disponível em: <http://cepa.epagri.sc.gov.br/>. Acesso: 12 dez. 2011.
- ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 155 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A.C.F. da; STEFANELO, D.R.; ROCHA, E.K. da. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 127-133, 2005.
- ETHUR, L.Z.; CEMBRANEL, C.Z; DA SILVA, A.C.F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.885-887, 2001.
- FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stage of soybean development**, Ames: Iowa, 1977. 11p.
- FERNANDES, A.O.; MORANDI, M.A.B.; DOS SANTOS, E.R.; DE ALMEIDA, E.G. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea* para o controle biológico do mofo branco do feijoeiro (*Sclerotinia Sclerotiorum*) em cultivo de outono-inverno. **Anais da Jornada Acadêmica da Embrapa Meio Ambiente**, p.39, 2006.
- FIGUEIRÊDO, G.S. de; FIGUEIRÊDO, L.C. de, CAVALCANTI, F.C.N.; SANTOS, A.C. dos; COSTA, A.F. da; OLIVEIRA, N.T. de. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n.1, p.1-9, 2010.
- FURLAN, S.H. **Manejo do mofo branco na cultura da soja**. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos.php>. Acesso: 20 jul. 2009.
- GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: HARMAN G. E.; KUBICEK, C. P. ***Trichoderma & Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics***. London: Taylor&Francis, 1998. 286p.
- GÖRGEN, C.A.; HIKISHIMA, M.; NETO, A.N. da S.; CARNEIRO, L.C.; LOBO JUNIOR, M. Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: ALMEIDA, A.M.R.; SEIXAS, C.D.S. Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relação com o manejo do solo e da cultura. Londrina: Embrapa Soja, 2010. p.73-104.
- GÖRGEN, C.A.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L.C.; RAGAGNIN, V.; LOBO JUNIOR, M. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.12, p.1583-1590, 2009.
- GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A.F. dos; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v.30, n.1/2, p.155-165, 2000.

HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.69, p.64-68, 1979.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v.2, p.43-56, 2004.

HARTLEY, C. **Damping-off in forest nurseries**. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, v.934, p1-99, 1921.

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. **Compendium of soybean diseases**, ed 4. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1999. 100p.

HEGEDUS, D.D.; RIMMER S.R. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? **FEMS Microbiology Letters**, v.251, n.2, p.177-184, 2005.

HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FEIRREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2009. 74p.

HENIS, I.; GRAFAR, A.; BAKER, R. Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: effect of successive plantings, PCNB, and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. **Phytopathology**, v.68, n.6, p.900-907, 1978.

HENRY, A.W. The natural microflora of the soil in relation to the foot-rot problem of wheat. **Canadian Journal Research**, v.4, p.69-77. 1931.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: na overview. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. **Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications**. ed.1, Londres: Taylor & Francis, 2005. p.115-133.

HOMECHIN, M. Plantas daninhas hospedeiras de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.3, p.472, 1982.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1, p.4-10, 2003.

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.

ITO, M.F.; PARISI, J.J.D. **Mofo-branco: doença que exige muita atenção, principalmente no período outono-inverno**. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/mofobranco.htm>. Acesso em: 01 ago. 2009.

JACCOUD FILHO, D.S.; VRISMAN, C.M.; PIERRE, M.L.C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F.F.; CANTELE, M.A.; GRABICOSKI, E.M.G.; HENNEBERG, L. Avaliação da eficácia de novos fungicidas para o controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) da soja nos campos gerais. REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 32., 2011, São Pedro. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2011. p. 154-156.

KERKENI, A.; DAAMI-REMADI, M.; TARCHOUN, N.; KHEDHER, M.B. *In vitro* and *in vivo* suppression of *Pythium ultimum* the causal agent of the cucumber damping-off by some compost fungi. **Asian Journal of Agricultural Research**, v.1, n.2, p.50-58, 2007.

KHAN, A.M.; SAXENA, S.K.; SIDDIQI, Z.A. Efficacy of *Tagetes erecta* in reduction root infesting nematodes of tomato and okra. **Indian Phytopathology**, v.24, p.166-169, 1971.

LARKIN, R.P.; FRAVEL, D.R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. **Plant Disease**, v.82, n.9, p.1022-1028, 1998.

LEITE, R.M.V.B. de C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Comunicado Técnico**. Embrapa Soja. n.76, 2005. Disponível em [http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=170&cod\\_pai=76](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=170&cod_pai=76). Acesso em: 29 jul. 2009.

LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v. 9, n.3, p.145-149, 2009.

LYNCH, J.M.; WILSON, K.L.; OUSLEY, M.A.; WHIPPS, J.M. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. **Letters in Applied Microbiology**, v.12, n.2, p.59-61, 1991.

MACIAS, F.A.; VARELA, R.M.; SIMONET, A.M.; CUTLER, H.G., CUTLER, S.J.; EDEN, M.A.; HILL, R.A. Bioactive Carotenes from *Trichoderma virens*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.9, p.1197-1200, 2000.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Cultura – Soja. 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>. Acesso em: 24 dez. 2011

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo “in vitro” de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, v55, n.1, p.1-7, 1998.

MELO, I.S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. 1ed, v.1. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p.17-67.

MASSOLA, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4.ed. v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p.149-206.

MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.135-156.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas**, v.4, p.261-295, 1996.

MENENDEZ, A.B.; GODEAS, A. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742) **Mycopathologia**, v.142, p.153–160, 1998.

MORTON, J.G.; HALL, R. Factors determining the efficacy of chemical control of white mold in white bean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.11, p.297–302, 1989.

MUELLER, D.S.; DORRANCE, A.E.; DERKSEN, R.C.; OZKAN, E.; KURLE, J.E.; GRAU, C.R.; GASKA, J. M.; HARTMAN, G.L.; BRADLEY, C.A.; PEDERSEN, W.L. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of Sclerotinia stem rot on soybean. **Plant Disease**, v.86, p.26-31, 2002.

NAPOLEÃO, R.; CAFÉ FILHO, A.C; LOPES, C.A.; NASSER, L.C.B. Effect of plant spacing and bean cultivar on white mold and seed sanity. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n.1, p. 63-66, 2006.

NASSER, L.C.B.; NAPOLEÃO, R.; CARVAJAL, R.A. Mofo Branco – cuidado com a semente. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, n.04, mio. 1999. Disponível em <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo>>. Acesso em: 25 abr. 2009.

NASSER, L.C.B.; SPEHAR, C.R. Podridão Branca. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, n.31, ago. 2001. Disponível em <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo>>. Acesso em: 29 abr. 2009.

NOGUEIRA, A.P.O.; SEDIYAMA, T.; BARROS, H.B.; TEIXEIRA, R. de C. Morfologia, crescimento e desenvolvimento. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenas, 2009. 314p.

NUNES JÚNIOR, J.; PIMENTA, C.B.; MEYER, M.C.; COSTA, N.B.; SEIL, A.H.; NUNES SOBRINHO, J.B. Avaliação da eficácia de fungicidas no controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, no Estado de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. **Anais...** Brasília: SBF, 2011. p. 752-752.

OKLEIFELF, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum*: interaction with plants and effect on growth. **Plant Soil**, v.144, n.2, p.267-72, 1992.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; ROCHA, P.R.R.; BERNARDES, A.; COSTA, E.L., CARNEIRO, J.E.S.; VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. White mold intensity on common bean in response to plant density, irrigation frequency, grass mulching, *Trichoderma* spp., and fungicide. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.44-48, 2009.

PEIXOTO, J.R. **Efeito da matéria orgânica, do superfosfato simples e do cloreto de potássio na formação de mudas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deneger)**. 1986. 101p. Tese (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Lavras, Lavras.

PERES, A.P.; NASSER, L.C.; MACHADO, J.C. Utilização de meio seletivo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.123-127, 2002.

RIDOUT, C.J.; COLEY-SMITH, J.R.; LYNCH, J.M. Enzyme activity and aletrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Journal of General Microbiology**, v.132, p.2345-2352, 1986

ROESE, A.D.; ROMANI R.D.; FURLANETTO, C.; STANGARLIN, J.R.; PORTZ R.L. Levantamento de doenças na cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, em municípios da região Oeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 5, p. 1293-1297, 2001.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV, 2007. 269p.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. de C.; BARROS, H.B. Origem, evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenas, 2009. p.1-5.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Processos microbiológicos e bioquímicos no solo. In: SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. eds. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ESAL/FAEP/ABEAS, 1988. p.23-46.

SILVA, R.A. **Comportamento do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) aos indutores de resistência à seca**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo – ESALQ, Piracicaba.

SILVEIRA, E.B.; RODRIGUES, V.J.L.B.; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; MESQUITA, J.C.P. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.211-216, 2002.

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. **Compendium of soybean diseases**. ed3. Saint Paul: The American Phytopathological Society. 1989. 106p.

SMITH, D.L.; GARRISON, M.C.; HOLLOWELL, J.E.; ISLEIB, T.G.; SHEW, B.B. Evaluation of application timing and efficacy of the fungicides fluazinam and boscalid for control of Sclerotinia blight of peanut. **Crop Protection**, v.27, p.823-833, 2008.

SOUZA, A.D.L.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A.Q.L.; PEREIRA, J.O.; CALGAROTTOE, A.K.; MASOE, V.; MARANGONIE S.; SILVA, S.L. da. Koninginins, phospholipase A2 inhibitors from endophytic fungus *Trichoderma konigin*. **Toxicon**, v.51 p.240–250, 2008.

TU, J.C. Management of white mold of white bean in Ontario. **Plant Disease**, v.73, p.281-285, 1989.

VIEIRA, R.F.; PAULA JÚNIOR, T.J. de; PERES, A.P.; MACHADO, J. da C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.770-773, 2001.

VIEIRA, R.F.; PINTO, C.M.F.; PAULA JÚNIOR, T.J. de. Chemigation with benomyl and fluazinam and their fungicidal effects in soil for white mold control on dry beans. **Fitopatologia Brasileira**, n.28, p.245-250, 2003.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

VRISMAN, C.M.; JACCOUD FILHO, D.S.; SARTORI, F.F.; PIERRE, M.L.C.; BERGER NETO, A.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; CANTELE, M.A.; CANTELE, L.E.; HULLER, G.C.; TULLIO, H. E. Efeito do tratamento de sementes como medida preventiva PARA evitar a disseminação do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* via sementes de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. **Anais...** Brasília: SBF, 2011. p. 1630-1630.

WEIDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v.24 p.1153-1179, 1934.

WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R. **Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007**. Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2009/yields/>. Acesso em: 22 dez. 2011.