

UniRV- UNIVERSIDADE DE RIO VERDE
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

**MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DOS AGENTES DE
BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* SOB CONDIÇÕES DE
CAMPO**

BÁRBARA ARANTES CAMPOS
Magister Scientiae

RIO VERDE
GOIÁS – BRASIL
2019

BÁRBARA ARANTES CAMPOS

**MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DOS AGENTES DE
BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* SOB CONDIÇÕES DE CAMPO**

Dissertação apresentada à UniRV – Universidade de Rio Verde, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**RIO VERDE
GOIÁS - BRASIL**

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação-- (CIP)

Campos, Bárbara Arantes

Métodos para avaliação de eficácia dos agentes de biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* sob condições de campo. / Bárbara Arantes Campos. — 2019.

43f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Hercule Diniz Campos

Co-orientadora: Dra. Lilianne Martins Ribeiro

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) — Universidade de Rio Verde - UniRV, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Faculdade de Agronomia, 2019.

Inclui índice de tabelas e figuras.

1. Controle biológico. 2. Escleródios. 3. Mofa-branco. I. Campos, Hercule Diniz. II. Ribeiro, Lilianne Martins

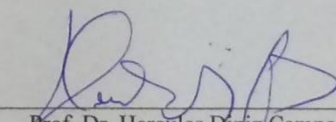
CDD:

BÁRBARA ARANTES CAMPOS

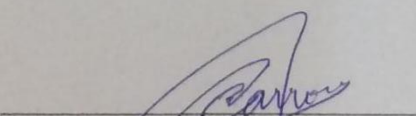
MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DOS AGENTES DE
BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* SOB CONDIÇÕES DE CAMPO

Dissertação apresentada à UniRV – Universidade de
Rio Verde, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*

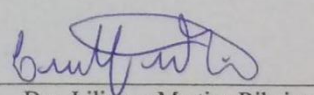
APROVAÇÃO: 14 de novembro de 2019



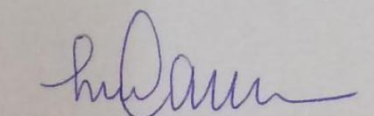
Prof. Dr. Hercules Diniz Campos
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Alberto Leão de Lemos Barroso
Membro – FA/UniRV



Dra. Lillianne Martins Ribeiro
Bolsista PNPB – FA/UniRV



Prof. Dra. Luciana Celeste Carneiro
Membro – UFG/Regional Jataí

A minha Mãe Rizzia Ribeiro Arantes e ao meu Pai Jairo Barbosa Campos;

À minha irmã, Ludmila Arantes Barbosa Campos;

Ao meu esposo, Richard Carmo Peres;

Aos meus Tios;

As minhas amigas, Louise Stefanello, Lenise Selaysim, Ângela
Castro e Izabella Lorenzoni.

Dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder o dom da vida e me abençoar em cada jornada enfrentada durante o mestrado. Sei que nada de mim seria sem a proteção divina dele. Obrigada por me mostrar o quão grande és tu, e quão grande são as obras que o senhor tem reservadas para mim.

A minha mãe Rizzia Arantes, pelo amor, carinho, paciência e apoio que sempre me deu, por cuidar tão bem de suas filhas, mesmo diante das dificuldades impostas pela vida, pelos valores recebidos e por sempre me ensinar, que o sucesso somente depende do meu crescimento pessoal e profissional, e que as oportunidades estão por toda a parte, só é preciso paciência e perseverança.

A minha irmã Ludmila, por sempre ser minha amiga, companheira, por seu amor e apoio.

Ao meu pai Jairo Barbosa, por sempre ser carinhoso, por me apoiar e demonstrar orgulho de minha trajetória.

Ao meu marido Richard, por todo amor, carinho, apoio, parceria e paciência que tem comigo desde que começamos a namorar, e por me ajudar a me manter firme, mesmo quando eu tenho a certeza de que não aguentarei. Por ser meu companheiro em todas as horas, inclusive na hora da montagem e avaliação dos ensaios deste trabalho. Obrigada por tudo, Eu Te Amo!

As minhas tias Isa e Nara por não medirem esforços, em me ajudar, por estarem sempre presentes em minha vida e por todo o carinho.

Ao professor Dr. Hércules Diniz Campos do Laboratório de Fitopatologia da UniRV, por aceitar me orientar, sempre me receber bem no laboratório, pela paciência, pela contribuição para a melhoria desta dissertação.

Aos membros da banca: Dra. Lilianne Martins Ribeiro, Prof. Dr. Alberto Leão de Lemos Barroso e Profa. Dra. Luciana Celeste Carneiro que dispuseram de tempo para estarem comigo neste momento.

As minhas amigas: Ângela e Izabella, por todo carinho que tiveram comigo.

As minhas amigas: Lenise e Louise, pelos momentos de descontração, auxílio e companheirismo, ao longo destes dois anos e meio de estudos.

A CAPES e FAPEG, pela Bolsa de Estudos.

Muito Obrigada, a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Mofo branco na cultura da soja: danos e perdas.....	2
2.2 Mofo branco: taxonomia e aspectos biológicos.....	4
2.3 Controle biológico.....	5
2.3.1 <i>Trichoderma</i>	7
2.3.2 <i>Bacillus</i>	8
3 MATERIAL E MÉTODO.....	9
3.1 Produção de escleródios.....	10
3.2 Instalação do ensaio no campo.....	10
3.3 Instalação do ensaio sob condições controladas em laboratório.....	12
3.4 Análise estatística.....	13
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	14
4.1 Ensaio conduzido sob condições de campo.....	14
4.2 Ensaio conduzido sob condições controladas em laboratório.....	19
5 CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS.....	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Tratamentos com biofungicidas, épocas de aplicação, doses dos produtos comerciais e concentração de ativos, safra 2017/18.....	11
TABELA 2	Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200L ha ⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de <i>Trichoderma harzianum</i>	15
TABELA 3	Números de escleródios podres (EPM) na germinação miceliogênica após aplicação de <i>Trichoderma harzianum</i>	15
TABELA 4	Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200L ha ⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de <i>Trichoderma asperellum</i>	16
TABELA 5	Números de escleródios podres (EP) na germinação carpogênica após aplicação de <i>Trichoderma asperellum</i>	17
TABELA 6	Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200 L ha ⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de <i>Bacillus subtilis</i>	18
TABELA 7	Números de escleródios podres (EPM) na germinação miceliogênica após aplicação de <i>Bacillus subtilis</i>	18
TABELA 8	Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200L ha ⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de <i>Trichoderma harzianum</i>	20
TABELA 9	Números de escleródios podres (EPM) na germinação miceliogênica após aplicação de <i>Trichoderma harzianum</i>	20
TABELA 10	Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200L ha ⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de <i>Trichoderma asperellum</i>	21

TABELA 11	Números de escleródios germinados (NG), número de apotécios (NA) e escleródios podres (EP), em função da época de aplicação de <i>Trichoderma asperellum</i>	22
TABELA 12	Números de escleródios germinados (NG), número de apotécios (NA) e escleródios podres (EP), em função da presença ou não de palha sobre o solo, após a aplicação de <i>Trichoderma asperellum</i>	23
TABELA 13	Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200 L ha ⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de <i>Bacillus subtilis</i>	24
TABELA 14	Números de escleródios podres (EP) na germinação carpogênica, em interação fator volume de aplicação e fator palha, após aplicação de <i>Bacillus subtilis</i>	24

RESUMO

CAMPOS, B. A. Ms., UniRV - Universidade de Rio Verde, novembro de 2019. **Métodos para avaliação de eficácia dos agentes de biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* sob condições de campo.** Orientador: Prof. Dr. Hercules Diniz Campos, Co-orientadora: Dra. Lilianne Martins Ribeiro

O mofo branco da soja, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, pode promover até 70% de danos na cultura, em condições edafoclimáticas do Brasil. Para o controle da doença utiliza-se o manejo integrado, visando a redução do inóculo, da incidência e da taxa de progresso. Entre as medidas de controle empregadas no manejo, a utilização de agentes de biocontrole, têm sido promissores na redução da viabilidade dos escleródios do patógeno no solo, pois em condições controladas esses agentes já se mostraram eficientes e de grande importância para o manejo. Porém, em campo, sabe-se que esse controle pode ocorrer, mais ainda são escassos os trabalhos que evidenciam, de fato, um controle efetivo, provavelmente devido a necessidade de metodologias adequadas para validar essa ação antagonista. Assim, este trabalho visou estudar metodologias para validar eficácia de agentes de biocontrole do mofo branco na cultura da soja, sob condições de campo. O experimento foi conduzido no delineamento experimental de blocos ao acaso, no esquema fatorial $(2 \times 2 \times 2) + 2$, com quatro repetições. Foram utilizados três produtos comerciais a base de *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* e *Bacillus subtilis*. Os fatores foram constituídos por duas épocas de aplicação, a primeira com duas pulverizações (no estágio fenológico V2 e V4) e uma pulverização (no estágio V4), além de dois volumes de calda de pulverização (60 e 200 L ha⁻¹) e o fator palha (ausência e presença) e duas testemunhas adicionais (ausência e presença de palha e sem pulverização). As variáveis analisadas foram: testes de germinação miceliogênica, germinação carpogênica, escleródios podres e escleródios parasitados por *Trichoderma*. Maior percentual de escleródios podres por *T. harzianum*, *T. asperellum* ou *B. subtilis* foi observado quando se utilizou volume de aplicação de 200 L ha⁻¹. Quando se utilizou menor volume de aplicação, 60 L ha⁻¹, o melhor efeito na inviabilização de escleródios ocorreu com a presença de palha sobre o solo. A aplicação única em V4, de modo geral, apresentou tendências, para maior inviabilidade de escleródios, com os antagonistas utilizados. A presença de palhada, de modo geral, incrementou o percentual de escleródios podres com a utilização dos antagonistas.

Palavras-chave: Controle biológico, escleródios, mofo-branco.

ABSTRACT

CAMPOS, B. A. Ms., UniRV - University of Rio Verde, November 2019. **Methods for evaluating the effectiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* biocontrol agents under field conditions.** Advisor: Prof. Dr. Hercules Diniz Campos, Co-advisor: Dra. Lilianne Martins Ribeiro.

White soybean mold, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, can promote up to 70% of damage to the crop under Brazilian edaphoclimatic conditions. For the control of the disease, integrated management is used, aiming to reduce the inoculum, incidence and rate of progress. Among the control measures employed in the management, the use of biocontrol agents, have been promising in reducing the viability of sclerotia of the pathogen in the soil, because under controlled conditions these agents have already shown to be efficient and of great importance for management. However, in the field, it is known that this control can occur, but there are still few studies that show, in fact, an effective control, probably due to the need for adequate methodologies to validate this antagonistic action. Thus, this work aimed to study methodologies to validate the effectiveness of white mold biocontrol agents in soybean culture, under field conditions. The experiment was carried out in a randomized block design, in a factorial scheme (2x2x2) +2, with four replications. Three commercial products based on *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* and *Bacillus subtilis* were used. The factors consisted of two application times, the first with two sprays (in the phenological stage V2 and V4) and one spray (in the V4 stage), in addition to two spray spray volumes (60 and 200 L ha⁻¹) and the straw factor (absence and presence) and two additional witnesses (absence and presence of straw and without spraying). The variables analyzed were: mycelial germination tests, carpogenic germination, rotten sclerotia and sclerotia parasitized by *Trichoderma*. A higher percentage of rotten sclerotia by *T. harzianum*, *T. asperellum* or *B. subtilis* was observed when an application volume of 200 L ha⁻¹ was used. When less application volume was used, 60 L ha⁻¹, the best effect on the sclerotia infeasibility occurred with the presence of straw on the soil. The single application in V4, in general, showed trends towards greater sclerotia infeasibility with the antagonists used. The presence of straw, in general, increased the percentage of rotten sclerotia with the use of antagonists.

Keywords: Biological control, sclerotia, white mold.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill) representa grande importância social e econômica no mundo. No Brasil, é uma das principais culturas da safra de verão, com quase 36 milhões de hectares na safra 18/19 (CONAB, 2019). Porém, as doenças limitam os altos rendimentos e a lucratividade, pois promovem variações da produtividade de uma safra para outra.

Dentre as doenças, o mofo-branco apresenta importância em função de sua severidade e perdas provocadas. A doença é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que tem como hospedeiros mais de 400 espécies vegetais, destacando-se; a soja, feijão, algodão, tomate, girassol, batata, canola, fumo, porém ainda não observada em gramíneas como milho, sorgo e braquiária (DEMANT, 2010).

O mofo-branco manifesta-se com maior severidade em áreas acima de 600 metros de altitude, sob condições de alta umidade e temperaturas variando entre 10°C e 21°C (CAMPOS et al., 2010). Sua propagação se dá principalmente por sementes infectadas. O patógeno sobrevive no solo, por um período indefinido, por meio de estruturas de sobrevivência (escleródios), cuja população aumenta a cada plantio de espécie hospedeira. Como não há cultivares resistentes ao mofo-branco, o manejo da doença se torna bastante difícil, e assim, a doença tem se alastrado nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país. (GORGEN et al., 2008).

É praticamente impossível se erradicar *S. sclerotiorum* das áreas afetadas. Mesmo assim, diversas práticas culturais estão disponíveis para comporem o manejo integrado da doença, e permitem a recuperação da produtividade das culturas, reduzindo a sua importância.

Com a pressão para reduzir o uso de produtos químicos, muitos produtores e pesquisadores estão buscando práticas alternativas de controle. Com isso, inúmeros estudos envolvendo estratégias de controle biológico no manejo de mofo branco são executados, utilizando fungos micoparasíticos com habilidade para degradar hifas e escleródios.

Atualmente, os mais usados pertencem ao gênero *Trichoderma* e são amplamente utilizados a campo, devido aos seus diversos modos de ação, incluindo competição por nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas e produção de metabólitos voláteis e não voláteis (PINTO DA SILVA, 2013). Além do *Trichoderma*, os microrganismos *Bacillus* spp., *Coniothyrium minitans*, *Ulocladium atrum* e *Clonostachys rósea* são eficientes no controle do *Sclerotinia sclerotiorum*.

Embora nos últimos anos a disponibilidade de produtos comerciais à base de *Trichoderma* tenha crescido no Brasil, alguns problemas como; a falta de produtos registrados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a carência de informações sobre esses agentes tem dificultado o crescimento deste novo e promissor mercado (LUCON et al., 2014).

Neste contexto o presente estudo teve como objetivo avaliar a melhor forma para quantificar a eficácia dos agentes de biocontrole na degradação de escleródios de *S. sclerotiorum* no solo, sob cultivo de soja em sistema de semeadura direta sobre palha. Tendo como objetivos específicos:

- Avaliar a melhor forma de exposição de escleródios sobre o solo para o parasitismo e degradação dos mesmos, por agentes de biocontrole;
- Avaliar o número de aplicação e doses de produtos com agentes de biocontrole para melhor infestação dos escleródios de *S. sclerotiorum* no solo;
- Avaliar o melhor volume de aplicação de produtos, com agentes de biocontrole para melhor infestação dos escleródios de *S. sclerotiorum* no solo;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mofo branco na cultura da soja: danos e perdas

As epidemias de mofo branco, causadas por *Sclerotinia sclerotiorum*, estão distribuídas em diversas regiões produtoras do Brasil, tendo a sua incidência aumentada na soja a partir da década de 90 (LEMES et al., 2015).

A doença na cultura da soja só foi constatada no Brasil em 1975, no Estado do Paraná, causando perdas de até 70% em lavouras destinadas a produção de sementes (FERREIRA et al., 1981). Na safra de 2007/2008, o mofo branco foi à doença com maior destaque, principalmente no Estado de Minas Gerais, devido a sua alta incidência nas áreas acima de 900 m (ZANETTI, 2009). Nas regiões sudoeste, leste de Goiás e entorno de Distrito Federal, as perdas na produtividade foram de até 60%. Na safra 2008/2009 verificou-se a presença do fungo e da doença, em mais de 45% das áreas cultivadas, com soja no Estado de Goiás, não significando que toda área apresentava perda significativa com a doença, mas motivo de alerta,

para as safras subsequentes (SILVA et al., 2010). Estima-se a presença do fungo em mais de seis milhões de hectares de soja, no Brasil (JULIATTI & JULIATTI, 2010).

Em áreas de sequeiro a doença é esporádica, ocorrendo em pequenas reboleiras, não causando perdas significativas às culturas. Contudo, vem tendo grande importância devido aos vários fatores; como a utilização de sementes contaminadas e/ou infectadas, safras contínuas com o monocultivo e a sucessão de culturas, com espécies suscetíveis ou hospedeiras, além de temperaturas noturnas amenas (abaixo de 18 °C), chuvas prolongadas durante o cultivo, excessivo de adubações nitrogenadas e irrigação sem controle da quantidade de água fornecida (SILVA et al., 2010).

O patógeno alastrou-se de maneira rápida e eficiente pelas sementes de soja infectadas, por meio do micélio dormente, ou quando contaminadas, pela presença de escleródios associados, estabelecendo-se nas áreas irrigadas, por pivô central, o que possibilitou a sua vasta distribuição e multiplicação. Outro meio relevante da disseminação entre as lavouras foram os implementos e máquinas carregando os propágulos do fungo, também responsáveis, por introduzi-lo em locais antes isentos do problema (LEMES et al., 2015).

Epidemias relacionadas a *S. sclerotiorum* são favorecidas por temperaturas moderadas (18-23 °C) e em condições de umidade, deste modo é mais frequente em locais de clima temperado ou em regiões subtropicais ou ainda, em regiões tropicais de altitude elevada (LOBO JUNIOR, 2010). Com isso, a doença torna-se de difícil controle, atacando as plantas em todos os estágios de desenvolvimento, porém, as infecções iniciam-se com mais frequência a partir das inflorescências, das axilas das folhas e dos ramos laterais (DILDEY et al, 2014). A fase mais vulnerável na cultura da soja vai da floração plena (R2) ao início da formação de vagens e enchimento dos grãos (R3/R4) (GRIGOLLI, 2015).

O mais importante é que se evite a entrada do patógeno na lavoura, pois, uma vez presente nos campos de cultivo, torna-se praticamente impossível erradicá-lo. No entanto, a adoção de métodos de controle de forma integrada permite a manutenção do inóculo em níveis baixos e o convívio com a doença no campo. Além de várias práticas culturais que colaboram para a diminuição do inóculo do patógeno no solo e da doença no campo, as pesquisas com métodos alternativos de controle têm se intensificado, particularmente, em relação à aplicação de agentes de controle biológico (SOUZA FILHO, 2012).

2.2 Mofo branco: taxonomia e aspectos biológicos

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, também conhecido como podridão branca da haste ou podridão de esclerotínia, é um fungo habitante do solo, polífago, cosmopolita, necrotrófico, está entre os mais sucedidos fitopatógenos. É um patógeno destruidor, que possui mais de 408 espécies, 278 gêneros e 75 famílias de plantas hospedeiras (CIVARDI, 2014).

O fungo, pertencem ao Filo *Ascomycota*, Classe *Discomycetes*, Ordem *Helotiales* e família *Sclerotiniaceae* (PAULA JÚNIOR et al., 2004). Foi descrito pela primeira vez por Bary, em 1884 (PURDY, 1979), contudo, o primeiro registro de ocorrência deste patógeno no Brasil foi feito em 1921, na cultura da batata (*Solanum tuberosum*), no estado de São Paulo (CHAVES, 1964). Já na lavoura de soja, este fungo foi observado, pela primeira vez em 1975, no sul do estado do Paraná (FERREIRA et al., 1981).

As infecções nas plantas de soja, inicialmente, apresentam lesões aquosas, desenvolvendo as hifas, formando o abundante micélio (BOLTON et al., 2006). Com o progresso da colonização do tecido vegetal pelo fungo, as lesões inicialmente encharcadas tornam-se secas, de aspecto descolorido e normalmente esbranquiçadas. Todo tecido vegetal, epiderme, tecido parenquimatoso e feixes vasculares são colonizados pelo patógeno (GRIGOLLI, 2015).

Os escleródios são formados a partir do emaranhado de hifas que se aglomeram e formam estruturas firmes e densas, geralmente arredondadas ou alongadas, produzidos tanto externa quanto internamente nas hastes das plantas afetadas (GÖRGEN et al., 2010; GRAU & HARTMAN, 2015).

O escleródio é formado por três camadas diferentes: uma parede grossa rica em melanina, responsável pela coloração negra dos escleródios, uma parede fina (córtex) e a medula branca (micélio dormente do fungo). A melanina tem a função de conferir resistência aos escleródios as condições adversas do solo fazendo com que esses permaneçam viáveis por vários anos, mesmo na ausência de plantas hospedeiras (ROCHA, 2007).

Sob condições favoráveis de temperatura e umidade do solo, a germinação dos escleródios pode ocorrer de duas formas: germinação miceliogênica e germinação carpogênica. A germinação miceliogênica é caracterizada pelo desenvolvimento de hifas hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas, com origem a partir de microporos do escleródio. A germinação carpogênica é caracterizada pela formação de apotécios, que são estruturas de cor branca ou bege, em forma de corneta, em cujas extremidades (himênios) se

formam os ascósporos, principais responsáveis pela infecção nas plantas de soja (BOLTON et al. 2006).

Segundo Clarkson et al. (2003), a melhor condição no solo para o desenvolvimento dos apotécios ocorre quando, por um período de 10 a 14 dias, a umidade for inferior que 50% da capacidade de campo e a temperatura entre 15°C e 17,8°C. Todavia, apotécios podem ser formados em solos com temperaturas entre 4,4°C a 30°C, o que significa que se a umidade for suficiente, eles podem ser produzidos ao longo de todo o período vegetativo e reprodutivo da cultura.

A infecção da planta pode acontecer por meio do micélio ou ascósporos, ou seja, os escleródios germinam, produzindo apotécios que irão liberar os ascósporos. Cada escleródio pode produzir de 1 a mais de 20 apotécios. Cada apotécio pode liberar mais de 2 milhões de ascósporos, durante um período de 5 a 10 dias. Esses aspectos demonstram o seu grande poder reprodutivo e o perigo do aumento do inóculo, podendo, assim, infestar várias áreas de produção (PRIA; SILVA, 2010).

Ainda não existem cultivares de soja resistentes a *S. sclerotiorum*, e o controle químico do mofo-branco pode ser inviável em razão dos custos e das dificuldades de se obter uma cobertura total da planta durante a pulverização.

2.3 Controle biológico

O controle biológico pode ser definido como a “redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença por um ou mais organismos, feito naturalmente ou por meio da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução massal de um ou mais antagonistas” (COOK; BAKER, 1983).

O controle biológico de doenças causadas por patógeno é complexo, pois a supressão de doenças de plantas baseia-se não só por sua capacidade de intervir na relação patógeno-hospedeiro, mas também, por interferir na comunidade antagonista, na microflora adjacente aos locais de infecção e na sua interação com todo o ecossistema (SAITO et al, 2009).

Devido à dificuldade no manejo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, especialmente, à formação dos escleródios que garantem a sobrevivência do patógeno por muito tempo no solo, da pressão em diminuir o uso de produtos químicos e do aparecimento de populações resistentes a fungicidas, o controle biológico tornou-se uma alternativa para o controle do mofo-branco, tornando o controle mais estável e sustentável (FRAVEL, 2005).

Conforme Görge et al (2009), entre as recomendações para manejo do mofo-branco, podemos ressaltar algumas práticas como o controle cultural com formação da palhada para o sistema de plantio direto (SPD) e o controle biológico com antagonistas. O controle cultural pela cobertura do solo com palhada pode impedir a formação de apotécio. Já o controle biológico com aplicação de *Trichoderma* spp. pode reduzir significativamente, o número de escleródios viáveis.

Na cultura da soja o controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* chega como uma alternativa diante dos problemas dos métodos tradicionais de controle da doença, visto que, para este fitopatógeno, o uso da rotação de cultura enfrenta dificuldades devido ao longo período de sobrevivência dos escleródios no solo, a dificuldade de resistência genética da soja ao fungo em função de ser uma característica governada por muitos genes e a preocupação com o resíduo de produtos químicos pelo uso excessivo de fungicidas (BARDIN; HUANG, 2001).

Segundo Agrios (2005), os conceitos dos mecanismos do biocontrole baseiam-se em relações antagônicas como: competição, predação, parasitismo, resistência induzida ou pela produção de metabólitos que inibem o desenvolvimento do outro. O parasitismo está entre os mecanismos mais eficientes de antagonismo no controle biológico, em razão de que os hiperparasitas dependem de seus hospedeiros para sobrevivência e estão sujeitas as mesmas variações ambientais (SILVA et al., 2011).

No caso do mofo branco, espécies de fungos e bactérias têm sido citados como eficazes no biocontrole. Entre as espécies de fungos mais comuns, encontram-se *Trichoderma*, *Coniothyrium* e *Gliocladium* (BETIOL et al., 2008; ETHUR et al., 2014). Porém, as espécies *Trichoderma harzianum* e *T. asperellum* tem sido as mais utilizadas para o controle de *S. sclerotiorum* em soja (MEYER et al., 2016). Quanto às bactérias, espécies do gênero *Bacillus*, têm recebido muito atenção (MEYER et al., 2016), especialmente as espécies *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefacies* que demonstraram resultados significativos, na inibição de hifas de *S. sclerotiorum* (BETTIOL et al., 2012).

O momento ideal para aplicação desses agentes de biocontrole provavelmente seria no período em que os escleródios se encontram em repouso, na superfície do solo, com pouca mobilidade ou no estágio de germinação, ou seja, no estágio de sobrevivência do fungo, em que o patógeno encontra-se mais vulnerável, ao ataque de microrganismos (BRAGA, 2013).

O sucesso do controle biológico de patógenos do solo depende da habilidade dos agentes de biocontrole se desenvolverem e se dispersarem no solo, sementes ou outras partes

da planta, bem como, habilidade competitiva e/ou do micoparasitismo (HANDELSMAN & STABB, 1996).

2.3.1 *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* constitui o grupo de agentes de biocontrole de fitopatógenos mais estudado no mundo. (LOPES et al., 2012). É um fungo natural do solo, encontrado especialmente, em solos orgânicos, que pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos, estando entre os fungos mais comuns presentes na natureza, sendo encontrado em diversos ecossistemas (MELO, 1998).

O fungo pertence a classe *Hyphomycetes*, ordem *Hyphomycetales*, família *Moniliaceae*, produzindo diversos conídios, a partir de células conidiogênicas, formando estruturas chamadas de conidióforos, emergindo diretamente das hifas. (POLETTTO, 2010).

Esta atividade de biocontrole pelo *Trichoderma* tem sido intensamente estudada e deve-se, sobretudo à produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos (CORABI-ADELL et al., 2002). Sua eficiência de sobreviver em várias regiões pode ser atribuída à diversidade de metabólitos produzidos e pela agressividade natural (LOPES et al., 2012).

Estes fungos alimentam-se de nutrientes dos fungos parasitados e de material orgânico. Necessitam de umidade para germinar, entretanto, o encharcamento não é tolerável. Sua velocidade de crescimento é acelerada, portanto é capaz de estabelecer-se no solo e controlar diversas enfermidades, patógenos de solo, principalmente, os que desenvolvem estruturas de resistência, como clamidósporos, escleródios e microescleródios (MENÉZES et al., 2007).

Trichoderma spp. possui inúmeros mecanismos de ação contra fitopatógenos que incluem: competição por espaço, oxigênio, água e nutrientes, limitando o desenvolvimento de outros microrganismos pela falta destes; excreção de compostos antibióticos (trichodermina, tricotecenos, entre outros), efeitos tóxicos indiretos devido aos compostos voláteis, que podem impossibilitar o crescimento ou a germinação de esporos do patógeno, além de demonstrarem capacidade micoparasítica (BROZÓVÁ, 2004). O micoparasitismo baseia-se na relação que um parasita obtém nutrientes direta ou indiretamente, através da invasão de outro fungo (GAO, 2005) e sua habilidade em parasitar é parcialmente determinada pelas condições químicas, físicas ou nutricionais (BENÍTEZ et al., 2006).

A aplicação do controle biológico com *Trichoderma* resulta da sobrevivência do fungo no ambiente inserido, ao sistema de cultivo utilizado, à época, dose e número de aplicações tal

como a compatibilidade, com outras práticas culturais, para que efeitos positivos sejam obtidos (SILVA et al., 2010).

Das espécies de *Trichoderma* spp., o *Trichoderma harzianum* tem elevada eficiência como antagonista. É um biorregulador e antagonista natural dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea*, entre outros. Opera como agente biológico, diminuindo ou limitando a necessidade do uso de produtos químicos, sendo considerado o mais eficiente agente bicontrolador para patógenos do solo (HARMAN, 2000).

Segundo GORGEN et al (2009) as aplicações de *T. harzianum* em palhada de *Brachiaria ruzizienses* (Sin. *Urochloa ruzizienses*) em lavouras de soja, o número de apotécios no campo reduziu-se; e com o aumento de sua concentração mais escleródios foram colonizados. Quando os escleródios estão agregados no solo, a eficiência dessa espécie no controle é mais eficaz (BAE & KNUDSEN, 2007).

2.3.2 *Bacillus*

Um dos gêneros de rizobactérias de maior importância com poder antagonista é o *Bacillus* spp., destacando por produzir endósporo resistentes a condições adversas e por apresentar uma diversidade de mecanismos antagônicos, proporcionando dessa forma, a sua sobrevivência em nichos ecológicos específicos e sua longa manutenção, com grande variabilidade nos mecanismos de ação e inibir as defesas dos fitopatógenos. (LANNA FILHO et al, 2010).

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias em forma de bastonete, móveis e com formação de endósporo altamente resistente ao calor. O endósporo se define em uma estrutura que propicia a sua sobrevivência em diferentes situações, além de proporcionar que as bactérias driblem as defesas dos fitopatógenos. O endósporo é altamente resistente a agressões exógenas, podendo sobreviver intacto por um longo período (LANNA FILHO et al, 2010).

Katz e Demain (1977), estabeleceram que membros do gênero *Bacillus* produzem cerca de 167 antibióticos, principalmente polipeptídios. Desse total, 66 são elaborados por isolados de *B. subtilis*. Dos metabólitos produzidos verifica-se que podem apresentar ação contra bactérias Gram positivas e negativas e fungos. Além de *B. subtilis*, outras espécies, como *B. cereus* e *B. pumilus* têm ação sobre fitopatógeno (BETTIOL, 2007).

No cenário agroecológico, populações de *B. subtilis* possuem como ambiente natural o solo, o mesmo que abriga uma complexa comunidade biológica, em que microrganismos procariotos e eucariotos compõe a maioria, tanto em número, quanto em diversidade. Esta

espécie possui uma grande capacidade como biocontrole devido aos múltiplos entre eles e a antibiose (LANNA FILHO et al, 2010).

As bactérias antagonicas, como *B. subtilis*, em geral atuam expressivamente, por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição (KUPPER et al, 2003). Os agentes de biocontrole que agem por antibiose, normalmente apresentam amplo espectro de ação, de modo que a inibição dos fungos por produção de metabólitos é mais eficaz do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido (LEELASUPHAKUL et al, 2008).

Alguns dados apontam que o *Bacillus subtilis* é capaz de produzir substâncias voláteis com ação antifúngica. Porém, ainda são desconhecidas muitas dessas substâncias voláteis, que este microrganismo produz (KAI et al. 2007).

Bettiol (1988), em trabalho de seleção de microrganismo antagonico a *Pyricularia oryzae*, verificou que *B. subtilis* foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno, e constatando também, que o antagonista apresenta boas características, para o uso como agente de controle biológico, pois, além de rápido desenvolvimento, tanto em meio de cultura, como na natureza, produzem endósporo e antibióticos, crescem em larga faixa de temperatura e adaptam-se em diferentes condições ambientais.

Existem poucos relatos na literatura sobre a eficácia de *B. subtilis* no controle de *S. sclerotiorum* em lavouras de soja. Contudo, Wutzki (2014), observou efeitos positivos do uso de bactérias antagonistas contra *S. sclerotiorum* na cultura do feijão, já Chen et al (2008) observaram o antagonismo de *B. subtilis* em *Botrytis cinerea*, em condições controlada (*in vitro*). GUPTA et al. (2000), verificaram menor incidência de murcha de *Fusarium* em tomateiro com o uso de *B. subtilis*. Diante dessa escassez de informações, tornam-se necessários estudos sobre o controle de *S. sclerotiorum* na cultura da soja, em campo, com a utilização de *B. subtilis*.

3 MATERIAL E MÉTODO

Foram realizados dois ensaios. O primeiro, ensaio de campo, foi conduzido na Fazenda Peitoral, município de Montividiu-GO, durante a safra 2018/2019. As coordenadas do local, em que experimento foi conduzido, são latitude Sul 17°24'94,2" e longitude Oeste 51°38'20,7". A altitude local é de 978 m. Na mesma área foi cultivado soja na safra de verão anterior e milho em safrinha. O segundo ensaio, sob condições parcialmente controladas, foi

conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Rio Verde, no município de Rio Verde, GO.

3.1 Produção de escleródios

O isolado 150/17 foi obtido a partir de escleródios removidos de plantio de soja, na Fazenda Peitoral, município de Montividiu-GO.

Para à obtenção do isolamento, escleródios colhidos no campo foram encaminhados para o Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Rio Verde e semeados em placas de Petri contendo Batata Dextrose Ágar (BDA) + antibiótico (0,5 ml). Após sete dias de cultivo, uma placa exibindo micélio de *S. Sclerotium* foi selecionada para subseqüentes repicagens, até chegar ao isolado purificado.

Para reprodução do inóculo, escleródios, discos de ágar (5 mm de diâmetro) retirados de culturas do isolado 150/17, com sete dias de cultivo, foram transferidos para outras placas de Petri, contendo BDA+antibiótico, conduzidos em câmara de fluxo laminar. As placas foram mantidas em sala de crescimento sob uma temperatura de 25°C e ausência de luz. Depois dos escleródios formados, sua remoção foi realizada em câmara de fluxo laminar e colocados em gerbox devidamente esterilizados, mantidos sob temperatura de 25°C e ausência de luz.

3.2 Instalação do ensaio no campo

O experimento foi conduzido no delineamento experimental de blocos ao acaso, no esquema fatorial $(2 \times 2 \times 2) + 2$, com quatro repetições. Foi utilizado três produtos comerciais a base de *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* e *Bacillus subtilis*. Os fatores foram constituídos por duas épocas de aplicação, a primeira com duas pulverizações (no estágio fenológico V2 e V4) e uma pulverização (no estágio V4), além de dois volumes de calda de pulverização (60 e 200 L ha⁻¹), o fator palha (ausência e presença) e duas testemunhas adicionais (para ausência e para presença de palha e sem pulverização) (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos com biofungicidas, épocas de aplicação, doses dos produtos comerciais e concentração de ativos, safra 2017/18

Nº	Tratamentos	Ingrediente Ativo (i.a.)	Épocas de aplicação		Dose p.c. kg ou L / ha	Conc. i.a / g p.c.	Vol. aplic. (L/ha)	Palha sobre o solo
			1ª	2ª				
1	Testemunha	-	-	-	-	-	---	---
2	Ecotrich	<i>T. harzianum</i>	V2	V4	0,1	1x(10) ¹⁰	60	Com
3	Ecotrich	<i>T. harzianum</i>		V4	0,2	1x(10) ¹⁰	60	Sem
4	Ecotrich	<i>T. harzianum</i>	V2	V4	0,1	1x(10) ¹⁰	200	Com
5	Ecotrich	<i>T. harzianum</i>		V4	0,2	1x(10) ¹⁰	200	Sem
6	Quality	<i>T. asperellum</i>	V2	V4	0,1	1x(10) ¹⁰	60	Com
7	Quality	<i>T. asperellum</i>		V4	0,2	1x(10) ¹⁰	60	Sem
8	Quality	<i>T. asperellum</i>	V2	V4	0,1	1x(10) ¹⁰	200	Com
9	Quality	<i>T. asperellum</i>		V4	0,2	1x(10) ¹⁰	200	Sem
10	Biobac	<i>Bacillus subtilis</i> Y1336	V2	V4	2,0	1x(10) ⁹	60	Com
11	Biobac	<i>Bacillus subtilis</i> Y1336		V4	4,0	1x(10) ⁹	60	Sem
12	Biobac	<i>Bacillus subtilis</i> Y1336	V2	V4	2,0	1x(10) ⁹	200	Com
13	Biobac	<i>Bacillus subtilis</i> Y1336		V4	4,0	1x(10) ⁹	200	Sem

p.c. = produto comercial; Conc. = concentração; Vol. aplic. = volume de aplicação.

A semeadura da soja foi realizada no início de novembro, utilizando a cultivar TMG 2182IPRO. Foram consideradas como parcela útil as quatro linhas centrais com 5 m, compondo 10 m². Os tratamentos foram aplicados em dias nublados ou chuvosos, ou no final da tarde. As pulverizações foram realizadas com pulverizadores pressurizados com CO₂, barras com 6 bicos (ponta) calibrados para vazão de 60 (TXA800050VK, cone vazio) e 200 L ha⁻¹ (TTJ60-11002, leque duplo).

O efeito dos tratamentos sobre a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* foi avaliado em laboratório.

Amostras contendo 50 escleródios foram colocadas em sacos de tela de náilon com malha de 1,5 mm e dispostas em bandejas com palhada e sem palhada (utilizadas para germinação de sementes, de 25 cm X 40 cm), contendo solo de barranco, e os sacos de náilon também foram colocadas diretamente ao solo. As mesmas foram distribuídas na parcela, e acomodando-as de forma que metade de sua altura ficasse abaixo da superfície do solo. Em seguida, cada bandeja recebeu uma cobertura uniforme de palhada em sua superfície conforme.

As aplicações do produto biológico foram realizadas em duas situações sendo:

1^a – recebeu duas aplicações, sendo a primeira em V2 e uma segunda em V4, em doses fracionadas recomendadas.

2^a – recebeu apenas uma aplicação em V4, em dose única recomendada.

As amostras de escleródios foram recolhidas 20 dias, após a última aplicação, quando os escleródios foram acondicionados em sacos de papel resistentes, devidamente identificados, e foram transportados em caixas de papelão e direcionados para análises imediatas em laboratório, onde foram realizados os testes de germinação carpogênica, quantificando o número de escleródios germinados, número de apotécios por escleródios, escleródios colonizados por *Trichoderma* spp., escleródios degradados ou podres e percentual de escleródios inviáveis.

Para as avaliações da colonização por *Trichoderma* spp. e de escleródios inviáveis, foram utilizados 7 escleródios por amostra (28 escleródios por tratamento), transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA modificado, para uma concentração reduzida em 1/3 dos ingredientes batata e dextrose, acidificado com ácido láctico para pH=4,0 (BDA pobre acidificado). Ao meio fundente foram adicionados 250 µL de dispersante Triton© e 0,2 g de antibiótico oxitetraciclina. O período de incubação foi de cinco dias em câmara B.O.D. a 25°C e ausência de luz, conforme proposto por MEYER et al. (2016).

Para a avaliação de germinação carpogênica, os escleródios foram acondicionados em caixas gerbox contendo aproximadamente 200 g de solo de barranco autoclavado, umedecido até atingir 80% da capacidade de campo. Em cada gerbox foram acondicionados 25 escleródios, sendo utilizados dois gerbox para cada amostra de 50 escleródios. Em seguida os gerbox contendo os escleródios foram incubados à temperatura de 18°C (±2°C) e fotoperíodo contínuo por 25 dias (MEYER et al, 2016).

3.3 Instalação do ensaio sob condições controladas em laboratório

Os escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* usados neste ensaio foram produzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Rio Verde, conforme citado anteriormente.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x2x2)+2, com quatro repetições. Foram utilizados três produtos comerciais a base de *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* e *Bacillus subtilis* (Tabela 1). Os fatores foram constituídos por duas épocas de aplicação, a primeira, com duas pulverizações (no estágio fenológico V2 e V4) e uma pulverização (no estágio V4), além de dois volumes de calda de

pulverização (60 e 200 L ha⁻¹) e o fator palha (ausência e presença) e duas testemunhas adicionais (ausência e presença de palha e sem pulverização) (Tabela 1). As aplicações foram feitas por um pulverizador manual.

O efeito dos tratamentos sobre a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* foi avaliado em laboratório.

Semelhantemente ao ensaio em campo, amostras contendo 50 escleródios foram colocadas em sacos de tela de náilon com malha de 1,5 mm e acondicionados na superfície do solo autoclavado contido em bandejas de alumínio. Em seguida cada bandeja recebeu uma cobertura uniforme de palhada (feno de braquiária) em sua superfície.

As aplicações do produto biológico foram realizadas em duas situações sendo:

1^a – recebeu duas aplicações, sendo a primeira no dia da montagem do ensaio e a segunda 10 dias, após a primeira aplicação, em doses fracionadas recomendadas.

2^a – recebeu apenas uma aplicação, em dose única recomendada.

As aplicações foram realizadas com pulverizador manual. Posteriormente a cada aplicação, as bandejas foram revertidas com sacos plásticos, conservando a umidade do solo. Após a última aplicação, as amostras foram mantidas na sala de crescimento por 20 dias com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas/luz.

As amostras de escleródios foram recolhidas aos 20 dias após a última aplicação, quando os escleródios foram acondicionados em sacos de papel resistentes e devidamente identificados. Após a identificação foram realizados os testes de germinação carpopogênica, quantificando o número de escleródios germinados, número de apotécios por escleródios, escleródios colonizados por *Trichoderma* spp., escleródios degradados ou podres, percentual de escleródios inviáveis e níveis de controle, conforme já citado no item 3.2.

3.4 Análise estatística

Foram aplicados os testes de Shapiro Wilk e Bartlett para verificar a normalidade e a homogeneidade das variâncias residuais, respectivamente. Realizou-se análise de variância para o esquema fatorial, com adicional, sendo feito desdobramento quando a interação foi significativa. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey (P< 0,05) e aos adicionais pelo teste Dunett, com o auxílio do software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2006).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio conduzido sob condições de campo

Após a análise de variância considerando o fatorial triplo (época de aplicação, volume de aplicação e presença de palha), verificou-se que não ocorreu interação significativa em nenhuma das variáveis analisadas, contudo ao analisar os desdobrados em esquema bifatorial, verificou-se interação significativa para volume de aplicação e palha (Tabela 2). Sendo que a interação do maior volume de aplicação (200 L ha^{-1}) e sem a presença de palha sobre o solo, houve maior presença de escleródio podres ($P < 0,01$) no teste de germinação miceliogênica (Tabela 3), no entanto quando utilizou-se palha e menor volume (60 L ha^{-1}), houve aumento no número de escleródios podres. Provavelmente, o maior volume de aplicação pode distribuir o agente antagonista (*T. harzianum*) melhor sobre o escleródio na ausência de palha. Com o menor volume de aplicação associado a presença de palha, pode proporcionar ambiente favorável a propagação do antagonista, *T. harzianum*, favorecendo a infestação dos escleródios. Os resultados obtidos (Tabela 3) apresentaram aumento de 11,5% na quantidade de escleródios podres ao utilizar volume de 200 L ha^{-1} em parcelas sem palha. Quando se aplicou 60 L ha^{-1} em parcelas com palha houve um aumento de 7,92% na quantidade de escleródios podres (Tabela 3).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200L ha⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de *Trichoderma harzianum*

FV	GL	F calculado					
		NG	NA	ET	EP	ETM	EPM
Época (E)	1	0,03	0,96	1,24	1,72	0,25	0,44
Volume (V)	1	0,70	2,12	2,11	2,33	0,66	0,09
Palha (P)	1	0,02	0,24	6,24*	0,94	1,10	6,06*
E x V	1	0,01	0,34	0,90	0,58	0,10	0,33
E x P	1	0,61	0,01	0,84	0,04	0,06	0,61
V x P	1	0,05	2,39	1,57	2,30	1,20	13,42**
E x V x P	1	0,20	0,02	0,57	1,35	0,01	0,01
ADC	1	0,44	0,13	1,06	0,56	12,38	6,62*
Fat vs ADC	1	0,95	0,34	0,04	0,17	1,20	0,11
Erro	27						
CV (%)		22,80	36,16	86,28	85,47	32,62	63,24
Total	39						

** , * significativo a 1% e 5%, respectivamente, de probabilidade pelo Teste F.

Obs.: NG- número de escleródios germinados carpogênicamente; NA- número de apotécios por escleródio; ET- escleródios com *Trichoderma* na germinação carpogênica; EP- escleródios podres na germinação carpogênica; ETM- escleródios com *Trichoderma* na germinação miceliogênica e EPM- escleródios podres na germinação miceliogênica.

Tabela 3. Números de escleródios podres (EPM) na germinação miceliogênica após aplicação de *Trichoderma harzianum*

Volume (L ha ⁻¹)	EPM (fator Palha)	
	Com palha	Sem palha
60	7,92 aA	5,08 bA
200	0,00 bB	16,58 aA

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Porém, estudos realizados por Gørgen et al (2008) evidenciam que a semeadura de braquiária aumentou a eficiência do controle biológico. Os resultados dos autores mostraram que os escleródios recuperados, em análises no laboratório mostraram que aproximadamente 97% dos escleródios obtidos na camada de 0 a 5 cm superficiais estavam colonizados por *Trichoderma* spp. Os autores observaram também, que solo sombreado e úmido proporcionado pela braquiária em crescimento gerou condições favoráveis para que mais de 80% dos escleródios recolhidos em parcelas com braquiária estivessem mortos e parasitados por vários fungos diferentes. No presente trabalho, essa proporção, foi proporcionalmente o dobro de escleródios parasitados em solo sem cobertura.

Outros trabalhos, Gørgen et al. (2007), verificaram 100% de parasitismo por *Trichoderma harzianum* sob condições de palhada de braquiária, e morte de 70 a 100%

escleródios. Em solo com ausência de palhada, houve no máximo 75% de parasitismo e de 0-45% de morte de escleródios.

A maior eficiência de doses intermediárias (800 e 1000 mL/ha) de *T. harzianum* no controle de patógenos do solo também foi relatada por Lobo Junior (2005), com perda da eficiência em doses mais altas (2000 mL/ha). Isso possivelmente decorre da inibição da atividade de *T. harzianum*, causada por superpopulação. Essa interação está abrindo novas possibilidades para o manejo do mofo-branco, mesmo em áreas altamente infestadas. Com esse método, são obtidas condições para que ocorra uma “epidemia” de um agente de controle biológico e uma redução do inóculo inicial de *S. sclerotiorum* (GÖRGEN et al., 2008).

Ao analisar a viabilidade de escleródios com a aplicação de *T. asperellum* (Tabela 4) verificou que a interação tripla (época de aplicação, volume de aplicação e presença de palha) não revelou efeito significativo. Para a bifatorial já verificou-se a significância para época de aplicação versus volume de aplicação.

Tabela 4. Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200L ha⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de *Trichoderma asperellum*

FV	GL	F calculado					
		NG	NA	ET	EP	ETM	EPM
Época (E)	1	0,47	0,01	0,02	0,34	1,99	2,04
Volume (V)	1	0,17	1,99	0,79	1,27	0,02	0,36
Palha (P)	1	0,08	0,33	0,79	0,14	0,07	2,27
E x V	1	0,08	0,39	1,22	4,96*	1,02	0,18
E x P	1	1,35	0,53	1,84	0,53	0,28	0,11
V x P	1	0,07	0,46	0,12	0,31	0,35	0,69
E x V x P	1	0,79	0,75	0,02	0,31	2,78	0,03
Adc	1	0,99	0,36	0,30	0,07	8,35**	4,00
Fat vs Adc	1	1,41	0,34	0,20	1,21	1,15	0,11
Erro	27						
CV (%)		18,49	35,74	48,29	38,58	35,38	71,12
Total	39						

**, * significativo a 1% e 5%, respectivamente, de probabilidade pelo Teste F.

Obs.: NG- número de escleródios germinados carpogênicamente; NA- número de apotécios por escleródio; ET- escleródios com *Trichoderma* na germinação carpogênica; EP- escleródios podres na germinação carpogênica; ETM- escleródios com *Trichoderma* na germinação miceliogênica e EPM- escleródios podres na germinação miceliogênica.

Assim, verificou-se que as parcelas que receberam apenas uma aplicação em V4 com volume de 200 L/há apresentaram maior quantidade de escleródios podres, em relação aos tratamentos com o volume de 60 L ha⁻¹ (Tabela 5). Quando receberam duas aplicações, V2 e V4, nos volumes de aplicação de 60 ou 200 L ha⁻¹, não foi verificado diferença significativa

para as variáveis avaliadas. Em relação a época de aplicação, tanto em parcelas que recebeu duas aplicações (V2 e V4) do *T. asperellum*, assim como a que recebeu apenas uma aplicação em V4 (em única dose) não apresentou diferença significativa para ambos os volumes de aplicação.

Dados similares foram observados por Meyer et al (2016a), em que, nas análises de mortalidade de escleródios, quando houve apenas uma aplicação dos produtos, somente os tratamentos com *T. asperellum* e lignosulfonato foram superiores à testemunha, com percentuais de 7,1% e 9,3%, respectivamente. Nas avaliações com duas aplicações dos bioprodutos, as maiores mortalidades de escleródios foram observadas nos tratamentos com *T. asperellum*, *T. harzianum* e *B. pumilus*, superando a testemunha com percentuais que variaram de 7,1% a 8,8%. Os mesmos autores também observaram em outro trabalho que o *T. asperellum* proporcionou os maiores percentuais de escleródios inviáveis para uma e duas aplicações, com 90% e 65%, respectivamente, semelhante ao tratamento lignosulfonato, com 83% de escleródios inviáveis apenas para uma aplicação.

Meyer et al. (2016b), observaram que, em duas aplicações, o *T. asperellum* apresentou dados similares de mortalidade de escleródios (13,3%) com os tratamentos de *T. harzianum* (21,1%), porém não diferiram da testemunha (8,6%). Já para redução da germinação carpogênica, o *T. asperellum* apresentou percentuais de redução variando de 67% a 94%.

Tabela 5. Números de escleródios podres (EP) na germinação carpogênica após aplicação de *Trichoderma asperellum*

Época de aplicação	EP (Volume de aplicação em L ha ⁻¹)	
	60	200
V2 e V4	0,75 aA	0,25 aA
V4	0,00 aB	2,00 aA

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Ao analisar o efeito da aplicação de *B. subtilis* (Tabela 6) de acordo com os fatores estudados e em relação as variáveis avaliadas também para *Trichoderma* spp., verificou-se que não ocorreu interação tripla significativa, em nenhuma das variáveis analisadas, assim os dados foram desdobrados em esquema bifatorial, quando se verificou interação significativa para volume de aplicação versus palha, bem como significância para o fator palha de forma isolada.

Tabela 6. Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200 L ha⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de *Bacillus subtilis*

FV	GL	F calculado					
		NG	NA	ET	EP	ETM	EPM
Época (E)	1	0,33	0,33	0,06	2,67	0,66	1,60
Volume (V)	1	0,06	0,72	0,06	2,67	0,98	0,15
Palha (P)	1	0,03	0,29	0,06	0,17	11,20**	3,21
E x V	1	0,06	0,01	0,06	1,41	0,02	0,49
E x P	1	1,56	0,63	2,76	0,01	1,01	0,78
V x P	1	0,65	1,27	0,06	0,73	0,02	11,63**
E x V x P	1	0,13	0,42	1,38	0,17	0,07	2,30
Adc	1	0,84	0,23	0,55	0,40	1,03	5,64*
Fat vs Adc	1	0,30	0,20	0,50	0,11	1,27	0,17
Erro	27						
CV (%)		44,15	15,43	31,03	104,52	42,90	58,44
Total	39						

**, * significativo a 1% e 5%, respectivamente, de probabilidade pelo Teste F.

Obs.: NG- número de escleródios germinados carpogênicamente; NA- número de apotécios por escleródio; ET- escleródios com *Trichoderma* na germinação carpogênica; EP- escleródios podres na germinação carpogênica; ETM- escleródios com *Trichoderma* na germinação miceliogênica e EPM- escleródios podres na germinação miceliogênica.

A interação significativa na interação volume de aplicação de *B. subtilis* e efeito da palha (Tabela 7), mostram que as parcelas que receberam o volume de aplicação de 200 L ha⁻¹ e com a presença de palha na superfície do solo, apresentaram o maior número de escleródios podres, ou seja, um aumento de 9% em relação ao menor volume de aplicação (60 L ha⁻¹). Contudo, na ausência de palha, o maior volume não foi efetivo, expressando o efeito de 60 L ha⁻¹ que, estatisticamente, foi significativo em relação ao maior volume de aplicação.

Entretanto, o volume de aplicação de 60 L ha⁻¹ com presença ou não de palha, não apresentou diferença significativa (Tabela 7). Onde houve aplicação de 200 L ha⁻¹, a presença de palha incrementou significativamente para o aumento da inviabilidade dos escleródios, incremento de 12,63% no percentual de escleródios podres.

Tabela 7. Números de escleródios podres (EPM) na germinação miceliogênica após aplicação de *Bacillus subtilis*

Volume (L ha ⁻¹)	EPM (fator Palha)	
	Com palha	Sem palha
60	4,12 bA	9,50 aA
200	13,88 aA	1,25 bB

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

A inibição dos patógenos pelo antagonista, normalmente pela ação parasitária ou mesmo por antibiose, está intimamente relacionada, com a adaptação do antagonista no ambiente em que o mesmo foi introduzido. Portanto, os fatores como umidade e temperatura proporcionados pelo volume de aplicação e presença de palha sobre o solo tornam-se de extrema importância para o antagonista exercer o seu papel sobre o patógeno.

Segundo Stavely et al. (1981) e Baker et al. (1985), citados por Bettiol e Ghini (1995), a ação de *B. subtilis* ocorre principalmente na germinação dos esporos e no crescimento micelial do patógeno, ou seja, na fase vegetativa do patógeno, isso devido sua ação ser na maioria das vezes por antibiose. Segundo Bettiol e Kimati (1989, 1990) o potencial inibitório de *B. subtilis* tem sido expressivo em muitos patógenos presentes no solo como *Rhizoctonia solani* e *Fusarium moniliforme*. Para *Sclerotinia sclerotiorum* os resultados obtidos de ensaios cooperativos realizados em diferentes regiões produtoras de soja, tem evidenciado grande potencial de espécies de *Bacillus* na inviabilização de escleródios no solo (MEYER et al., 2016; 2019).

4.2 Ensaio conduzido sob condições controladas em laboratório

Ao analisar os resultados obtidos do ensaio conduzido em laboratório, verificou-se que não houve interação tripla significativa, em nenhuma das variáveis analisadas, após a aplicação do antagonista *T. harzianum* (Tabela 8). Entretanto, apenas no fator volume de aplicação isoladamente, houve maior proporção de escleródios podres (EPM), durante a germinação miceliogênica.

Tabela 8. Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200L ha⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de *Trichoderma harzianum*

FV	GL	F calculado					
		NG	NA	ET	EP	ETM	EPM
Época (E)	1	0,0469	0,0434	0,3552	0,5109	2,2020	0,8797
Volume (V)	1	1,0094	1,2818	0,0828	2,3171	0,1826	6,7630*
Palha (P)	1	1,8781	0,1751	0,7543	0,3576	2,2656	1,1360
E x V	1	1,4795	0,6137	0,7420	0,0964	0,0089	0,5566
E x P	1	0,4608	0,6944	0,0178	0,2962	0,9864	1,9198
V x P	1	0,3761	1,2120	0,0570	0,0359	0,0040	0,3821
E x V x P	1	0,5857	0,0904	0,7424	0,0918	0,1573	2,3555
Fat x Ad	1	7,3655*	8,8115**	0,9180	9,8176**	3,9532	1,5123
Ad x Test	1	0,0000**	0,5810	0,1552	2,8282	0,0187	1,5285
Erro	27						
CV (%)		47,25	15,12	40,23	46,46	33,27	56,32
Total	39						

**, * significativo a 1% e 5%, respectivamente, de probabilidade pelo Teste F.

Obs.: NG- número de escleródios germinados carpogênicamente; NA- número de apotécios por escleródio; ET- escleródios com *Trichoderma* na germinação carpogênica; EP- escleródios podres na germinação carpogênica; ETM- escleródios com *Trichoderma* na germinação miceliogênica e EPM- escleródios podres na germinação miceliogênica.

Com o desdobramento e analisando a diferença significativa no fator volume de aplicação (Tabela 9), verificou-se que o volume de 200 L ha⁻¹ proporcionou incremento de 15% na quantidade de escleródios podres, em relação ao menor volume de aplicação (60 L ha⁻¹).

Tabela 9. Números de escleródios podres (EPM) na germinação miceliogênica após aplicação de *Trichoderma harzianum*

Volume (L ha ⁻¹)	EPM
60	23,43 b
200	38,68 a

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Muitas vezes a ocorrência do antagonista depende de uma melhor distribuição do inóculo, bem como umidade suficiente, para exercer o seu papel de antagonismo ou expressar um mecanismo de ação e inviabilização do escleródio de forma mais efetiva. Assim, acredita-se que a distribuição do inóculo do antagonista sobre uma área contendo escleródios e associado a umidade sobre esses escleródios pode influenciar significativamente no modo de ação e eficiência do antagonista. Segundo Morandi et al. (2007), ao analisar vários isolados de espécies de *Trichoderma* verificaram que dois isolados parasitaram mais de 80% dos escleródios e conseguiram inibir a germinação. Porém, outros quatros isolados já se

destacaram no parasitismo, mas não inibiram a germinação dos escleródios. E um isolado não foi capaz de parasitar os escleródios, porém inibiu a germinação do mesmo, o que sugere a ocorrência de outros mecanismos de ação, como a antibiose.

Em trabalho de Delgado et al. (2007), diferentes isolados de *T. harzianum* apresentaram variação no grau de inibição do patógeno, embora todos os isolados tenham sido altamente antagônicos. De acordo com Meyer et al. (2016b), o *T. harzianum* conseguiu reduzir expressivamente a viabilidade de escleródios em 20% e 21% com uma e duas aplicações, respectivamente. E duas aplicações apresentaram redução na germinação em relação a testemunha, com redução variando 43% a 68%.

Ao analisar os resultados obtidos com a aplicação de *T. asperellum*, verificou-se que não ocorreu interação tripla significativa em nenhuma das variáveis analisadas. Entretanto, as variáveis número de germinados (NG) e número de apotécios (NA) na germinação carpogênica apresentaram diferença significativa isoladas para os fatores época de aplicação, volume de aplicação e presença ou não de palha (Tabela 10).

A variável escleródios podres (EP) na germinação carpogênica apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para o fator época. E a variável escleródios podres (EPM) na germinação miceliogênica apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) para o fator palha e de $p < 0,05$ para o fator época.

Tabela 10. Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200L ha⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de *Trichoderma asperellum*

FV	GL	F calculado					
		NG	NA	ET	EP	ETM	EPM
Época (E)	1	9,5911**	5,1055*	2,2248	5,1061*	1,9358	0,0003*
Volume (V)	1	4,3770*	4,4319*	0,4095	0,5287	0,0198	3,1711
Palha (P)	1	4,3770*	5,1257*	0,5025	0,6270	1,7636	10,7651**
E x V	1	0,8233	1,0336	2,5599	1,8526	0,2240	1,7813
E x P	1	0,6438	0,4233	1,8461	0,0653	0,0338	1,0885
V x P	1	0,3509	1,1458	2,2383	0,1116	0,0000	0,1109
E x V x P	1	0,0473	0,3092	0,4794	0,4366	0,1116	0,2555
Fat x Ad	1	4,4494	4,9177*	1,1489	7,0881*	1,9845	2,1434
Ad x Test	1	0,2024	0,7449	0,1767	2,9458	0,0165	0,7955
Erro	27						
CV (%)		52,65	12,74	37,48	49,32	37,32	33,39
Total	39						

** , * significativo a 1% e 5%, respectivamente, de probabilidade pelo Teste F.

Obs.: NG- número de escleródios germinados carpogênicamente; NA- número de apotécios por escleródio; ET- escleródios com *Trichoderma* na germinação carpogênica; EP- escleródios podres na germinação carpogênica; ETM- escleródios com *Trichoderma* na germinação miceliogênica e EPM- escleródios podres na germinação miceliogênica.

As diferenças significativas para o fator época de aplicação (Tabela 11) evidenciaram que uma única aplicação em V4 do *T. asperellum* incrementou em 25% o número de escleródios germinados, em relação as duas épocas de aplicação (V2 + V4), reduzindo também, a quantidade de apotécios formados e, conseqüentemente, aumentaram em 9% a quantidade de escleródios podres.

Os resultados obtidos contrariam aqueles obtidos por Meyer et al (2016), quando os resultados das análises de germinação carpogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum* mostraram que os tratamentos contendo uma aplicação de agentes de biocontrole reduziram o número de apotécios entre 12% e 22% e com duas aplicações em doses cheias, essa redução variou de 52% a 63%.

De acordo com Castro (2017), os resultados obtidos em campo podem ser altamente influenciados pela presença de umidade sobre os escleródios fazendo com que seja beneficiado ou não por uma única ou duas aplicações do antagonista. Essa umidade antecipada pode aumentar a permeabilidade do escleródio, facilitando que os agentes de biocontrole penetrem e realizem suas ações antagônicas, neste caso, influenciando a germinação dos escleródios.

Tabela 11. Números de escleródios germinados (NG), número de apotécios (NA) e escleródios podres (EP), em função da época de aplicação de *Trichoderma asperellum*

Época de aplicação	NG	NA	EP
V2 + V4	53,75 b	0,77 b	12,68 b
V4	27,93 a	0,43 a	21,88 a

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Para os efeitos de palha também houve diferença significativa (Tabela 12). As parcelas com presença de palha reduziram em 12,45% o número de escleródios germinados, e a quantidade de apotécios formados e, conseqüentemente, incrementaram em 20,68% a quantidade de escleródios podres.

Dados similares também foram observados por Görden et al. (2010), sendo que na avaliação de escleródios germinados na superfície do solo, verificaram redução de *S. sclerotiorum* em todas as avaliações realizadas em tratamentos onde se utilizou o sistema Santa Fé. Esses autores observaram redução do número de escleródios germinados em áreas com a cultura da soja em pleno florescimento, durante janeiro de 2009 e de 2010, verificando que a palhada de braquiária consorciada ao milho, em comparação à apenas palhada de milho.

Considerando apenas a palha sobre os escleródios, que é importante para proporcionar ambiente favorável para a ação dos antagonistas no campo, a mesma (palha) também pode favorecer a germinação dos escleródios no tempo. Porém, não havendo hospedeiros, esse inóculo (ascósporos e/ou micélio) são inviabilizados, assim ocorrerá um esgotamento de reservas desses escleródios, contribuindo significativamente no manejo da doença no campo. Segundo Brandão et al. (2008), reduções significativas de presença apotécios foram observados com a implantação de braquiária por três anos em áreas infestadas com *S. sclerotiorum*. Os autores verificaram percentual de escleródios germinado em ano igual a 96%, 66,3% e 22,7% de escleródios, respectivamente nos três anos.

Tabela 12. Números de escleródios germinados (NG), número de apotécios (NA) e escleródios podres (EP), em função da presença ou não de palha sobre o solo, após a aplicação de *Trichoderma asperellum*

Palha	NG	NA	EPM
Com palha	38,55 a	0,58 a	39,56 a
Sem palha	51,00 b	0,78 b	18,88 b

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade

Ao avaliar a aplicação de *B. subtilis* nos ensaios conduzidos em laboratório, sob condições controladas, verificou-se que ocorreu interação tripla significativa, para a variável escleródios podres (EP) na germinação carpogênica (Tabela 13). Com isso, os dados foram desdobrados.

Tabela 13. Resumo da análise de variância para interação tripla [época de aplicação (V2 + V4 ou V4), volume de aplicação (60 ou 200 L ha⁻¹), palha sobre o solo (com ou sem)] na viabilidade de escleródios após a aplicação de *Bacillus subtilis*

FV	GL	F calculado					
		NG	NA	ET	EP	ETM	EPM
Época (E)	1	0,0097	0,1037	0,0254	4,6505*	1,6824	0,5296
Volume (V)	1	1,3907	1,4349	0,0713	2,2768	0,0409	0,0023
Palha (P)	1	8,2828**	5,2760*	3,1110	19,1977**	3,8697	0,2047
E x V	1	5,8988*	3,0534	0,3483	0,3261	0,3964	0,0682
E x P	1	0,4927	1,0180	0,9378	0,4846	1,7263	0,8090
V x P	1	0,0333	0,0115	3,6587	2,0516	0,0119	0,0189
E x V x P	1	1,1991	1,8059	1,2216	6,5230*	0,5222	0,0114
Fat x Ad	1	4,8841*	7,2983*	0,0030	18,3880**	0,4025	1,8529
Ad x Test	1	0,1774	1,2461	0,1922	5,9396	0,0162	0,4887
Erro	27						
CV (%)		58,70	63,27	41,46	32,90	41,42	41,41
Total	39						

** , * significativo a 1% e 5%, respectivamente, de probabilidade pelo Teste F.

Obs.: NG- número de escleródios germinados carpogênicamente; NA- número de apotécios por escleródio; ET- escleródios com *Trichoderma* na germinação carpogênica; EP- escleródios podres na germinação carpogênica; ETM- escleródios com *Trichoderma* na germinação miceliogênica e EPM- escleródios podres na germinação miceliogênica.

Houve maior número de escleródios podres (EP) quando foram realizadas duas aplicações (V2 + V4) em relação a uma única aplicação (V4), associando ao volume de aplicação de 200 L ha⁻¹ e na ausência de palha (Tabela 14). Quando foi realizada duas aplicações (V2 + V4), não foi verificado efeito significativos do volume (60 ou 200 L ha⁻¹) e presença ou não de palha.

Quando comparadas as duas épocas de aplicação, o tratamento com volume de aplicação igual a 200 L ha⁻¹, com ausência de palha também já apresentou menor número de escleródios podres. Já os demais tratamentos, volume de 60 L ha⁻¹(com e sem palha) e volume de 200 L ha⁻¹(com palha) não diferiram significativamente entre si pelo teste Tukey.

Tabela 14. Números de escleródios podres (EP) na germinação carpogênica, em interação fator volume de aplicação e fator palha, após aplicação de *Bacillus subtilis*

Época de aplicação	EP (fator Volume de aplicação x Palha)			
	60/com	60/sem	200/com	200/sem
V2 + V4	35,00 aA	13,50 aA	25,75 aA	14,25 aA
V4	19,25 aA	17,50 aA	26,00 aA	0,75 bB
Água c/p			0,00	
Água s/p			9,25	

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

*e ° diferem significativamente do controle com e sem palha, respectivamente, a 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

De acordo com Meyer et al (2016a), o tratamento com *B. subtilis* apresentou aumento de 44% a 40% no número de escleródios inviáveis de *S. sclerotiorum*, para uma e duas aplicações, respectivamente. Dados similares também foram observados pelo mesmo autor para *Bacillus pumilus*, em que proporcionou aumento na mortalidade de escleródios de 35% a 44%, quando houve uma e duas aplicações do agente de biocontrole, respectivamente.

Meyer et al. (2016b), observou que duas aplicações (V2 e V4) de *B. subtilis* promoveram o maior índice de mortalidade de escleródios (22%). Para redução da germinação carpogênica em relação a testemunha, apresentaram redução variando de 79% a 100% para *B. subtilis* e *B. pumilus*, respectivamente.

Uma aplicação tende a ser menos eficaz na redução da viabilidade de escleródios no solo, em relação as duas aplicações. Resultados da safra 2013/14 mostram que a aplicação de biofungicidas em duas épocas (V2 e V4) colaborou para a redução da viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* no solo em até 65%, as maiores reduções da germinação carpogênica variaram de 52% a 63% (MEYER, 2013).

O gênero *Bacillus* têm recebido grande atenção, principalmente, por ser microrganismos que crescem em uma ampla faixa de temperatura, por utilizarem diversos compostos como fonte de energia, por colonizarem diversos ambientes, por produzirem uma estrutura de resistência (endósporo), pela grande capacidade de competição, pela capacidade de produzirem diversos compostos com atividade antimicrobiana e principalmente por estar apresentando resultados significativos na inibição de hifas de *S. sclerotiorum*. Todos esses fatores justificam sua versatilidade e a grande procura de isolados de *Bacillus* como agente de biocontrole (MEDEIROS et al., 2017).

Os resultados desses ensaios demonstram que é possível reduzir o potencial de inóculo de *S. sclerotiorum* no solo pelo emprego de agentes de controle biológico, mesmo que dependentes de condições ambientais favoráveis para colonizar e afetar a viabilidade dos escleródios. Os biofungicidas testados inibiram significativamente a capacidade de formação de apotécios, o que pode contribuir para a redução da incidência de mofo-branco nas lavouras de soja

Considerando que a infecção da soja por *S. sclerotiorum* ocorre principalmente, em decorrência da germinação carpogênica (por ascósporos), o efeito dos agentes de biocontrole na inibição da germinação dos escleródios é de grande importância para o manejo da doença e redução de inóculo ao longo dos anos. A viabilidade da integração do controle biológico no manejo do mofo-branco em soja deve ser melhor estudada, principalmente com relação aos

mecanismos de ação e condições favoráveis ao melhor desempenho dos agentes de biocontrole (MEYER et al., 2016)

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

O maior percentual de escleródios podres por *T. harzianum*, *T. asperellum* ou *B. subtilis* foi observado quando se utilizou volume de aplicação de 200 L ha⁻¹.

Quando se utilizou menor volume de aplicação, 60 L ha⁻¹, o melhor efeito na inviabilização de escleródios ocorreu com a presença de palha sobre o solo.

A aplicação única em V4, de modo geral, apresentou tendências para maior inviabilidade de escleródios com os antagonistas utilizados.

A presença de palhada, de modo geral, incrementou o percentual de escleródios podres com a utilização dos antagonistas.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 5 ed. Elsevie Academic Press, 2005

BAE, T.S.; KNUDSEN, G.R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrole efficacy of *Trichoderma harzianum*. Applied soil Ecology 35:21-24, 2007.

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

BENÍTEZ, T. et al. Características de leveduras y hongos filamentos de interés em agroalimentación. Adaptación al ambiente. **Actualidad**, [S.1.], v.41, p.17-27, 2006.

BETTIOL, W. Métodos Usados no Biocontrole de Fitopatógenos: Isolamento seletivo de *Bacillus spp.* Editado por Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo. – Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, pg.42, 2007.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagonicos a *P. oryzae* para o controle da Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Piracicaba, 1988. 140 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-728

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.25, p.1165-1174. 1990.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M.A.B.; STADNIK, M.J.; KRAUSS, U., STEFANOVA, M.; PRADO, A.M.C. Controle Biológico de Doenças de Plantas na América latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Org). Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba-SP: FEALQ. p.303-327. 2008.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; PAULA JÚNIOS, T.J.; CORRÊA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCAN, C.M.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.I. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente, 155p. (Documento – Embrapa Meio Ambiente, 88). 2012.

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.11, n.7, p.1-16, 2006.

BRAGA, B.P. Mofo Branco na cultura da soja. Monografia – Uni-ANHANGUERA. Goiânia – abril, 2013.

BRANDÃO, R. S.; PRADO, T. do S.; LOBO JUNIOR, M. Inibição da germinação carpopôgica de *Sclerotinia sclerotiorum* em solos sob integração lavoura-pecuária com *Brachiaria ruziziensis*. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. Ciência e tecnologia na cadeia produtiva do feijão. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. 1 CD-ROM. (IAC. Documentos, 85).

BROZÓVÁ, J. Mycoparasitic fungi *Trichoderma* spp. in plant protection. **Plant Protection Science**, Prague, v.2, p.63-74, 2004.

CAMPOS, H.D.; SILVA, L.H.C.P.; MEYER, M.C.; SILVA, J.R.C.; NUNES JUNIOR, J. Mofo branco na cultura da soja e os desafios da pesquisa no Brasil. Tropical Plant Pathology, v.35, p. C-CI, 2010. Suplemento.

CASTRO, L.L. EFICIÊNCIA DE FUNGOS E BACTÉRIAS NO PARASITISMO DE ESCLERÓDIOS DE MOFO-BRANCO (*Sclerotinia sclerotiorum*). Monografia (Graduação em Agronomia) – Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde. Rio Verde, 2017. 31p.

CHAVES, G.M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, (Lib) de Bary. **Experimentae**, Viçosa, v.4, n.2, p.64-133, 1964.

CHEN, H, et al. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*, **Biotechnology Letters**, v.30, p. 919-923, 2008.

CIVARDI, E. A. Manejo cultural e aspectos epidemiológicos do mofo branco na cultura da soja. Tese Doutorado – Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2014.

CLARKSON, J.P., STAVELEY, J. PHELPS, K., YOUNG, C.S.; WHIPPS, J.M. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research*. Vol. 107: 213-222. 2003.

CONAB, Acomp. safra bras. grãos, v. 7 Safra 2019/20 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-25 novembro 2019. ISSN 2318-6852.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. Nature and practice of biological control of plants pathogens. **The American Phytopathological Society**, 534p. 1983.

CORABI-ADELL, C. et al. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. *Arq.Inst.Biol.*, São Paulo, 2002, v.69 (supl.), p.1-306.

DEMANT, C.A.R. Mofo branco e seu manejo no Oeste baiano. *Boletim Passarela da soja*, Fundação BA Março/2010 - Ano 02 - Nº02.

DELGADO, G. V.; MARTINS, I.; MENÊZES, J. E.; MACEDO, M. A.; MELLO, S. C. M. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. in vitro. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10., 2007, Brasília. Resumos... Brasília: EMBRAPA Recur.sos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 1 CD-ROM.

DILDEY, O.D.F.; BARBIAN, J.M.; GONÇALVES, E.D.V.; BROETTO, L.; ETHUR, L.Z.; KUHN, O.J.; BONETT, L.P. Inibição do crescimento in vitro de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. *Revista brasileira Biociências*, Porto Alegre, v. 12, n. 3, p. 132-136, jul./set. 2014.

ETHUR, L.Z.; COPATTI, A.S.; FIPKE, G.M.; CALVANO, C.C.P.; PAZINI, J.B. Micobiota parasitária de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* isolada de solos da fronteira oeste do Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Biol.*, vol.81, n.1, p.62-67. 2014.

FERREIRA, L.P., LEHMAN, P.S., ALMEIDA, A.M.R. Moléstias e seu controle. In: Miyasaka, S.; Medina, J. C. (Ed.). *A soja no Brasil*, p. 603-639, 1981.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43:337-359, 2005.

GAO, K. Mycoparasitism of *Rhizoctonia solani* by endophytic *Chaetomium spirale* ND35: ultrastructure and cytochemistry of the interaction. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.153, p. 280-290, 2005.

GÖRGEN, C.A., et al. Controle de *Sclerotinia sclerotiorum* com o Manejo de *Brachiaria ruziziensis* e Aplicação de *Trichoderma harzianum*. Circular Técnico 81- Embrapa. Santo Antônio de Goiás, GO. Dezembro, 2008.

GÖRGEN, C.A., et al. Manejo integrado de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja. Anais do IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão. Jataí: UFG (Campus Samambaia), 2007.

GÖRGEN, C.A., et al. Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.45, n.10, p.1102-1108, out. 2010

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, dez. 2009

GÖRGEN, C.A.; HIKISHIMA, M.; SILVEIRA NETO, A.N.; CARNEIRO, L.C.; LOBO JUNIOR, M. Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: ALMEIDA, A.M.R.; SEIXAS, C.D.S. (Ed.). Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura. Londrina: Embrapa Soja, 2010. p. 73-104.

GRAU, C.R.; HARTMAN, G.L. Sclerotinia stem rot. In: HARTMAN, G.L.; RUPE, J.C.; SIKORA, E.J.; DOMIER, L.L.; DAVIS, J.A.; STEFFEY, K.L. Compendium of soybean diseases and pests. 5. ed. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 2015. p. 59-62.

GRIGOLLI, J. F. J.; Manejo de doenças na cultura da soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F. (Ed.); Tecnologia e Produção: Soja 2014 / 2015. Curitiba : Midiograf, 2015. P. 134 – 156.

GUPTA, V.P, et al. Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v. 107, p. 145-154, 2000.

HANDELSMAN, J.; STABB, E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. The Plant Cell 8:1855-1869, 1996.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas od biocontrole: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n.4, p.377-393, Apri. 2000.

JULIATTI, F.C.; JULIATTI, F.C. Podridão branca da haste da soja: Manejo e uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção. Uberlândia, MG, Comoser 33p. 2010.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Archives of Microbiology, v.187, p.351–360, 2007.

KATZ, E.; DEMAIN. A. L. The peptide antibiotics of *Bacillus*. chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriological Review, v. 41, n. 2. p. 449-464, 1977.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas, v.4, n.2, p.12-20, 2010.

LEMES, E.; CASTRO, L.; ASSIS, R. Doenças da Soja: melhoramento genético e técnicas de manejo. Embrapa Soja. Campinas, Millennium, 2015. 363p.

LEELASUPHUKUL, W. HEMMANEES, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biology and Technology. v.48, April 2008, p.113-121.

LOBO JÚNIOR, M. Controle de podridões radiculares no feijoeiro comum com o fungicida microbiano Trichodermil. In: COBUCCI, T.; WRUCK, F.J. (Ed.). Resultados obtidos na área pólo de feijão no período de 2002 a 2004. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. p.13-17. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 174).

LOBO JÚNIOR, M. Mofo Branco - *Sclerotinia sclerotiorum*. Embrapa Arroz e Feijão-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E). Boletim Passarela da Soja, Luiz Eduardo Magalhães, v. 2, n. 2, p. 12, mar. 2010.

LOPES, F.A.C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonismo against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, Oxford, v.116, n.7, p.815-824, 2012.

LUCON, C.M.M.; CHAVES, A.L.R.; BACILIERI, S. Lucon, Cleusa Maria Mantovanello. *Trichoderma*: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura. Instituto Biológico. São Paulo, 2014. 28p.

MEDEIROS, F.H.V. et al. Novos sistemas de produção. In: Organizado pelo Núcleo de Estudos em Fitopatologia, Universidade de Lavras. – Lavras: UFLA, 2017. p.54-58.

MELO, I.S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Eds.) Controle Biológico, v.1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p.17-67.

MENÊZES, J.E. et al. **Avaliação de sementes de milheto no cultivo de *Trichoderma* spp.** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2007. 4p. (Circular Técnica, 56).

MEYER, M.C. et al (a). Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo-branco na cultura da soja – safras 2012 a 2015. Embrapa Soja: Documentos 368. 46p. Londrina, 2016.

MEYER, M.C. et al (b). Ensaio cooperativos de controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja: resultados sumarizados da safra 2015/2016. Embrapa: Circular Técnica 124. Londrina, PR. Outubro, 2016.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIMADA, C.M.; PIMENTA, C.B.; JACCOUD FILHO, D.S.; BORGES, E.P.; JULIATTI, F.C.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L.C.; SILVA, L.H.C.P.; SATO, L.N.; MADALOSSO, M.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M.C.; DEBORTOLI, M.P.; BALARDIN, R.S.; VENANCIO, W.S. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, safra 2015/2016: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja. 5p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 122). 2016.

- MEYER, M.C. Resultados da rede de ensaios de controle biológico de mofo-branco em soja. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 13. 2013. Bonito. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2013. 1 CD-ROM.
- MORANDI, M.A.B.; POMELLA, A.W.V.; SANTOS, E.R.; FERNANDES, M.; CAOVILO, L.E.; FERNANDES, A.O. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo-branco do feijoeiro. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJOEIRO, 6., 2007, Campinas, SP. **Documentos**, Campinas, SP: [s.n.], 2007.
- PAULA JÚNIOR, T.J. et al. Cultura do feijão. Belo Horizonte: EPAMIG/CTZM, 2004. 52p.
- PINTO DA SILVA, G.B. UTILIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary E NO CRESCIMENTO DE ALFACE. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2013.
- POLETTI, I. Caracterização e manejo do patossistema ervamate/podridão-de-raízes. 2010. 97 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- PRIA, M. D.; SILVA, O. C. Cultura do feijão: doenças e controle, p.454, 2010.
- PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69: 875-880. 1979.
- ROCHA, R.P manejo da podridão de sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) e míldio (*Bremia lactucae*) na cultura da alface. Dissertação (mestrado em Agronomia, área de concentração em agricultura) _ Universidade Estadual de Ponta grossa, Paraná. 2007.
- SAITO, L.R.; SALES. L.L.S.R.; MARTINEKOSKI, L.; REFFATTI, T.O. 2009. Aspects of the effect fungu *Trichoderma* spp. in biocontrol of pathogens of agricultural crops. 2: 209-216.
- SILVA, F. de A. S. e. & AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.
- SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C. Manejo do mofo branco da soja. In: Silva, L. H. C. P.; Campos, H. D.; Silva, J. R. C. (Ed.). Manejo fitossanitário de cultivos agroenergéticos. Lavras: UFLA, 2010. p. 205-214.
- SILVA, J.C.O, et al. Biocontrole de doenças de plantas: Uso de *Trichoderma* spp na agricultura. IV Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG - Campus Bambuí. IV Jornada Científica 06 a 09 de Dezembro de 2011.
- SOUZA FILHO, D.J. Globalizando o Problema, Fundamentando Soluções. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE MOFO BRANCO, 1., 2012, Ponta Grossa. Anais do 1º Encontro Internacional de Mofo Branco. Ponta Grossa: UEPG, 2012. 82 p.

STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; BAKER, C.J.; MACFALL, J.S. Greenhouse control of bean rust with *B. subtilis*. *Phytopathology*, Palo Alto, v.71, p 95-99, 1981.

WUTZKI, C.R. Controle alternativo, biológico e químico do mofo branco na soja. Ponta Grossa, 2014. 77f. (Dissertação em Agronomia). Universidade Estadual de Ponta Grossa.

ZANETTI, A.L. Relatos por estado sobre o comportamento da cultura de soja na safra 2007/2008: Minas Gerais. In: Reunião de Pesquisa da soja da Região central do Brasil, 30. 2009. Ata... Londrina, EMBRAPA Soja. Sessão 2.3, p. 24. Londrina: Embrapa Soja, 350 p.