

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

FUNGOS FILAMENTOSOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
Sclerotium rolfsii E *Sclerotinia sclerotiorum* E SUA
COMPATIBILIDADE COM O CONTROLE QUÍMICO

EVELLYN DA CUNHA MACEDO DOS SANTOS

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2018

FUNGOS FILAMENTOSOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
***Sclerotium rolfsii* E *Sclerotinia sclerotiorum* E SUA**
COMPATIBILIDADE COM O CONTROLE QUÍMICO

EVELLYN DA CUNHA MACÊDOS DOS SANTOS
Engenheira Agrônoma

Orientadora: PROF^a Dr^a LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI
Co-Orientador: PROF. Ph.D. WALBER LUIZ GAVASSONI

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande
Dourados, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Agronomia–Produção Vegetal,
para obtenção do título de Doutor.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237f Santos, Evellyn Da Cunha Macedo Dos

FUNGOS FILAMENTOSOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotium rolfsii* E
Sclerotinia sclerotiorum E SUA COMPATIBILIDADE COM O CONTROLE QUÍMICO [recurso eletrônico] /
Evellyn Da Cunha Macedo Dos Santos. -- 2018.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: PROF Dr. Lilian Maria Arruda Bacchi.

Coorientador: PROF Ph.D. Walber Luiz Gavassoni.

Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2018. Disponível
no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Controle biológico. 2. Mofo branco. 3. podridão de *sclerotium*. 4. controle químico. 5. antagonismo. I.
Bacchi, Prof Dr. Lilian Maria Arruda. II. Gavassoni, Prof Ph.d. Walber Luiz. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde
que citada a fonte.

Ao Pai celestial, que jamais me deixou desistir

OFEREÇO

Aos meus pais, Ronaldo e Rosane, por serem meu esteio sempre que necessitei. As minhas doces Avós, Gonçala e Lindauva, pelo carinho, apoio e infinitas orações para a conclusão desta vida acadêmica. Em memória a minha vó Maria e meu vô Orlando, que nunca mediram esforços para me auxiliar desde o início da graduação. Ao meu companheiro César, que me apoiou durante esta caminhada, e principalmente na hora da finalização desta tese. E principalmente, à minha filha Olívia, que fez a tese ter um sentido muito maior e especial

DEDICO

“Eu sempre achei que a experiência é uma faca de dois gumes; você evolui a partir dela, mas algumas vezes ela te fere. Somente uma coisa é certa: você sempre aprende com ela. E isso é o que realmente importa”

(Donald Trump)

SUMARIO

	PÁGINA
RESUMO GERAL.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....	05
ARTIGO I. ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL ANTAGÔNICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS A ESCLERÓDIOS DE <i>Sclerotium rolfsii</i> E <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	07
RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4 CONCLUSÕES.....	23
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ARTIGO II. SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE FUNGOS FILAMENTOSOS COM POTENCIAL ANTAGÔNICO À <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> E <i>Sclerotium rolfsii</i>	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1 Compatibilidade de fungicidas com isolados agentes de biocontrole de <i>S. rolfsii</i> ...	33
3.2 Compatibilidade de fungicidas com isolados agentes de biocontrole de <i>S. sclerotiorum</i>	41
4 CONCLUSÕES.....	52
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54

FUNGOS FILAMENTOSOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotium rolfii* E *Sclerotinia sclerotiorum* E SUA COMPATIBILIDADE COM O CONTROLE QUÍMICO.

RESUMO GERAL

Os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfii* são importantes fitopatógenos de ocorrência mundial, causando doenças em mais de 450 gêneros de hospedeiros. O controle de ambos os patógenos é difícil, pois os fungos produzem estruturas de resistência (escleródios), que agem para sobrevivência do fungo na ausência do hospedeiro, e que podem permanecer no solo por longo tempo, tornando o controle químico oneroso. Hoje, o controle das enfermidades relatadas, está baseado no controle integrado, dando ênfase ao controle biológico realizado por fungos antagonistas. Assim, objetivou-se selecionar fungos com potencial antagonista para *S. sclerotiorum* e *S. rolfii*, oriundos de diversos sistemas de manejo e uso, e a compatibilidade dos mesmos com fungicidas. Para seleção dos fungos filamentosos foi utilizado o método de isca com escleródios de ambos fitopatógenos, em amostras de solos de diferentes sistemas de cultivo. Os fungos encontrados foram testados quanto ao seu potencial de antagonismo através de confrontação direta, atribuindo notas, calculando-se a inibição do crescimento e a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM). Após a seleção dos antagonistas, avaliou-se a compatibilidade dos isolados aos fungicidas tiofanato metílico, iprodiona e procimidona, nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 500 e 1000 ppm. Foram calculadas a inibição e a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) dos isolados biocontroladores com a presença dos fungicidas. Com base na inibição do crescimento micelial, foram estimados os valores da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e a concentração inibitória mínima (CIM). Concluiu-se que as inibições variaram de 66,71 % a 0 %, e as AACCM de 44,46 a 2,50 nos isolados encontrados nos escleródios de *S. rolfii*. Já a inibição de *S. sclerotiorum* variou de 82 % a 3,17 % e as AACCM de 106,32 a 11,52. Cerca de metade dos fungos encontrados nos escleródios proporcionaram pelo menos 50% de inibição do crescimento dos dois fitopatógenos, tornando-se possíveis antagonistas de *S. sclerotiorum* e *S. rolfii*. O fungicida tiofanato metílico foi o que mais inibiu o desenvolvimento dos isolados antagonistas de ambos fitopatógenos. Na avaliação da inibição (%) e AACCM o isolado antagonista de *S. rolfii*, SrL1 foi o menos sensível as concentrações médias dos fungicidas. Nas mesmas avaliações realizadas nos isolados antagonistas de *S. sclerotiorum*, o isolado com maior compatibilidade aos três fungicidas foi SsH1. As CI₅₀ e CIM dos isolados antagonistas de *S. rolfii*, os classificaram como moderadamente sensíveis a insensíveis aos fungicidas. As avaliações de CI₅₀ e CIM dos isolados antagonistas de *S. sclerotiorum*, os classificaram como altamente sensíveis a insensíveis aos fungicidas.

Palavras-chave: Antagonismo, controle integrado, fitopatogenos.

FILAMENTOUS FUNGI IN THE BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotium rolfsii* AND *Sclerotinia sclerotiorum* AND ITS COMPATIBILITY WITH CHEMICAL CONTROL.

ABSTRACT

The fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii* are important phytopathogens of world-wide occurrence, causing diseases in more than 450 genera of hosts. The control of the diseases caused by these phytopathogens is difficult, since fungi produce resistance structures (sclerodes), which act to survive the fungus in the absence of the host, and that can remain in the soil for a long time, making the chemical control onerous. Today, the control of the reported diseases, is based on the integrated control, emphasizing the biological control performed by antagonistic fungi. Thus, the objective of this work was to select fungi and their potential antagonists for *S. sclerotiorum* and *S. rolfsii*, from different planting systems, and their compatibility with fungicides. For the selection of filamentous fungi, the bait method was used with sclerodes of both phytopathogens, in soil samples from different culture systems. The fungi found were tested for their antagonistic potential through direct confrontation, assigning notes, calculating the inhibition of growth and the area below the mycelial growth curve (AACCM). After the selection of the antagonists, the compatibility of the isolates with the fungicides methyl thiophanate, iprodione and procimidone, at the concentrations of 0, 1, 10, 100, 500 and 1000 ppm were evaluated. The inhibition and the area under the mycelial growth curve (AACCM) of the biocontrolled isolates with the presence of the fungicides were calculated. Based on the inhibition of the mycelial growth, the values of 50% inhibitory concentration (IC₅₀) and minimum inhibitory concentration (MIC) were estimated. It was concluded that inhibitions ranged from 66.71% to 0%, and AACCM from 44.46 to 2.50 in the isolates found in sclerotia of *S. rolfsii*. The inhibition of *S. sclerotiorum* ranged from 82% to 3.17% and AACCM from 106.32 to 11.52. About half of the fungi found in sclerodes provided at least 50% inhibition of growth of the two phytopathogens, making them possible antagonists of *S. sclerotiorum* and *S. rolfsii*. The fungicide methyl thiophanate was the one that most inhibited the development of the antagonistic isolates of both phytopathogens. In the evaluation inhibition and AACCM the isolate antagonist of *S. rolfsii*, SrL1 was the least sensitive medium concentrations of fungicides. In the same evaluations carried out in the isolates of *S. sclerotiorum*, the isolate with the highest compatibility with the three fungicides was SsH1. The IC₅₀ and MIC of the isolates of *S. rolfsii*, classified them as moderately sensitive to insensitive to fungicides. The IC₅₀ and MIC assessments of the *S. sclerotiorum* antagonist isolates classified them as highly sensitive to insensitive.

Keywords: Antagonism, integrated control, phytopathogens.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de alimentos é essencial para a sobrevivência da humanidade, ou seja, somos dependentes das produções agrícolas, e quanto mais a população mundial aumenta, mais a produção deve ser aumentada. Assim, é necessário desenvolver as técnicas de produção para que se produza cada vez mais e não haja escassez de alimentos indispensáveis. Atualmente, as perdas nas culturas decorrentes de fatores bióticos vêm causando muita preocupação, como é o caso de danos causados por doenças, por exemplo, a ferrugem asiática, que causa redução de até 90% na produção de soja (HARTMAM et al., 2015). Outros fungos geram muitas preocupações aos produtores na atualidade, pois seus danos são grandes e seu controle oneroso.

Os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* são patógenos que causam prejuízos econômicos a diversas culturas. Seu controle é limitado em função de estruturas de resistência denominadas escleródios, que ambos produzem, permitindo-os sobreviver durante anos no solos (BUENO et al., 2007).

Sclerotinia sclerotiorum é um patógeno necrotrófico polífago, que infecta uma grande variedade de espécies de hospedeiros, como a soja, feijão, alfafa, mostarda, lentilha, ervilha e girassol, este afeta os tecidos das plantas causando importantes danos (PURDY, 1979), causando doenças conhecidas como mofo branco ou podridão branca, que recebem este nome devido aos sintomas e sinais externos causados nas plantas (LEITE, 2005). Este fungo ocorre tanto em locais de clima tropical quanto temperado, tanto em regiões úmidas como secas. O primeiro registro de ocorrência deste no Brasil foi feito em 1921, em batata no estado de São Paulo (CHAVES, 1964). As condições de clima favoráveis para seu desenvolvimento são alta umidade e temperaturas amenas. Nesta situação, uma lavoura de soja pode sofrer, em média, perdas de 30% ou mais, em períodos chuvosos e quando medidas preventivas não são tomadas (FURLAN, 2009).

Devido às condições favoráveis existentes no Brasil, o patógeno tem incidência em vários estados e à expansão da irrigação por pivô central nos estados de São Paulo, Goiás e Minas Gerais, a sua ocorrência e severidade nas plantas foram crescentes (VALE et al., 1997). Quando, nas condições climáticas ideais, o fungo se desenvolve rapidamente, invadindo o tecido do hospedeiro (raízes), ocasionando uma podridão aquosa, na qual se desenvolve um micélio branco cotonoso, sobre os tecidos infectados. Com o crescimento micelial, são formados os escleródios, que têm forma irregular e

tamanho muito variável. Segundo Bolton et al. (2006), essas estruturas podem variar de 2 a 10 milímetros de diâmetro na cultura do feijão, e, na medida em que hospedeiro se decompõe, estes ficam no solo, podendo permanecer dormentes por longos períodos ou então germinar após um curto período de dormência (PURDY, 1979; DOW et al., 1988).

Assim como *S. sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* é um importante patógeno habitante de solo, responsável por podridões de raízes, sementes, bulbos, colo e até frutos, causando murcha, tombamento de plântulas e podridões (BEDENDO, 1995). Apresenta uma enorme gama de hospedeiros, chegando a aproximadamente 500 espécies botânicas, ocorrendo em praticamente todo o território agrícola (PUNJA e RAHE, 1992; MONTEIRO et al., 2000). Segundo levantamento realizado por Almeida (1987), só na região nordeste do Brasil, o fungo causa enfermidades em dezoito espécies de plantas, entre elas, mangueira, tomateiro, cenoura, repolho, pimentão, melancia, feijão comum e de corda.

A murcha de *Sclerotium* é uma das doenças mais importantes da cultura do feijão, onde a doença inicialmente resulta em sintomas no colo da planta, e com a progressão da doença estes sintomas desintegram o sistema parenquimatoso da planta, causando sintomas reflexos como murcha e também a morte da parte aérea (BIANCHINI et al., 1997). A doença tem maior incidência quando em regiões com temperaturas altas, de 27 a 30° C e alta umidade relativa do ar (MATHUR et al., 1976). Este fungo também apresenta uma massa de micélio bastante aparente, não tão denso quanto *S. sclerotiorum*, mas muito característico da doença. A massa de micélio origina inúmeros escleródios, que inicialmente são muito pequenos e de coloração esbranquiçada e, progressivamente adquire uma coloração mais escura, próximo ao marrom, com seu formato esférico (BEDENDO, 1995).

O controle de fungos formadores de escleródios é muito dificultado, pois tais estruturas são resistentes e podem permanecer no solo por vários anos, além de serem patógenos de diversas espécies de hospedeiros. O controle químico com agrotóxicos (AGROFIT, 2018) adotado como medida isolada, pode ter eficiência baixa, além de ser de custo elevado, devido a necessidade de várias aplicações, além de trazer riscos de contaminação ambiental (MORANDI e BETTIOL, 2008). Porém, existem fungicidas registrados no Ministério da Agricultura (AGROFIT, 2018) para o controle do mofo-branco do feijão e da soja, com os ingredientes ativos como: fluazinam (fenilpiridinilamina), tiofanato-metílico (benzimidazol), clorotalonil + tiofanato-metílico (isofluralonitrila + benzimidazol), fluazinam + tiofanato metílico (fenilpiridinilamina +

benzimidazol), procimidona (dicarboximida), ciprodinil (anilinopirimidina) e cloreto de benzalcônios (amônio quaternário) (AGROFIT, 2017). Todavia, o tiofanato metílico, não tem conseguido controlar em 80% a doença como é preconizado pelo MAPA (HENNING, 2009).

O controle mais indicado para *S. sclerotium* e *S. rolfsii*, não é baseado em um método isolado, e sim na associação de métodos e manejos para que seja eficaz. Inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos com controles alternativos, que podem ser empregados em conjunto com agrotóxicos, visando maximizar os resultados. Em trabalho realizado por Macena et al. (2011), avaliando os espaçamentos de 20, 40 e 60 cm entre linhas de feijoeiro, os autores constataram que no espaçamento de 20 cm o número de escleródios de *S. sclerotium* foi maior que nos tratamentos de 40 e 60 cm, atingindo valores de 18,8, 14,6 e 14,1 escleródios m⁻², respectivamente. A medida em que se aumentou o espaçamento, diminuiu o número de escleródios presentes no solo, a incidência e a severidade da doença. Os autores atribuíram tal resultado a quantidade de radiação solar disponível no estande.

O controle biológico para *S. sclerotium* e *S. rolfsii* vem sendo muito difundido atualmente, e apresentando resultados satisfatórios. O uso de agentes microbianos antagonistas é mais simples e menos onerosa quando comparada ao controle químico com agrotóxicos. Entre os principais fungos antagonistas estão *Trichoderma* spp., *Pythium oligandrum*, *Ampelomyces quisqualis*, *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Talaromyces flavus*, *Sporidesmium sclerotivorum*. Porém, os fungos do gênero *Trichoderma* são os mais utilizados, por apresentarem maior capacidade de competição por espaço e nutrientes, produzir enzimas degradadoras de parede celular de outros fungos e a produziram antibióticos, além de atuarem sobre fungos que produzem estruturas de resistência como *S. sclerotium* e *S. rolfsii* (HARMAM et al., 2004; ALMEIDA, 2009; KUMAR et al., 2012).

A capacidade de *Trichoderma* em controlar *S. sclerotium* foi observada por Meyer et al. (2016), em ensaios cooperativos nas safras de 2012 a 2015 na cultura da soja. Os autores observaram que a incidência média de mofo-branco pode ser reduzida em até 60% na safra de 2014/2015, quando a testemunha (sem controle) apresentou incidência média da doença de 23,4%. Pacheco et al. (2016) observaram que a incidência de plantas doentes de feijão em solo infectado por *S. rolfsii* e sem controle biológico (testemunha) chegou a 98%, e em plantas tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. esta incidência caiu para até 9% de plantas com a doença.

Apesar de apresentar resultados satisfatórios e promissores, o controle biológico com fungos antagonistas ainda está sendo pouco utilizado pelos produtores rurais. Isso porque os estudos são recentes com fungos com essa capacidade, exceto o gênero *Trichoderma*, e também devido aos resultados com o controle com fungicidas químicos terem maior aceitação por parte dos produtores. A associação do controle químico com agrotóxicos e o controle biológico com fungos antagonistas pode apresentar resultados satisfatórios. A possibilidade desta associação foi observada por Meyer et al (2016), onde em um dos seus ensaios de controle do mofo-branco em soja, o tratamento com *Trichoderma harzianum* + fluazinam não diferiu estatisticamente do tratamento com fluazinam isolado, apresentando 9,8% de incidência da doença e 11,5, respectivamente.

Com isso, objetivou-se isolar e avaliar o potencial de antagonismo de fungos filamentosos associados a escleródios de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, oriundos de diferentes sistemas de produção agrícola, e avaliar a tolerância de fungos, selecionados como antagonistas a *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, a produtos químicos comerciais, utilizados no controle destes patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 07 de agosto, 2018.
- ALMEIDA, R. T. *Sclerotium rolfsii* Sacc. no nordeste brasileiro. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 18, n. 1, p. 67-71, 1987.
- ALMEIDA, W. K. D. S. Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatôgenos *Colletotrichum* spp., *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em fruteiras tropicais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 3, n. 2, p. 1374-1378, 2009.
- BEDENDO, I. Podridões de raiz e colo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. v. 1, .3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 829-837.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, B. S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. v. 2, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 353-375.
- 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**, London, v.7, n.1, p. 1-16, 2006.
- BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p.47-55, 2007.
- CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experimentae**, Viçosa, v. 4, p. 69-133, 1964.
- DOW, R. L.; PORTER, D. M.; FOWELL, N. L. Effect of environmental factors on *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia blight* of peanut. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 6, p. 672-676, n. 6, 1988.
- FURLAN, S. H. **Manejo do mofo branco na soja**. Instituto Biológico, São Paulo, 2009 (Comunicado técnico, 111).
- HARMAM, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review of Microbiology**, London, v.2, n.1, p. 43-56, 2004.
- HARTMAN, G.L.; SIKORA, E.J.; RUPE, J.C. Rust. In: HARTMAN, G.L.; RUPE, J.C.; SIKORA, E.J.; DOMIER, L.L.; DAVIS, J.A.; STEFFEY, K.L. (Ed.). **Compendium of soybean diseases and pests**. 5 ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2015. p.56-58.
- HENNING, A.A. Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merrill). **Informativo ABRATES**, Londrina, v.19, n.3, p.9-12. 2009.
- KUMAR, K.; AMARESAN, N.; BHAGAT, S.; MADHURI, K.; SRIVASTAVA, R. C. Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root

rot and foliar pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, Himedia, v.52, n.2, p.137-144, 2012.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girrasol e soja**. Embrapa Soja, Londrina, 2005 (Comunicado técnico,76).

MACENA, A. M.F.; CANTERI, M. G.; FERREIRA JUNIOR, J. D. Espaçamento e manejo de restos culturais para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1871-1873, 2011.

MATHUR, S. B.; SARBHOY, A. K. Physiological studies on *Sclerotium rolfsii* causing root rot of sugarbeet. **Indian Phytopathology**, India, v. 29, n. 4, p. 454-455, 1976.

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M. **Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo-branco na cultura da soja – safras 2012 a 2015**. Embrapa Soja, Londrina, 2016 (Circular Técnica, 368).

MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Doenças causadas por fungos e bactérias em pimentão e pimenta. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2000. p. 637- 675.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Integração de métodos biocompatíveis no manejo de doenças e pragas: experiência em plantas ornamentais e medicinais. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, supl., p. 31-34, 2008.

PACHECO, K. R.; VISCARDI, B. S. M.; VASCONCELOS, T. M. M.; MOREIRA, G. A. M.; VALE, H. M. M.; BLUM, L. E. B. Efficacy of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. reesei* against *Sclerotium rolfsii*. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 32, n. 2, p. 412-421, 2016.

PUNJA, Z. K; RAHE, J. E. *Sclerotium*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. Saint Paul: APS PRESS, 1992. p. 166-170.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8 p. 875-880, 1979.

VALE, F. X. R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L) - Controle de doenças – Doenças da parte aérea causadas por fungos. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas – Grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997, p. 335-374.

CAPÍTULO I -
ISOLAMENTO E POTENCIAL ANTAGÔNICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ASSOCIADOS A ESCLERÓDIOS DE *Sclerotium rolfsii*
E *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO

Os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* são importantes fitopatógenos de ocorrência mundial, causando doenças em mais de 450 gêneros de hospedeiros, as mesmas conhecidas como mofo-branco e podridão de esclerotium, respectivamente. O controle de ambas as doenças é difícil, pois os fungos produzem estruturas de resistência (escleródios), que agem para sobrevivência do fungo na ausência do hospedeiro, e que podem permanecer no solo por longo tempo, tornando o controle químico com agrotóxicos oneroso. Hoje, o controle das enfermidades relatadas está baseado no controle integrado, dando ênfase ao controle biológico realizado por fungos antagonistas. Assim, o objetivo do trabalho foi selecionar fungos com potencial de antagonismo para *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, oriundos de diversos sistemas de manejo de solo. Para seleção dos fungos, foi utilizado o método de isca com escleródios de ambos fitopatógenos, em amostras de solos de lavoura, mata, horta, de integração lavoura-pecuária com lavoura, integração lavoura-pecuária com pecuária, pastagem permanente e sistema de plantio direto. Os fungos encontrados foram testados quanto ao seu potencial de antagonismo aos fitopatógenos através do método de confrontação direta, atribuindo notas, calculando-se a inibição do crescimento e a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições, e os dados submetidos a análise de variância, com as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Foram obtidos 23 e 17 isolados de fungos associados a escleródios de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, respectivamente, sendo que apenas em solo de mata e horta não foram encontrados fungos em *S. rolfsii*. As inibições variaram de 66,71 % a 0 %, as notas de 2,2 a 5, e as AACCM 44,46 a 2,50 em isolados encontrados em escleródios de *S. rolfsii*. Já inibição de dos isolados de *S. sclerotiorum* variaram de 82 % a 3,17 % as notas de 2,5 a 4,0 e as AACCM de 106,32 a 11,52. Cerca de metade dos fungos encontrados nos escleródios apresentaram pelo menos 50 % de inibição do crescimento dos dois fitopatógenos, tornando-se possíveis antagonistas de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.

Palavras-chave: controle biológico, mofo branco, podridão de esclerotium

Isolation and evaluation of the antagonistic potential of filamentous fungi associated to sclerotia of *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotinia sclerotiorum*

ABSTRACT

The fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii* are important phytopathogens worldwide, causing diseases in more than 450 genera of hosts, the same as white mold and sclerotium rot, respectively. Control of both diseases is difficult because fungi produce resistance structures (sclerotia), which offer survival the fungus in the absence of the host, and which can remain in the soil for a long time, making chemical control costly. Today, the control of the reported diseases is based on the integrated control, emphasizing the biological control performed by antagonistic fungi. Thus, the objective of the work was to select fungi with potential of antagonism for *S. sclerotiorum* and *S. rolfsii*, from different planting systems. For the selection of fungi, we used the bait method with sclerotia of both phytopathogens, in soil samples from crop, forest, orchard, crop-livestock integration with crop, integration with livestock, permanent pasture and direct planting. The fungi isolated were tested for their potential antagonism to phytopathogens using the direct confrontation method, assigning notes, calculating the percentage of growth inhibition and the area under the mycelial growth curve (AACCM). The experimental design was completely randomized with five replicates, and the data submitted to analysis of variance, with the means compared by the Tukey test at 5% probability. Twenty-three and seventeen isolates of fungi associated to sclerotia of *S. sclerotiorum* and *S. rolfsii* were obtained, respectively, and only fungi in *S. rolfsii* were found in forest and orchard soil. It was not isolated fungus from 66.71% to 0%, scores from 2.2 to 5, and AACCM from 44.46 to 2.50 on isolates found in *S. rolfsii*. Inhibition of *S. sclerotiorum* isolates ranged from 82% to 3.17%, 2.5 to 4.0 and AACCM from 106.32 to 11.52. About half of the fungi found in sclerotia provided at least 50% inhibition of growth of the two phytopathogens, making them possible antagonists of *S. sclerotiorum* and *S. rolfsii*.

Keywords: biological control, white mold, sclerotium rot

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas pelos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e *Sclerotium rolfsii* Sacc., apresentam dificuldade de controle devido a formação de estruturas de sobrevivência denominadas escleródios, que podem permanecer nos solos de cultivo por vários anos na ausência do hospedeiro e/ou nas condições climáticas desfavoráveis, permitindo a sobrevivência destes organismos no solo por longos períodos de tempo (BUENO et al., 2007).

Sclerotinia sclerotiorum é um patógeno que infecta grande variedade de espécies de hospedeiros, como a soja, feijão, alfafa, mostarda, lentilha, ervilha e girassol, este afeta os tecidos das plantas causando danos (PURDY, 1979), originando doenças conhecidas como mofo branco ou podridão branca, assim denominadas devido aos sintomas e sinais externos nas plantas (LEITE, 2005). Os escleródios desempenham um papel muito importante no ciclo de vida de *S. sclerotiorum* (HUINTER et al., 1978), visto que estes permanecem dentro e na superfície dos tecidos colonizados e retornam ao solo com os resíduos da cultura e são responsáveis pela sobrevivência do fungo (LEITE, 2005).

Assim como o *S. sclerotiorum*, o fungo *S. rolfsii* é um importante patógeno habitante de solo, sendo agente causal de podridões de raízes, bulbos, do colo e até frutos, causando murcha, tombamento de plântulas e podridões. Sua gama de hospedeiros é extensa (MONTEIRO et al., 2000), aproximadamente 500 espécies botânicas, distribuindo-se em todas as regiões agrícolas (PUNJA e RAHE, 1992). Os escleródios têm um papel fundamental na sobrevivência deste patógeno, também, podendo sobreviver no solo por no mínimo um ano (BIANCHINI et al., 1997).

A utilização de medidas de controle de doenças, tais como uso de variedades resistentes, fungicidas químicos, rotação de culturas e microrganismos antagonistas quando associadas, podem apresentar boa eficácia no combate a fungos produtores de escleródios (PAULA JÚNIOR et al. 2008). Segundo Luz (2003), há necessidade de emprego de produtos biológicos, que sirvam como alternativa, em combinação com o agrotóxico, para melhorar o controle dos principais patógenos e aumentar o rendimento de culturas.

Já existem diversos relatos de fungos antagonistas à *S. sclerotiorum*, tais como *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. (ZAZZERINI e TOSI, 1985), *Coniothyrium minitans*

(HUANG et al., 2000) e *Trichoderma* spp. (HADDAD et al, 2017).

Porém, grande parte do controle biológico de fungos habitantes de solo é realizada através do fungo *Trichoderma* spp., que já é produzido comercialmente em larga escala para utilização. A eficiência do controle biológico por produtos comercializados a base deste fungo causou redução de até 94% na germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* em soja, com apenas duas aplicações do produto a base de *T. hasperellum* (MEYER et al, 2016)

A eficiência de produtos comerciais a base de *Trichoderma* também foi constatada no controle de *S. rolfsii* na cultura do alho, onde o controle biológico com *Trichoderma harzianum*, foi capaz de reduzir a germinação dos escleródios em 93,6% do isolado UB686 e 51,6% do isolado UB193 do patógeno, em relação a testemunha, com escleródios tratados apenas com água (SOUZA, 2012).

A exploração de outros fungos com poder antagonistas a *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* se torna necessária, para que mais opções de agentes de biocontrole seja disponibilizadas aos produtores. Com isso, o objetivou-se neste trabalho selecionar fungos de solo de diversos agrossistemas de diferentes localidades, com potencial de antagonismo aos dois patógenos produtores de escleródios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, município de Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul.

Os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* utilizados neste experimento são oriundos da coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia, originados da Fazenda Experimental de Ciências Agrárias da UFGD (FAECA). Escleródios dos fungos foram submetidos à assepsia em álcool 70%, hipoclorito de sódio a 0,5%, por um minuto e lavados com água destilada e esterilizada pelo mesmo tempo, permanecendo em câmara de fluxo de ar para secagem. Após a secagem, os escleródios foram colocados em meio de cultura BDA e incubados em BOD's por 7 dias, a temperatura em torno de 24⁰ C e fotoperíodo de 12 horas. Os micélios produzidos foram transferidos, em discos, para erlenmeyers contendo 100g de cenoura, cortada em rodela, previamente esterilizadas em autoclave por 20 minutos a 120⁰C, e mantidos a 22 ⁰C sob escuro contínuo por 40 dias.

Para a obtenção dos possíveis fungos antagonistas, foi utilizado o método de isca com os escleródios de *S. sclerotiorum* e *Scletotium rolfsii* (GHINI, 1989). Para isto, foram coletadas amostras de 500 g de solo, retiradas de uma profundidade de 0-10 cm, retirando todos os restos vegetais na superfície, em três áreas localizadas na FAECA, no município de Dourados e em quatro áreas localizadas no município de Maracaju, ambas no estado de Mato Grosso do Sul, conforme o Quadro 1. Os isolados foram nomeados conforme o fitopatógeno em que foram encontrados: *S. rolfsii* (Sr), *S. sclerotiorum* (Ss) + a sigla do cultivo em que foram encontrados + o numeral correspondente. Exemplo: primeiro isolado encontrado em escleródios de *S. rolfsii*, em solo de cultivo de integração lavoura-pecuária na fase lavoura = SrILPL1.

QUADRO 1. Local de coleta de amostras de solo, tipo de cultivo, nomenclatura para o método de isca de fungos com potencial antagonista para *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

Origem do Solo	Tipo de Cultivo	Nomenclatura
Dourados-MS	Horta	H
Dourados-MS	Mata	M
Dourados-MS	Lavoura	L
Maracajú-MS	Integração Lavoura- Pecuária - Lavoura	ILPL
Maracajú-MS	Integração Lavoura- pecuária - Pecuária	ILPP
Maracajú-MS	Pastagem Permanente	PP
Maracajú-MS	Plantio Direto	PD

Quatrocentos gramas de solo de cada local foram colocados em copos de Becker de 500 mL, e, nestes, colocadas quatro trouxas, feitas com gaze hidrófila (13 fios por cm² 7,5 cm x 7,5 cm com quatro dobras), e fita adesiva para fechar as laterais, contendo 10 escleródios de *S. sclerotiorum* cada uma. Já para *S. rolfsii*, a mesma quantidade de escleródios foi alocada dentro de trouxas, com as mesmas dimensões, porém feitas de tela de tecido, com orifícios milimétricos, pois os escleródios de *S. rolfsii* eram de tamanho que vazariam pela gaze hidrófila. As trouxas foram intercalados com camadas de solo, umedecendo os Beckers com 10 mL de água destilada e esterilizada, cobertos com papel alumínio, assim mantidos em temperatura ambiente (20^o C a 28^oC), sem a incidência da luz solar direta.

Após sete dias de exposição dos escleródios às amostras de solo, estes foram transferidos para meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) acrescido de antibiótico Cloranfenicol. As placas de petri foram vedadas com filme plástico e colocadas em BOD, com temperatura de 25^o C e fotoperíodo de 12 horas. Os fungos encontrados nos escleródios foram repicados para placas de Petri, com meio BDA e deixados em câmara climatizada a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h.

Para avaliação do potencial antagonista dos fungos isolados de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, foi realizado o método de confrontação direta, ou pareamento adaptado do trabalho de Bell et al. (1982), onde discos de BDA Difco de 0,8 cm, contendo cultura pura de cada isolado dos fungos encontrados com o fitopatógeno, foram colocados em placa de Petri de vidro de 9 cm, com o mesmo meio de cultura, a 0,5 cm da borda e observando a distância de 6,4 cm entre colônias dos supostos antagonistas e seus respectivos fitopatógeno (Figura 1A). A testemunha consistia em placas contendo apenas discos dos fitopatógenos (Figura 1B). As placas foram colocadas em câmara de incubação BOD regulada para o fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25^oC. As medições do crescimento micelial das colônias dos antagonista e dos patógenos ocorreram a cada 48 horas, no segmento de reta entre os centros dos discos de micélio do fungo isolado e do patógeno, até a estabilização, com auxílio de uma régua graduada (Figura 2).

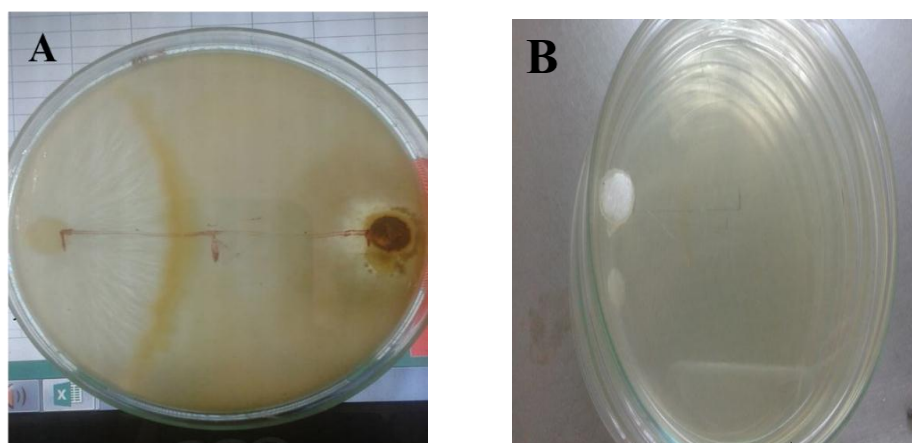


Figura 1. Disco de *Sclerotinia sclerotiorum* pareado com disco de fungo antagonista (A) e disco de *Sclerotinia sclerotiorum* sozinho na placa como testemunha (B).

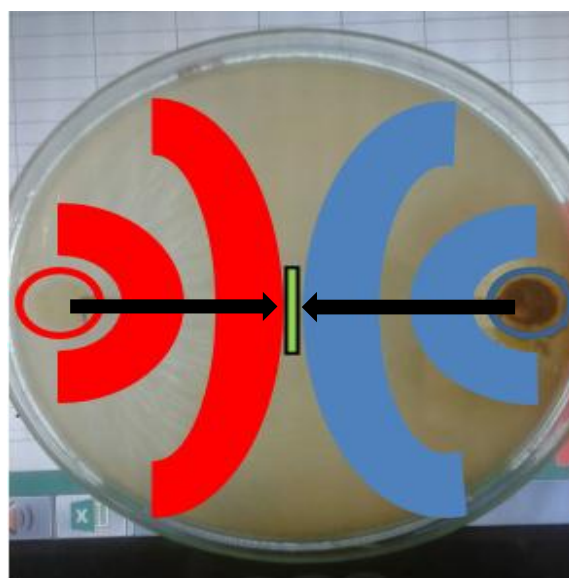


Figura 2. Medições dos crescimentos miceliais dos fungos isolados e dos patógenos.

Após as medições, a relação antagonista/patógeno foi classificada de acordo com a escala de notas de Bell et al. (1982) que determina o grau de antagonismo: 1- O agente de biocontrole cresce completamente sobre o patógeno cobrindo a superfície total do meio de cultura; 2- O agente de biocontrole cresce sobre no mínimo 2/3 da superfície do meio de cultura; 3- O agente de biocontrole e o patógeno colonizam aproximadamente metade da superfície do meio de cultura (mais do que 1/3 e menos que 2/3) e nenhum deles aparece dominando o outro; 4- O patógeno coloniza no mínimo 2/3 da superfície do meio de cultura e aparece resistindo ao agente de biocontrole; 5- O patógeno cresce completamente sobre o agente de biocontrole e ocupa a superfície total do meio de cultura. Também foram calculadas a inibição (%) do patógeno através da formula:

$$I=[(CrTest-CrTrat)/CrTest]x100$$

onde Cr: crescimento; Test: testemunha e Trat: tratamento.

E também a Área abaixo da curva do crescimento micelial pela fórmula:

$$AACCM= \sum[(Y_i+Y_{i+1})/2] \times d_{ti}$$

onde, $\sum$ é a somatória, onde Y_i e Y_{i+1} são os valores de crescimento da colônia observados em duas avaliações consecutivas e d_{ti} o intervalo entre as avaliações.

Cada ensaio teve delineamento inteiramente casualizado, onde cada isolado fúngico encontrado foi confrontado com o seu fitopatógeno de origem, com cinco repetições. As médias obtidas foram submetidas a análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 17 isolados de fungos, associados aos escleródios de *Sclerotium rolfsii* e 23 associados aos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Todos os solos utilizados nas iscas do patógeno *S. sclerotiorum*, independente do local e sistema de cultivo, apresentaram pelo menos um isolado associado aos escleródios. No entanto, os solos de horta e mata não apresentaram nenhum isolado associado aos escleródios de *S. rolfsii* (Quadro 2). O maior número de fungos encontrados, com método de isca, foi em solo de agrossistema de lavoura de Dourados, em escleródios de *S. sclerotiorum*, o que pode ser atribuído ao fato desta área ter histórico de mofo-branco em diversas culturas implantadas. Assim, a microbiota do local pode ser rica em microrganismos capazes de gerar alguma ação antagonista ao patógeno. Apesar dos sistemas de rotação utilizarem soja, o número de isolados encontrados foi inferior ao sistema de lavoura, este fato pode ter ocorrido devido a rotação de cultura controlar *S.sclerotiorum*, e assim, reduzir o número de antagonistas agindo nestes locais. Resultado semelhante foi observado por Louzada et al. (2009), onde apenas um fungo foi encontrado em solo de mata nativa, e no cultivo de milho consorciado com *Brachiaria brizantha* este número chegou a sete, sugerindo que a intensificação do uso da terra com sistemas mais diversificado de plantio, pode aumentar a quantidade e a diversidade de fungos antagonistas.

QUADRO 2. Número de isolados de possíveis antagonistas fúngicos de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, encontrados em solos de diferentes locais e agrossistemas, através do método de Guini (1989).

Origem dos Solos	Número de isolados	
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>
Lavoura	7	3
Horta	3	0
Mata	2	0
Integração Lavoura Pecuária – Lavoura (ILPL)	3	3
Integração Lavoura Pecuária – Pecuária (ILPP)	5	4
Pastagem permanente (PP)	1	3
Plantio direto (PD)	2	4

Dos isolados encontrados associados aos escleródios de *S. rolfsii* no solo de lavoura, apenas o isolado SrL2 não apresentou inibição do crescimento do patógeno (Quadro 3). Os isolados SrL1 e SrL3 não diferiram entre si, inibindo o crescimento do

patógeno em 60,74% e 54,45%, respectivamente. As médias das notas atribuídas aos isolados variaram de 3,4 a 5, sendo que o isolado SrL3 apresentou maior crescimento sobre o patógeno (nota 5). Os resultados observados com estes isolados foram semelhantes aos observados por Dias (2011), ao estudar *Trichoderma* spp. de três solos de diferentes localidades, que apresentaram níveis de antagonismo a *S. rolfsii* variando de 66,26% a 82,42%, e grau de antagonismo, dados pela escala de Bell, variando de 2 a 3. Os diferentes potenciais de antagonismo de isolados de *Trichoderma*, encontrados em diferentes áreas, também foram observados por Lohmann et al. (2007), os quais reduziram em 67,5% com o isolado I, 65% com o isolado II e 22,5 com o isolado III o *damping off* em soja, causado por *S. rolfsii*.

QUADRO 3. Inibição do crescimento micelial (%) de *Sclerotium rolfsii*, notas e Área abaixo da curva de crescimento micelial em cultivo pareado com isolados de fungos filamentosos encontrados em solo de lavoura de Dourados-MS

Fungos isolados	%	Notas	AACCM
SrL1	60,74 a*	3,4	26,33b
SrL3	54,45 a	3,4	30,36b
SrL2	0 b	5,0	40,37a
Testemunha			44,46a
C.V.(%)	20,14		15,59

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se avaliou a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) do patógeno, foram observadas as maiores médias no SrL2 que não apresentaram diferença significativa da testemunha. Os menores valores de AACCM foram observadas nos isolados SrL1 e SrL3 (Quadro 3), em concordância aos dados de inibição do crescimento micelial do patógeno apresentada pelos isolados de lavoura.

Quanto a inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii* por possíveis antagonistas encontrados em solo de plantio direto (PD) e integração lavoura-pecuária (ILPL), os isolados que mais inibiram o crescimento do patógeno foram os isolados SrPD4 e SrILPL2, com médias de 57,89% e 56,38% de inibição, respectivamente. Os que menos inibiram o crescimento do patógeno foram os isolados SrILPL1 e SrPD3, porém não diferindo significativamente dos isolados SrILPL3, SrPD1 e SrPD2, e os mesmos não diferindo dos isolados SrPD4 e SrILPL2 (Quadro 4).

As notas atribuídas aos isolados de PD e ILPL variaram de 2,6 a 3, indicando que

os possíveis agentes de biocontrole cresceram de metade à 2/3 da placa (Quadro 4). Isaias et al. (2014), avaliando a ação antagonista de *Trichoderma* sp., constataram que 12, dos 20 isolados, apresentaram notas que variaram de 1 a 3, ou seja a maioria colonizou até metade da placa na confrontação direta com *S. rolfsii*, e oito isolados apresentaram notas 4, onde o patógeno ocupa 2/3 da placa.

Na avaliação da AACCM do patógeno, quando confrontado com os isolados de PD e ILPL, o crescimento pareado dos patógenos e com agentes de biocontrole, os resultados corroboraram com a inibição do crescimento do patógeno (Quadro 4). Assim, a menor AACCM foi observada com isolado SrILPL2, diferindo dos isolados SrPD3, SrILPL1 e da testemunha (Quadro 4). O mesmo pode ser observado por Broetto et al. (2014), que avaliando o que crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp., constataram que a AACCM da testemunha diferiu das demais, com a maior AACCM, e que as menores AACCM apresentaram inibição a *M. phaseolina* igual ou superior a 89%, inibição superior as encontradas neste trabalho.

QUADRO 4. Inibição do crescimento micelial (%) de *Sclerotium rolfsii*, notas e Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) em cultivo pareado com isolados de fungos filamentosos encontrados em solo de sistemas de plantio direto (SrPD) e integração lavoura pecuária- lavoura (SrILPL) de Maracajú-MS.

Fungos isolados	%	Notas	AACCM
SrPD4	57,89 a*	2,8	2,56 cd
SrILPL2	56,38 a	2,6	2,50 d
SrILPL3	54,18 ab	2,6	2,62 bcd
SrPD1	48,95 ab	3	2,90 bcd
SrPD2	41,53 ab	3	3,34 bcd
SrILPL1	37,98 b	3	3,50 b
SrPD3	37,81 b	3	3,46 bc
Testemunha			5,56 a
C.V.(%)	10,92		13,74

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Foi verificado que os isolados encontrados nos solos de pastagem permanente (SrPP) e integração lavoura-pecuária no momento do cultivo da pastagem (SrILPP), apresentaram diferença estatística entre si, na inibição do crescimento micelial de *S.*

rolfsii (Quadro 5). Assim, o isolado SrILPP3 apresentou maior inibição do crescimento do patógeno e a menor nota de grau de antagonismo, que indica maior crescimento na placa no momento da confrontação com o patógeno (Quadro 5). Isso indica que em sistema com maior diversidade de espécies cultivadas, o microrganismo com poder de antagonismo pode apresentar eficácia maior no controle de *S. rolfsii*. Os isolados SrILPP1 e SrILPP2 tiveram as menores porcentagens de inibição do crescimento do patógeno, apresentando médias de 23,14% e 21,87%, respectivamente, e notas 4, demonstrando que o patógeno cresceu, pelo menos, 2/3 da placa (Quadro 5).

Os isolados SrPP1, SrPP2 e SrPP3 apresentaram as segundas maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial do patógeno, não diferindo entre si (Quadro 5). Os três isolados com notas médias de 3, indicam que o patógeno e o possível antagonista crescem igualmente sobre a placa (Quadro 5). Berber (2014) demonstrou, através da presença de halo de inibição, que os isolados encontrados em pastagem apresentaram maior percentual de inibição, em comparação com diversos sistemas de cultivo, inclusive o de integração lavoura-pecuária.

Nesta avaliação pode-se notar um grau de antagonismo de microrganismos diferentes, mesmo oriundos de solo com o mesmo sistema de cultivo e cultura na no momento da coleta. Harrison e Stewart (1988), avaliando o potencial antagonista de 76 isolados de fungos, constataram que 15 desses não apresentaram qualquer efeito de inibição a *Sclerotium cepivorum*, e os restantes apresentaram inibições variadas, onde os mais promissores foram testados em confronto com o fitopatógeno. A maior inibição do crescimento do patógeno *in vitro*, encontrada pelos autores, foi de 93,3% por *Trichoderma viride*, e a mais baixa inibição foi de 44,45%, pelos fungos *Coniothyrium minitans* e *Gliocladium roseum*.

Para os isolados obtidos de solos sob pastagem permanente e integração lavoura-pecuária-pecuária, a menor AACCM do patógeno foi observada em confrontação com o isolado SrILPP3, indicando ser um isolado promissor no controle de *S. rolfsii*, visto que também apresentou maior inibição e a menor nota entre os isolados. As maiores AACCM foram observadas na testemunha, e na confrontação com os isolados SrILPP1, SrILPP2 e SrPP3. O isolado SrILL4, que não diferiu do isolado SrPP3, também apresentou resultados intermediários de AACCM, assim como na avaliação da inibição do crescimento micelial do patógeno (Quadro 5).

QUADRO 5. Inibição do crescimento micelial (%), notas e Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de *Sclerotium rolfii* em cultivo pareado com isolados de fungos filamentosos encontrados em solo de sistemas de pastagem permanente (SrPP) e integração lavoura pecuária - pecuária (SrILPP) de Maracajú-MS.

Fungos isolados	%	Notas	AACCM
SrILPP3	66,74 a*	2,2	10,16 b
SrPP1	53,27 b	3	15,00 c
SrPP2	52,97 b	3	14,85 c
SrPP3	48,27 b	3	18,39 bc
SrILPP4	32,35 c	4	16,35 c
SrILPP1	23,14 d	4	21,85 ab
SrILPP2	21,87 d	4	21,51 b
Testemunha			26,34 a
C.V.(%)	7,22		12,27

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Nos escleródios de *S. sclerotiorum*, foram encontrados 23 isolados de possíveis agentes de biocontrole, com maior ocorrência no solo de lavoura (Quadro 2).

Na avaliação da inibição do crescimento micelial do patógeno *S. sclerotiorum*, por isolados de lavoura (SsL) e mata (SsM), o SsL7 foi o que apresentou maior inibição ao patógeno, mas não diferiu dos isolados SsL4 e SrL6. O isolado que menos inibiu o crescimento do patógeno foi o SsL2, porém, este só diferiu dos isolados SsL7 e SsL4 (Quadro 6). As maiores porcentagens de inibição observadas em solo de lavoura (L), podem ser devido à grande incidência de mofo-branco na localidade, pois o solo apresenta maior atividade microbiana de antagonistas, visto que em solo de vegetação nativa a ocorrência deste patógeno foi baixa (Quadro 6). Como pode ser constatado por Silva (2013), a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC.g⁻¹) de *Trichoderma* sp. encontrada em solo com histórico de *S. sclerotiorum* foi muito superior à de solos sem histórico da enfermidade.

As notas variaram entre 2,5 e 5, sendo a menor a do isolado SsL7, indicando seu maior grau de antagonismo, e a maior nota, a do isolado SsM2, indicando que este apresentou menor grau de antagonismo (Quadro 6). Esses resultados corroboram com os obtidos por Silva (2013), em que as notas variaram de 2 a 4,6, em solo com histórico de mofo-branco nos diversos cultivos e sem histórico de ocorrência do patógeno, respectivamente.

A menor AACCM do patógeno foi observada, também, com o isolado SsL7 diferindo dos demais isolados, e ressaltando o seu potencial como agente de biocontrole do patógeno *S. sclerotiorum* (Quadro 6). A maior AACCM ocorreu com isolado SsL2, igualando-se estatisticamente a testemunha, mas diferindo dos isolados SsL4 (69,96 cm) e SsL7 (Quadro 6).

QUADRO 6. Inibição do crescimento micelial (%), notas e Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultivo pareado com isolados de fungos filamentosos encontrados em solo de sistemas de lavoura (SsL) e mata (SsM) de Dourados- MS.

Fungos isolados	%	Notas	AACCM
SsL7	82,00 a	2,5	31,50 c
SsL4	41,54 ab	3	69,96 b
SsL6	41,14 abc	3	74,70 ab
SsL5	20,43 bc	3,4	85,50 ab
SsL1	11,83 bc	3,6	90,24 ab
SsL3	10,96 bc	3,6	86,68 ab
SsM1	8,74 bc	3,8	97,02 ab
SsM2	3,54 bc	5	91,62 ab
SsL2	3,17 c	3,8	106,32 a
Testemunha			91,56 ab
C.V.(%)	51,34		20,31

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Já na avaliação dos isolados encontrados em solo de horta (H), plantio direto (PD) e integração lavoura-pecuária-lavoura (ILPL), SsH3 inibiu 81,37% o crescimento de *S. sclerotiorum*, resultado semelhante ao SsPD1, com 69,58% de inibição (Quadro 7). Resultados semelhantes foram encontrados por Ethur et al. (2005), onde os isolados de *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp., encontrados em solo de horta apresentaram maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, chegando a 96,7 % e 77% de inibição do crescimento do patógeno, respectivamente.

Na avaliação do grau de antagonismo, o isolado SsH3 apresentou a menor nota (2,5) e a maior nota foi dada pelo isolado SsH1 (4,0), corroborando as inibições dos crescimentos do patógeno apresentadas pelos isolados (Quadro 7). Em um trabalho realizado com diversos agrossistemas em diversas localidades do Brasil, incluindo solo com soja, horta, pastagem, consorcio de milheto com pastagem, autores encontraram 111 isolados de *Trichoderma* sp. que apresentaram notas menores que 3 no pareamento com

S. sclerotiorum, ou seja isolados que apresentaram 50% ou mais de inibição do crescimento do patógeno (LOUZADA et al., 2009).

Em relação as AACCM encontradas nos solos de PD, H, e ILPL, todos os isolados proporcionaram menor AACCM em relação a testemunha, indicando que todos apresentaram algum nível de inibição do crescimento micelial de *S.sclerotiorum* (Quadro 7).

QUADRO 7. Inibição do crescimento micelial (%), notas e Área abaixo do crescimento micelial (AACCM) de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultivo pareado com isolados de fungos filamentosos encontrados em solo de sistemas de horta em Dourados- MS (SsH), plantio direto (SsPD) e integração lavoura pecuária- lavoura (SsILPL) de Maracajú-MS.

Fungos isolados	%	Notas	AACCM
SsH3	81,37 a*	2,5	11,52 b
SsPD1	69,58 ab	2,8	21,42 b
SsILPL1	58,36 bc	3,2	18,41 b
SsILPL2	55,34 bc	3,0	19,44 b
SsPD2	54,22 bc	3,0	19,26 b
SsH2	50,67 bc	3,8	21,21 b
SsILPL3	47,32 bc	3,8	20,70 b
SsH1	43,06 c	4,0	20,61b
Testemunha			39,87 a*
C.V.(%)	13,67		22,93

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Avaliando o potencial de antagonismo de isolados encontrados em solos de pastagem permanente (PP) e integração lavoura-pecuária-pecuária, pode-se observar valores altos de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, mas, sendo o melhor resultado com o isolado SsILPP4, e os demais isolados não apresentaram diferença quanto ao seus potencias de inibição. As notas médias observadas indicaram também o maior grau de antagonismo do isolado SsILPP4 (2,6) e o menor grau foi observado no isolado SsILPP1 (4,0) (Quadro 8). Apesar, do único isolado encontrado em solo de pastagem permanente, apresentar mais de 50% de inibição do crescimento do patógeno, o isolado em destaque, com mais de 70% de inibição, é oriundo de solo com sistema de cultivo com maior diversidade de cultivares, fazendo com que a microbiota do solo seja mais enriquecida com microrganismos benéficos e também diminuindo a viabilidade do inoculo sem culturas hospedeiras por um período de tempo. O mesmo foi constatado por Brandão et al. (2008), que verificaram que quanto maior o tempo de utilização de ILP,

menor é a reprodução carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*, variando de 96%, 66%, 23%, em um, dois e três anos de implantação do sistema, respectivamente, e que em solos de pastagem degradada, apenas 46,67% por escleródios desenvolveram apotécios.

O isolado SsILPP4 proporcionou a menor AACCD, não diferindo do isolado SsILPP1, indicando que nesta avaliação, apresentam o mesmo grau de antagonismo (Quadro 8).

QUADRO 8. Inibição do crescimento micelial (%), notas e Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultivo pareado com isolados de fungos filamentosos encontrados em solo de sistemas de pastagem permanente (SsPP) e integração lavoura pecuária-pecuária (SsILPP) de Maracajú- MS.

Fungos isolados	%	Notas	AACCM
SsILPP4	76,94 a*	2,6	12,57 c
SsILPP3	58,56 b	3,4	20,49 bc
SsPP1	57,90 b	3,4	18,06 bc
SsILPP5	51,16 b	3,8	22,08 b
SsILPP2	49,16 b	3,8	20,51 bc
SsILPP1	44,44 b	4,0	26,19 ab
Testemunha			34,35 a*
C.V.(%)	9,64		20,94

*médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4. CONCLUSÕES

Os isolados encontrados apresentaram variação na capacidade de inibição do crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*, sendo que o isolado que apresentou maior capacidade de inibição foi oriundo de solo de sistema de cultivo de integração lavoura-pecuária, quando implantado com pastagem. Somente em solo de mata e horta não foram encontrados fungos filamentosos associados a escleródios de *Sclerotium rolfsii*, e nos demais solos foram encontrados isolados que proporcionaram 50% de inibição do crescimento do fitopatógeno.

Em todos os solos utilizados para isolamento de possíveis antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* foram encontrados, pelos menos, um fungo filamentoso associado aos escleródios, sendo o que apresentou maior capacidade de inibição foi oriundo do solo de sistema de cultivo de lavoura. Entre os solos de diferentes sistemas de cultivo, foram encontrados pelo menos um isolado que inibisse mais de 50% do crescimento do patógeno. Apenas os isolados de solo de mata não atingiram 10% de inibição ao patógeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 de dezembro, 2017.
- BERBER, G. C. M. **Sistemas integrados de produção revelando a biodiversidade fúngica antagonista a *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii* no écotono Cerrado/Amazônia**. 2014. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambientais). Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop - MT.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v.72, n.4, p.379-382, 1982.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. Doenças de plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, p.333-349.
- BRANDÃO, R. S.; PRADO, T. S.; LOBO JÚNIOR, M. **Inibição de germinação carpôgenica de *Sclerotinia sclerotiorum* em solos sob integração lavoura-pecuária com *Brachiaria ruziziensis***. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2008 (Documentos, 85).
- BROETTO, L.; ROCANTO, R. C.; MEINERZ, C. C.; DILDEY, O. D. F.; PAZDIORA, P. C.; GONÇALVES, E. D. V.; MORAES, A. J.; HENKEMEIER, P.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. S. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Candido Rondon, v.13, n. 4, p. 310-317, 2014.
- BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p.47-55, 2007.
- DIAS, P. P. **Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos de gênero *Trichoderma* e sua contribuição para o crescimento das plantas**. 2011. 101 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELO, D. J.; ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.
- GHINI, R. **Método de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagônicos a *Botrytis cinerea***. Jaguariúna. Embrapa CNPDA, 1989 (Boletim de pesquisa, 3).

HADDAD, E. P.; LEITE, G. L.; LUCON, M. C. M.; CHARAKAVA, R. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, Brasília, v.52, n.12, p. 1140-1148, 2017.

HARRISON, Y. A; STEWART, A. Selection of fungal antagonists for biological control of onion white rot in New Zealand. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, Auckland, v.16, n. 3, p. 249-256, 1988.

HUANG, H.C.; BREMER, E.; HYNES, R.K.; ERICKSON, R.S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold by dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 270-276. 2000.

HUINTER, J. E.; ABAWI, G. S.; CROISER, D.C. Effects of timing, coverage, and spray oil control of white mold of snap bean with benomyl. **Plant Disease Report**, Saint Paul, v.62, n. 7, p. 633-637, 1978.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos biotivos de *Trichoderma* spp. contra patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girrasol e soja**. Embrapa Soja, Londrina, 2005 (Comunicado técnico,76).

LOHMANN, T. R.; PAZUCH, D.; STANGARLIN, J. R.; SELZLEIN, C.; NACKER, H. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 1665- 1668. 2007.

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

LUZ, W. C. Combinação dos tratamentos biológico e químico de semente de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 37-40, 2003.

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D. C.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; SILVA, L. H. C. P.; GOUSSAIN, M. **Ensaio cooperativos de controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja: resultados sumarizados da safra 2015/2016**. Embrapa Soja, Londrina, 2016 (Circular Técnica, 124).

MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Doenças causadas por fungos e bactérias em pimentão e pimenta. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2000. p. 637- 675.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; COELHO, R.R.; CARNEIRO, J.E.S.; ANDRADE, M. J. B.; REZENDE, A. M. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009. EPAMIG-CTZM, Viçosa, 2008. 180p.

PUNJA, Z. K; RAHE, J. E. *Sclerotium*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. Saint Paul: APS PRESS, Saint Paul, 1992. p. 166-170.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

SILVA, G. B. P. **Utilização de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e no crescimento de alface**. 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.

SOUZA, T.G. **Controle de podridão por *Sclerotium rolfsii* em alho (*Allium sativum* L.) e cebola (*Allium cepa* L.) por *Trichoderma***. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de Brasília, Brasília –DF.

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

CAPÍTULO II

SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE FUNGOS FILAMENTOSOS COM POTENCIAL ANTAGÔNICO A *Sclerotinia sclerotiorum* E *Sclerotium rolfsii*.

RESUMO

O controle das doenças de plantas fica quase que exclusivamente restrito a produtos químicos, pois eles são capazes de controlar, de forma satisfatória aos produtores, as doenças e garantir a boa produtividade. Porém, seu uso pode ser prejudicial, causando a seleção de patógenos resistentes a fungicidas, surtos de doenças consideradas secundárias, alteração do meio ambiente, diminuição dos microrganismos benéficos no solo, e problemas de saúde animal, vegetal e humana. Uma das maneiras de se diminuir o uso de agrotóxicos é a adoção de diversos métodos de controle ao mesmo tempo, ou seja, um manejo integrado. Uma alternativa é o uso do controle biológico, através de fungos antagonistas, associado ao controle químico com agrotóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos principais fungicidas utilizados no controle de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, no crescimento de fungos antagonistas isolados de escleródios destes fitopatógenos. Foi avaliada a compatibilidade de 11 isolados de biocontrole associados de escleródios de *S. rolfsii*, e 17 isolados de biocontrole de *S. sclerotinia*, de solos de diferentes sistemas de agricultura. Os fungicidas testados foram tiofanato metílico, iprodiona e procimidona, nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 500 e 1000 ppm. Foi calculada a inibição do crescimento micelial e a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) dos isolados biocontroladores com a presença dos fungicidas, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Com base na inibição do crescimento micelial, foram estimados os valores da concentração inibitória de 50% (CI₅₀), e com base na área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) foram estimados os valores da concentração inibitória mínima (CIM). O fungicida tiofanato metílico foi o que mais inibiu o desenvolvimento dos isolados antagonistas de ambos fitopatógenos. Na avaliação da inibição e AACCM o isolado antagonista de *S. rolfsii*, SrL1 foi o menos sensível às concentrações médias dos fungicidas. Nas mesmas avaliações realizadas nos isolados antagonistas de *S. sclerotiorum*, o isolado com maior compatibilidade aos três fungicidas foi SsH1. As CI₅₀ e CIM dos isolados antagonistas de *S. rolfsii*, os classificaram como moderadamente sensíveis a insensíveis aos fungicidas. As avaliações de CI₅₀ e CIM dos isolados antagonistas de *S. sclerotiorum*, os classificaram como insensíveis, pouco sensíveis, moderadamente sensíveis aos fungicidas, e apenas o isolado SsPD1 foi classificado como altamente sensível ao fungicida procimidona.

Palavras-chaves: Controle biológico, controle químico, antagonismo

SENSITIVITY TO FUNGICIDES OF FILAMENTAL FUNGI WITH ANTAGONIC POTENTIAL TO *Sclerotinia sclerotiorum* AND *Sclerotium rolfsii*.

ABSTRACT

Control of plant diseases is almost exclusively restricted to chemicals, as they are able to control disease efficiently and ensure good productivity. However, its use may cause damage to the selection of pathogens resistant to fungicides, outbreaks of secondary diseases, alteration of the environment, reduction of beneficial microorganisms in the soil, and cause animal, plant and human health problems. One of the ways to reduce the use of chemical control is the adoption of several methods of control at the same time, that is, an integrated management. An alternative is the use of biological control, through antagonistic fungi, associated with chemical control. The objective of this work was to evaluate the effect of the main fungicides used in the control of *S. rolfsii* and *S. sclerotiorum*, on the growth of antagonists isolated from sclerotia of phytopathogens. The compatibility of 11 biocontrol isolates associated with *S. rolfsii* sclerotia and 17 *S. sclerotinia* biocontrol isolates from soils of different farming systems with methyl thiophanate, iprodione and procymidone at concentrations of 0.1, 10, 100, 500 and 1000 ppm. Inhibition of mycelial growth and area under the mycelial growth curve (AACCM) of the biocontrol isolates with the presence of the fungicides, were calculated. Based on the inhibition of mycelial growth, the values of 50% inhibitory concentration (IC 50) were estimated, and based on the area under the mycelial growth curve (AACCM), minimum inhibitory concentration (MIC). The fungicide methyl thiophanate was the one that most inhibited the development of the antagonistic isolates of both phytopathogens. In the evaluation of inhibition and AACCM, the isolate of *S. rolfsii* (SrL1) was the least sensitive to the average concentrations of the fungicides. In the same evaluations carried out in the *S. sclerotiorum* antagonists, the isolate with the highest compatibility with the three fungicides was SsH1. The IC 50 and MIC of the isolates of *S. rolfsii*, classified them as moderately sensitive to insensitive to fungicides. The IC50 and MIC determinations of isolates of *S. sclerotiorum* antagonists classified them as insensitive, non-sensitive, moderately sensitive to fungicides, and only the isolate SsPD1 was classified as being highly sensitive to the fungicide procymidone.

Keywords: Biological control, chemical control, antagonism

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é a principal fonte de alimento para o mundo inteiro e, com o aumento da população mundial, as técnicas para obtenção de maiores produtividades de alimentos devem acompanhar este ritmo, para suprir as necessidades geradas com crescimento populacional e não haver um déficit de suprimentos. A ocorrência de doenças em plantas cultivadas é um fator grave de limitação para a produção, sendo os fitopatógenos responsáveis por 13,3% de perdas (KREYCI E MENTEN, 2013). Na maioria das doenças, o controle fica quase que exclusivamente restrito a produtos químicos, pois eles são capazes de controlar eficientemente as doenças e garantir a boa produtividade. Porém, seu uso pode causar danos, como seleção de patógenos resistentes a fungicidas, surtos de doenças consideradas secundárias, alteração do meio ambiente, diminuição dos microrganismos benéficos no solo, e causar problemas de saúde animal, vegetal e humano (GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 2000).

Uma das maneiras de se diminuir o uso de agrotóxicos é a utilização de várias medidas de controle ao mesmo tempo, ou seja, um manejo integrado. Meyer et al. (2013) citam o uso de diversos meios para se controlar o mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, na cultura da soja, como a escolha de cultivares com arquitetura de plantas que favoreça uma boa aeração entre plantas (pouco ramificadas e com folhas pequenas) e com período de florescimento mais curto; emprego de controle biológico através da infestação do solo com agentes antagonistas e limpeza de máquinas e equipamentos após utilização em área infestada para evitar a disseminação de escleródios, associados ao controle químico com pulverizações na época e quantidades adequadas.

Uma medida que pode ser empregada no controle integrado de doenças de plantas, e ter maior aceitação pelo produtor, é o uso de controle biológico, através de fungos antagonistas, associado ao controle químico. Esse método já vem sendo empregado, porém, ainda há poucas informações sobre os microrganismos, produtos e concentrações a serem utilizadas e por isso não se consegue a eficiência desejada. O conhecimento sobre esta técnica é de extrema importância, visto que os produtos químicos podem inibir o crescimento do antagonista, ou modificar sua forma de ação, dificultando o biocontrole dos fitopatógenos. Sarkar et al. (2010) observaram que alguns fungicidas inibiram o crescimento do antagonista *Trichoderma* sp. mesmo nas menores concentrações, porém, outros não afetaram o antagonista em determinadas concentrações, e constatando, também, que os fungicidas de contato foram menos tóxicos

aos antagonistas do que os sistêmicos.

O principal objetivo da associação do controle químico com biopesticidas é diminuir a quantidade utilizada de agrotóxico, sem afetar a eficácia no controle do fitopatógeno. O sucesso do controle integrado pode ser observado por Conway (1997), que conseguiu controlar *Rhizoctonia solani* reduzindo pela metade a aplicação de agrotóxico, associando-o com o antagonista *Laetisaria arvalis*.

A fim de otimizar a utilização do método de associação, a compatibilidade entre fungicidas e antagonistas deve ser estudada com maior complexidade. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito dos principais fungicidas utilizados no controle de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*, no crescimento de isolados antagonistas dos fitopatógenos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul.

Os fungos antagonistas utilizados neste experimento foram oriundos de experimentos prévios e que apresentaram potencial de inibição de 40% ou mais, aos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial N x 3 x 5, com cinco repetições, sendo N o número de isolados de fungos antagonísticos, selecionados previamente, três fungicidas: tiofanato metílico, iprodiona, procimidona (AGROFIT, 2017) em cinco concentrações (1, 10, 100, 500 e 1000 ppm do i.a), e testemunha em meio BDA sem fungicida (Quadro 1).

QUADRO 1. Fungicidas registrados para controle de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, avaliados nos ensaios de sensibilidade de isolados de fungos agentes de biocontrole.

Nome Comercial	Ingrediente ativo (i.a)	Grupo Químico	Concentração i.a (g. L ⁻¹)
Cercobin 700 WP	Tiofanato metílico	Precursor de Benzimidazol	700
Rovral 500 SC	Iprodiona	Dicarboximida	500
Sumilex 500 WP	Procimidona	Dicarboximida	500

Fonte: AGROFIT, 2017

Foram avaliados 11 isolados antagonistas a *S. rolfsii* selecionados na etapa anterior, com os fungicidas iprodiona e procimidona, e 10 isolados com tiofanato metílico, pois um dos isolados não apresentou crescimento micelial durante o período experimental. E 17 isolados antagonistas de *S. sclerotiorum*, com os fungicidas iprodiona, procimidona e tiofanato metílico (Quadro 2).

Os produtos foram diluídos em meio de cultura BDA fundente e o meio vertido para placas de Petri de 85 mm de diâmetro. No centro do meio de cultura, em sua superfície, foram transferidos discos de micélio dos isolados antagonistas, e a testemunha consistiu apenas do meio de cultura BDA, para cada isolado antagonista, e as placas incubadas em BOD por 8 dias, regulada para fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C.

QUADRO 2. Isolados antagonistas testados quanto aos seus potenciais de crescimento associados a fungicidas.

Origem dos Solos	Número de isolados	
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>
Lavoura	SsL4 - SsL6 - SsL7	SrL1 - SrL3
Horta	SsH1 - SsH2 - SsH3	0
Mata	0	0
Integração Lavoura Pecuária – Lavoura (ILPL)	SsILPL1- SsIPL2 - SsILPL3	SrILPL2 - SrILPL3
Integração Lavoura Pecuária – Pecuária (ILPP)	SsILPP 1-2 - 4- 5	SrILPP4
Pastagem permanente (P.P)	SsPPP1	SrPPP1- SrPPP2 - SrPPP3
Plantio direto (P.D)	SsPD1 - SsPD2	SrPD1- SrPD3 - SrPD4

As avaliações foram realizadas medindo-se o diâmetro da colônia do fungo, a cada 48 horas, em dois sentidos perpendiculares, obtendo-se a média do crescimento micelial da colônia em cada avaliação. Foi calculada a inibição do crescimento micelial (%) do fungo através da fórmula:

$$I=[(CrTest-CrTrat)/CrTest] \times 100$$

onde Cr: crescimento; Test: testemunha e Trat: tratamento.

E a área abaixo da curva do crescimento micelial para cada ingrediente ativo e concentração pela fórmula:

$$AACCM = \sum [(Y_i + Y_{i+1})/2] \times d_{ti}$$

onde, $\sum$ é a somatória, onde Y_i e Y_{i+1} são os valores de crescimento da colônia observados em duas avaliações consecutivas e d_{ti} o intervalo entre as avaliações.

Dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias, em função do número de isolados e fungicidas, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, e análise de regressão em função das concentrações de fungicidas. Com as equações encontradas para inibição do crescimento micelial em função da concentração de fungicidas, calculou-se a concentração que resulta em 50% da inibição (CI_{50}). Em relação aos dados crescimento do patógeno (AACCM), foi calculada a concentração que resultou em mínimo crescimento (CIM), igualando-se a primeira derivada da equação a zero.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Compatibilidade de fungicidas com isolados agentes de biocontrole de *S. rolfsii*

Sobre a avaliação da inibição do crescimento dos isolados potencialmente antagonistas pelos fungicidas, houve uma interação entre os isolados, fungicidas e concentrações.

O fungicida tiofanato metílico proporcionou as maiores médias de inibição, ou seja, mostrou-se mais fungitóxico aos agentes de biocontrole de *S. rolfsii*, com exceção nos isolados SrPD1 e SrL1. Causando maior interferência no crescimento do isolado SrPD2 e SrILPL2. O isolado que menos teve seu crescimento afetado pelo fungicida foi o isolado SrL1, porém apresentou maior sensibilidade com a ação de procimidona (Quadro 3).

O iprodiona proporcionou maior inibição do crescimento micelial do isolado oriundo de solo de sistema de plantio direto SrPD1, entretanto, o isolado menos afetado pela ação do fungicida foi no isolado SrPP2. Semelhante ao fungicida iprodiona, procimidona afetou mais o isolado SrPD1, porém, as médias de inibição não diferiu dos isolados SrL1 e SrILPL3 (Quadro 3).

Os isolados se comportaram de maneira diferente em relação aos fungicidas, o isolado SrL1 foi o menos sensível a dois, dos três fungicidas utilizados na avaliação, ou seja, na associação do controle biológico e controle químico com iprodiona, procimidona e tiofanato metílico, o isolado apresenta maior capacidade de se desenvolver e controlar a doença. Segundo Ávila et al. (2005), os ingredientes ativos dos fungicidas podem apresentar interferências diferentes no desenvolvimento e nos mecanismos de ação dos agentes de biocontrole, por este motivo, é importante avaliar a compatibilidade dos fungicidas com os fungos antagonistas, garantindo, assim, o sucesso do uso deste dois métodos de controle em conjunto.

Silva et al. (2014) constataram que a concentração de 1 ppm de tiofanato metílico não interferiu no crescimento de *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* e *T. viride*, porém, quando as concentrações aumentaram para 10 ppm do ingrediente ativo, as inibições atingiram 90,1%, 87,4% e 59,4%, respectivamente.

QUADRO 3. Inibição do crescimento micelial dos isolados antagonistas de *S. rolfsii*, pelos fungicidas tiofanato metílico, iprodiona e procimidona.

Isolados antagonistas de <i>S. rolfsii</i>	Fungicidas		
	Tiofanato metílico	Iprodiona	Procimidona
SrPD2	73,76 aA*	53,52 bB	46,35 bC
SrILPL2	70,61 abA	44,74 cdB	47,35 bB
SrILPL3	68,18 bcA	48,24 cB	30,68 fC
SrPP1	67,63 bcA	46,29 cB	41,45 cdC
SrPD1	66,18 cdB	70,06 aA	60,27 aC
SrL3	65,18 cdA	47,02 cB	40,41 dC
SrPP2	63,10 dA	25,34 fC	45,42 bcB
SrPP3	62,26 dA	34,31 eC	43,11 bcdB
SrPD4	57,25 eA	41,41 dB	34,92 eC
SrL1	20,58 fC	36,67 eA	30,14 fB
C.V.(%)	6,66		

*Médias seguidas por letras iguais minúsculas nas colunas, e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se avaliou a AACCM dos isolados com fungicida tiofanato metílico, houve uma interação significativa entre os isolados encontrados no fungo *S. rolfsii* e as concentrações utilizadas, demonstrando que cada isolado foi dependente das concentrações utilizadas. Na ausência de tiofanato metílico e na concentração de 1 ppm, isolados com as maiores médias de AACCM foram SrDP1, SrPP1, SrILPL2, SrILPL3, contudo, não apresentando diferença do SrPP2 na avaliação da testemunha. As menores AACCM foram observados nos SrPD2, SrL1 e SrPD4, e o isolado SrPD2 apresentou a menor AACCM observada na concentração de 1 ppm. Nas concentrações mais elevadas SrL1 apresentou menor sensibilidade ao produto, com a maior AACCM. As menores AACCM dos isolados na concentração de 10 ppm, foram observadas nos isolados SrPD2 e SrL3. Utilizando a concentração de 100 ppm, os isolados mais afetados pelo produto, apresentando as menores AACCM foram SrILPL2, SrILPL3, SrPD1, SrPD2, SrPP1, SrPP2, SrPP3 e SrL3. Com a segunda maior concentração (500 ppm), as menores AACCM se deram nos mesmos isolados da concentração 100, acrescentando apenas o isolado SrPD4, que apresentou média intermediária na concentração de 100 ppm. Na concentração mais alta os isolados se comportaram de maneira semelhante às concentrações de 100 e 500 ppm (Quadro 4).

QUADRO 4. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) dos isolados antagonistas de *S.rolfsii* associados ao fungicida tiofanato metílico.

Isolados S. r	Concentrações de tiofanato metílico (ppm)					
	0	1	10	100	500	1000
SrPD1	849,60 a	865,20 a	273,84 bc	85,20 c	88,32 c	76,24 c
SrPP1	808,32 a	768,96 bc	238,32 c	95,04 c	104,88 c	89,76 c
SrILPL2	805,20 a	744,48 bc	286,32 bc	72,00 c	72,00 c	72,00 c
SrILPL3	804,72 a	804,24 ab	221,76 c	72,00 c	72,00 c	72,00 c
SrPP2	795,60 a	724,32 cd	261,60 bc	106,80 c	202,56 b	171,12 b
SrPP3	687,84 b	670,32 cd	229,92 c	101,52 c	128,64 bc	113,28 bc
SrL3	674,40 b	700,32 cd	118,32 d	116,40 c	87,60 c	101,04 bc
SrL1	659,04 bc	611,28 ef	539,52 a	503,04 a	439,20 a	481,68 a
SrPD4	623,76 bc	594,00 f	314,40 b	224,88 b	79,92 c	85,68 c
SrPD2	595,44 c	352,56 g	104,40 d	124,32 c	117,60 c	110,16 bc
C.V.(%)	10,62					

*Médias seguidas por letras minúsculas nas coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na avaliação do comportamento dos isolados nas diferentes concentrações do fungicida iprodiona, pode-se observar que o isolado SrILPL3 mostrou-se menos sensível, com as maiores médias de AACCM nas concentrações de 1, 10 e 1000 ppm. Porém, na concentração de 10 ppm de i.a, este isolado não apresentou diferença dos isolados SrL1 e SrPP2. Nas concentrações de 100 e 500 ppm, os isolados com menores sensibilidades, apresentando maiores AACCMs, foram os isolados SrPP2 e SrPP3. Na ausência do fungicida, ou seja na testemunha, os isolados que apresentaram as menores AACCMs foram SrILPP3 e SrILPL2. O isolado com maior sensibilidade ao produto foi SrPD1, que apresentou menor crescimento em todas as concentrações, igualando-se apenas a SrILPP3 em 100 ppm (Quadro 5).

O isolado que apresentou maior AACCM foi o isolado SrILPL3, na ausência e independente da concentração do fungicida procimidona, indicando que mesmo com a utilização do produto, este isolado tem maior crescimento em relação aos demais, porém, na concentração máxima utilizada o isolado não apresentou diferença na AACCM dos isolados de lavoura SrL1 e SrL3. Entre os isolados, a menor AACCM na ausência de procimidona foi observada no isolado SrILPP3; comportamento esse semelhante ao da concentração mínima utilizada de 1 ppm. Na concentração de 10 ppm as menores AACCM foram nos isolados SrPD1, SrPP2, SrILPL2, sendo que o isolado SrPD1 também apresentou-se mais sensível nas concentrações de 100, 500 e 1000 ppm, não apresentando diferença do isolado SrPD2 na concentração de 100 ppm (Quadro 6).

QUADRO 5. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) dos isolados antagonistas de *S. rolfsii* associados ao fungicida iprodiona.

Isolados S. r	Concentrações de iprodiona (ppm)					
	0	1	10	100	500	1000
SrILPL3	936,24 a	898,32 a	400,56 a	348,24 b	329,42 b	333,60 a
SrPP1	761,28 b	765,36 b	340,80 cde	260,88 c	272,88 c	239,76 bc
SrL3	689,52 c	669,84 cd	344,40 bcd	237,84 cd	235,92 cd	236,76 bc
SrPD2	667,20 cd	625,92 d	229,20 g	260,16 c	191,04 d	192,00 c
SrL1	664,08 cd	681,84 c	366,24 abc	259,68 c	277,92 bc	351,60 a
SrPD4	636,72 cde	624,24 d	286,08 ef	335,52 b	243,36 cd	270,72 b
SrPP3	636,24 cde	619,92 d	277,68 fg	360,72 b	396,48 a	343,20 a
SrPP2	619,44 def	621,12 d	398,88 ab	435,36 a	399,84 a	395,52 a
SrPD1	583,20 ef	364,80 f	128,40 h	148,56 e	130,80 e	123,60 d
SrILPL2	569,04 fg	552,48 e	301,68 def	236,40 cd	208,80 d	193,68 c
SrILPP3	516,24 g	531,60 e	273,60 fg	197,52 de	244,08 cd	228,48 bc
C.V.(%)	6,81					

*Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

QUADRO 6. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) dos isolados antagonistas de *S.rolfsii* associados ao fungicida procimidona.

Isolados S. r	Concentrações de procimidona (ppm)					
	0	1	10	100	500	1000
SrILPL3	908,40 a	889,80 a	589,44 a	580,32 a	517,92 a	442,80 a
SrPD1	858,96 b	732,48 bc	283,68 g	242,88 h	211,44 g	224,16 e
SrL3	839,52 b	765,84 b	420,00 cd	426,72 bc	424,56 b	404,88 a
SrL1	768,24 c	752,64 b	477,84 b	455,04 b	453,12 b	429,60 a
SrPP2	727,92 cd	691,68 cd	307,68 fg	312,00 ef	297,36 def	297,60 cd
SrPP1	726,96 cd	670,32 d	384,48 de	344,64 de	321,12 de	326,40 bc
SrPD2	717,60 d	684,96 d	347,76 ef	261,36 gh	279,36 ef	269,04 d
SrPP3	716,88 d	676,80 d	344,40 ef	324,24 ef	321,12 de	298,08 cd
SrILPL2	714,24 d	673,92 d	321,60 fg	296,16 fg	260,40 f	258,24 d
SrPD4	704,40 d	665,04 d	431,76 c	385,08 cd	382,08 c	362,16 d
SrILPP3	659,10 e	610,80 e	340,08 f	333,90 ef	317,70 de	319,20 c
C.V.(%)	4,30					

*Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram testados modelos lineares e quadráticos, mas só foram obtidos ajustes em função do logaritmo da concentração. Segundo dados da literatura, a sensibilidade de patógenos frente a fungicidas é classificada de acordo com os critérios de Edgington et al (1971), como altamente sensíveis ($CI_{50} < 1$ ppm); moderadamente sensíveis (CI_{50} de 1-10 ppm); pouco sensíveis (CI_{50} 10-50 ppm) e insensíveis ($CI_{50} > 50$ ppm). Apesar de

antiga, esta escala é usada na atualidade e de forma geral para fungicidas, com diferentes modo de ação (REIS et al.,2016).

Em relação a inibição do crescimento micelial e a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) dos isolados agentes de biocontrole de *S. rolfsii*, por tiofanato metílico, o isolado SrPD2, mostrou-se o mais sensível ao fungicida, apresentando inibição de 50% do crescimento (CI₅₀) com a menor concentração encontrada, o mesmo observado na avaliação da AACCM do isolado, com a concentração mínima inibitória (CIM) inferior as demais concentrações, contudo, sendo classificado como moderadamente sensível à tiofanato metílico. O isolado com menor interferência da ação do fungicida foi o isolado SrPD4, apresentando inibição de 50% do crescimento na concentração mais alta, em relação aos demais isolados avaliados, assim, classificado como pouco sensível ao fungicida, e uma concentração inibitória mínima da AACCM, superior a 1000 ppm, ultrapassando as doses testadas neste trabalho, demonstrando ser o isolado com maior compatibilidade com o fungicida tiofanato metílico (Quadro 7 e 8). Ribas (2010) relata que isolados do gênero *Trichoderma* spp. não apresentaram nenhuma interferência no seu crescimento com concentrações múltiplas e 0,25; 0,5; 1 e 2 ppm de tiofanato metílico, e partir da concentração múltipla de 2 ppm, os isolados T16 e T20 estabeleceram uma relação linear de decréscimo do crescimento vegetativo.

QUADRO 7. Concentração inibitória de 50% (CI₅₀) do crescimento micelial de isolados antagonistas de *S. rolfsii* em relação as concentrações de tiofanato metílico.

Isolados	Equação de regressão	R ²	CI ₅₀ (ppm)
SrPD2	$\bar{y} = -12,635x^2 + 53,613x + 30,111^*$	0,84	1,57
SrL3	$\bar{y} = -25,891x^2 + 111,681x - 23,232$	0,89	5,41
SrPP2	$\bar{y} = -22,699x^2 + 97,392x - 15,552$	0,96	5,85
SrPP1	$\bar{y} = -22,147x^2 + 100,756x - 19,129$	0,97	5,94
SrILPL3	$\bar{y} = -24,579x^2 + 111,295x - 26,530$	0,97	6,01
SrILPL2	$\bar{y} = -20,218x^2 + 95,931x - 17,669$	0,99	6,28
SrPD1	$\bar{y} = -23,156x^2 + 106,957x - 26,312$	0,98	6,62
SrL1	$\bar{y} = 8,116x + 7,179$	0,87	6,67
SrPP3	$\bar{y} = -22,580x^2 + 101,270x - 22,376$	0,97	6,80
SrPD4	$\bar{y} = -8,616x^2 + 57,508x - 8,659$	0,97	17,05

QUADRO 8. Concentração inibitória mínima (CIM) correspondente a Área abaixo do crescimento micelial (AACCM) de isolados de fungos filamentosos de *S. rolfii* em relação as concentrações de tiofanato metílico.

Isolados	Equação de regressão	R ²	CIM AACCM (ppm)
SrPD2	$\bar{y} = 116,031x^2 - 475,957x + 536,269^*$	0,91	111,46
SrPP2	$\bar{y} = 152,442x^2 - 666,707x + 836,424$	0,97	152,73
SrL3	$\bar{y} = 139,911x^2 - 623,840x + 739,336$	0,91	168,60
SrPP3	$\bar{y} = 120,304x^2 - 562,062x + 738,629$	0,96	215,78
SrPP1	$\bar{y} = 143,971x^2 - 680,330x + 861,167$	0,97	229,53
SrILPL3	$\bar{y} = 149,349x^2 - 710,036x + 876,940$	0,96	237,29
SrPD1	$\bar{y} = 146,179x^2 - 717,138x + 931,278$	0,96	261,93
SrILPL2	$\bar{y} = 130,434x^2 - 648,089x + 852,141$	0,98	304,04
SrL1	$\bar{y} = 22,085x^2 - 128,775x + 654,045$	0,96	823,08
SrPD4	$\bar{y} = 41,4776x^2 - 311,646x + 641,807$	0,98	>1000

Com a utilização de iprodiona, o isolado SrPP2 apresentou a menor CI₅₀ entre os isolados avaliados, com uma sensibilidade moderada ao fungicida. Já, a maior concentração, que inibiu 50% do crescimento micelial, foi para o isolado SrPP3 mostrando uma baixa sensibilidade ao produto (Quadro 9). Silva et al. (1999), observaram que a partir das concentrações de 1 µg/mL e 2,5 µg/mL, iprodiona inibiu mais 55% do crescimento vegetativo e esporulação de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, respectivamente. Este fungicida pode não ser indicado para associação com controle biológico.

Diferentemente do que ocorreu com tiofanato metílico, com o fungicida iprodiona, os isolados se comportaram de maneira diferente em relação as avaliação de inibição a 50% (CI₅₀) e AACCM (CIM). Na avaliação de CIM, o isolado SrPP3 apresentou a menor concentração encontrada entre os isolados, demonstrando ter maior sensibilidade a Iprodiona. Já, o isolado com menor sensibilidade ao produto foi o isolado SrILPL2, corroborando com sua CI₅₀ (Quadro 9 e 10).

Na avaliação da sensibilidade dos isolados de biocontrole a procimidona, a CI₅₀ mais baixa observada foi do isolado SrPD1, mostrando-se moderadamente sensível ao fungicida, com uma CIM intermediária em relação aos demais isolados. O isolado com menor sensibilidade a este fungicida, em relação a avaliação de CI₅₀ é o isolado SrILPL3, classificado com insensível, apresentando a segunda menor concentração de CIM (Quadros 11 e 12). Tratando-se na avaliação de CIM da AACCM, a maior sensibilidade à ação do fungicida, foi observada no isolado SrL3, o isolado menos sensível foi SrPD4. Paula Júnior et al. (2009), avaliando a sensibilidade de espécies de *Trichoderma* aos

fungicidas procimidona, tiofanato metílico, fluazinam, fluazinam+ tiofanato metílico, carbendazim, fludioxonil e cloreto benzalcônio, com concentrações de 10, 100 e 1000 ppm, observaram que os fungicidas são altamente tóxicos aos antagonistas, inibindo o crescimento micelial dos mesmo, porém, com exceção de fludioxonil e cloreto benzalcônio, pois estes possibilitaram o crescimento de *Trichoderma* spp. nas concentrações de 1000 ppm.

QUADRO 9. Concentração inibitória de 50% (CI₅₀) do crescimento micelial de isolados antagonistas de *S. rolfsii* em relação as concentrações de iprodiona.

Isolados	Equação de regressão	R ²	CI ₅₀ (ppm)
SrPP2	$\bar{y} = -7,278x^2 + 35,244x - 3,815^*$	0,77	1,29
SrPD1	$\bar{y} = -11,672x^2 + 50,797x + 27,508$	0,84	2,16
SrPD2	$\bar{y} = -15,920x^2 + 72,648x - 7,958$	0,85	9,73
SrILPL3	$\bar{y} = -17,177x^2 + 76,058x - 13,163$	0,93	11,81
SrPP1	$\bar{y} = -17,623x^2 + 79,791x - 17,788$	0,94	12,59
SrL3	$\bar{y} = -16,197x^2 + 74,696x - 15,526$	0,98	14,08
SrL1	$\bar{y} = -19,742x^2 + 82,384x - 22,048$	0,99	16,68
SrILPL2	$\bar{y} = -12,803x^2 + 63,314x - 12,025$	0,96	21,18
SrPD4	$\bar{y} = -13,476x^2 + 61,829x - 9,165$	0,82	21,91
SrPP3	$\bar{y} = -15,925x^2 + 62,728x - 7,878$	0,66	28,86

QUADRO 10. Concentração inibitória mínima (CIM) correspondente a Área abaixo do crescimento micelial (AACCM) de isolados de fungos filamentosos de *S. rolfsii* em relação as concentrações de iprodiona.

Isolados	Equação de regressão	R ²	CIM AACCM (ppm)
SrPP3	$\bar{y} = 89,92x^2 - 355,29x + 652,78$	0,79	94,53
SrPD1	$\bar{y} = 104,58x^2 - 436,49x + 530,25$	0,91	122,16
SrL1	$\bar{y} = 98,35x^2 - 423,51x + 719,99$	0,94	142,30
SrILPP3	$\bar{y} = 71,19x^2 - 317,58x + 555,87$	0,93	170,05
SrILPL3	$\bar{y} = 132,79x^2 - 604,36x + 976,89$	0,95	188,72
SrPD2	$\bar{y} = 94,14x^2 - 438,31x + 684,71$	0,92	212,77
SrPD4	$\bar{y} = 72,62x^2 - 343,37x + 657,14$	0,88	231,28
SrPP1	$\bar{y} = 103,63x^2 - 491,34x + 809,94$	0,94	234,81
SrL3	$\bar{y} = 87,39x^2 - 422,04x + 725,82$	0,97	259,76
SrPP2	$\bar{y} = 40,08x^2 - 200,60x + 632,32$	0,85	318,15
SrILPL2	$\bar{y} = 57,29x^2 - 300,49 + 591,62$	0,97	419,34

Duarte et al (2006) relataram que os fungicidas iprodiona e procimidona, na concentração de 0,2% do produto comercial, promoveram uma redução de 72,2% e 74,6% do crescimento micelial de *S. rolfsii*, respectivamente. Isso indica que há uma possibilidade de associação dos isolados encontrados neste trabalho com o iprodiona e

procimidona, nas doses eficientes para o fitopatógeno sem causar fungitoxidade aos antagonistas avaliados.

QUADRO 11. Concentração inibitória de 50% (CI₅₀) do crescimento micelial de isolados antagonistas de *S. rolfsii* em relação as concentrações de procimidona.

Isolados	Equação de regressão	R ²	CI ₅₀ (ppm)
SrPD1	$\bar{y} = -16,624x^2 + 74,004x - 1,932$	0,93	6,46
SrPP2	$\bar{y} = -16,525x^2 + 71,117x - 10,047$	0,88	13,24
SrPD2	$\bar{y} = -16,406x^2 + 73,143x - 13,201$	0,96	13,87
SrILPL2	$\bar{y} = -14,657x^2 + 67,030x - 8,996$	0,92	14,47
SrPD4	$\bar{y} = -10,328x^2 + 47,936x - 5,515$	0,95	14,77
SrPP3	$\bar{y} = -14,188x^2 + 63,080x - 7,983$	0,90	18,88
SrPP1	$\bar{y} = -12,349x^2 + 56,270x - 5,101$	0,94	25,58
SrL3	$\bar{y} = -12,586x^2 + 54,338x - 2,419$	0,87	27,51
SrL1	$\bar{y} = -10,850x^2 + 48,803x - 8,543$	0,91	45,52
SrILPL3	$\bar{y} = -6,165x^2 + 35,344x - 3,891$	0,88	>100

QUADRO 12. Concentração inibitória mínima (CIM) correspondente a Área Abaixo do Crescimento micelial (AACCM) de isolados de fungos filamentosos de *S. rolfsii* em relação as concentrações de procimidona.

Isolados	Equação de regressão	R ²	CIM AACCM (ppm)
SrL3	$\bar{y} = 101,043x^2 - 438,444x + 846,208^*$	0,94	144,54
SrILPL3	$\bar{y} = 47,969x^2 - 290,194x + 920,063$	0,95	147,91
SrPP2	$\bar{y} = 103,649x^2 - 453,759x + 752,043$	0,93	154,88
SrILPP3	$\bar{y} = 76,941x^2 - 341,341x + 669,305$	0,95	165,96
SrPD1	$\bar{y} = 139,015x^2 - 621,164x + 864,427$	0,97	169,82
SrPP3	$\bar{y} = 88,690x^2 - 404,181x + 735,762$	0,94	186,21
SrPD2	$\bar{y} = 96,185x^2 - 442,095x + 748,863$	0,97	199,53
SrPP1	$\bar{y} = 81,444x^2 - 377,002x + 739,261$	0,97	204,17
SrL1	$\bar{y} = 68,428x^2 - 317,568x + 789,89$	0,94	208,93
SrILPL2	$\bar{y} = 90,062x^2 - 422,579x + 735,441$	0,95	223,87
SrPD4	$\bar{y} = 63,464x^2 - 302,261x + 716,922$	0,97	239,88

Cada isolado antagonista se comportou de maneira distinta frente as concentrações utilizadas de cada fungicida, demonstrando diferença de sensibilidade a ação dos produtos químicos através da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e concentração inibitória mínima para AACCM (CIM), ou seja, cada isolado se mostrou mais ou menos sensível dependendo do produto e da concentração do mesmo. O modo de ação do fungicida pode ter interferido na inibição do crescimento dos isolados encontrados em diferentes localidades e sistemas de plantio. O fungicida tiofanato metílico tem o modo de ação

sistêmico, que atua na divisão celular e na mitose, inibindo a armação de β -tubulina para formação dos microtubulos que fazem parte do citoesqueleto, durante a metáfase no processo de mitose. Já, iprodiona e procimidona, apesar de apresentarem ingredientes ativos diferentes, e modo de ação diferente, de contato e sistêmico, fazem parte do mesmo grupo químico, com mecanismo de ação relacionado com a peroxidação dos lipídios, interagindo com a enzima flavina-redutase do citocromo-c, e o transporte de elétrons de NADPH para o citocromo-c seria bloqueado pela ação do fungicida, atuando na germinação dos esporos e impedindo o crescimento micelial dos fungos (EHR e KEMMITT, 2002; REIS et al., 2016).

3.2 - Compatibilidade de fungicidas com isolados agentes de biocontrole de *S. sclerotiorum*

As maiores porcentagens de inibição do crescimento dos isolados biocontroladores de *S. sclerotiorum* foram observadas na utilização do fungicida tiofanato metílico, com exceção no isolado SsH1, que foi mais sensível a procimidona. Segundo Zambolim et al. (2007), *Trichoderma*, tido como o fungo antagonista mais importante de fitopatógenos, geralmente não é resistente aos fungicidas que tem a forma de ação sobre as estruturas das β -tubulinas, como é o caso de tiofanato metílico, corroborando com o trabalho de Gowdar et al (2006), onde *T. harzianum* foi incompatível com tiofanato metílico e carbendazim, pois houve uma inibição de 100% do fungo após 72 horas de contato com os fungicidas. O isolado SsPD1 mostrou-se mais sensível ao efeito dos produtos utilizados, e maior inibição do crescimento com procimidona. Além de SsPD1, com tiofanato metílico outros isolados apresentaram as maiores inibições do crescimento micelial, como SsPP1, SsL7, SsL6, SsILPL2, SsH3 e SsILPL3, não diferindo entre si, e com iprodiona os isolados com maior inibição do crescimento foram SsH3 e SsL6, que não diferiram de SsPD1 (Quadro 13).

O isolado SsH1 foi o que teve o crescimento micelial menos afetado com a ação dos fungicidas tiofanato metílico e iprodiona. Com procimidona o isolado SsH1 não apresentou diferença da inibição do crescimento de SsILPP3 (Quadro 13).

QUADRO 13 Inibição do crescimento micelial (%) dos isolados antagonistas de *S. sclerotiorum*, pelos fungicidas tiofanato metílico, iprodiona e procimidona.

Isolados antagonistas de <i>S. sclerotiorum</i>	Fungicidas**		
	Tiofanato metílico	Iprodiona	Procimidona
SsPP1	58,52 aA*	39,34 efC	50,34 bcdB
SsL7	58,14 aA	41,04 defB	44,93 defgB
SsL6	58,06 aA	47,60 abcB	45,67 bcdefB
SsPD1	57,73 abB	51,86 abC	74,19 aA
SsILPL2	56,83 abcA	36,77 fC	50,85 bcB
SsH3	56,61 abcA	52,43 aB	51,20 bB
SsILPL3	55,36 abcA	40,84 efC	46,79 bcdefB
SsILPL1	52,44 bcdA	46,42 bcdB	39,90 ghC
SsH2	52,05 cdA	42,53 cdeB	41,30 fghB
SsILPP2	47,15 deA	42,12 cdefB	39,29 hB
SsILPP4	45,41 eA	39,69 efB	43,75 efghA
SsPD2	45,39 eA	42,42 cdeA	44,79 efgA
SsL4	44,71 eB	41,29 defB	47,87 bcdeA
SsILPP1	44,31 eAB	41,39 defB	47,08 bcdeA
SsILPP5	42,39 eAB	40,35 efB	45,50 cdefA
SsILPP3	41,71 eA	29,02 gB	26,84 iB
SsH1	0,73 fB	0,15 hC	22,27 iA
C.V.(%)		9,64	

*Médias seguidas por letras iguais minúsculas nas colunas, e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Médias de inibição do crescimento micelial (%) nas cinco concentrações de fungicidas.

Na avaliação da AACCM dos isolados com a utilização de tiofanato metílico o isolado SsH1 apresentou comportamento semelhante a avaliação da inibição do seu crescimento, mostrando menor interferência da ação do fungicida, independente da concentração utilizada. Já, na avaliação dos isolados com menores AACCM, até a concentração de 10 ppm, apresentaram-se com médias bem distintas do isolado SsH1, que foram os isolados SsPD2, SsILPP2, SsILPP1, SsL4, SsPP1, SsH3, SsL6 e SsL7. A partir da concentração de 100 ppm, os isolados apresentaram médias muito próximas, havendo apenas distinção muito clara do isolado SsH1, mostrando-se menos sensível as concentrações testadas de tiofanato metílico (Quadro 14).

QUADRO 14. Área Abaixo da Curva de Crescimento micelial (AACCM) dos isolados antagonistas de *S.sclerotiorum* associados ao fungicida tiofanato metílico.

Isolados S.s	Concentrações de tiofanato metílico (ppm)					
	0	1	10	100	500	1000
SsH1	1224,00 a*	1224,00 a	1224,00 a	1204,08 a	1199,52 a	1192,80 a
SsILPL3	885,12 b	826,80 b	765,60 b	125,52 f	104,64 de	133,20 cde
SsILPL1	874,56 b	774,00 bc	630,48 c	234,96 bc	225,60 b	190,08 bcd
SsPD1	772,56 c	619,20 efg	396,24 fgh	220,32 bcde	205,20 bc	195,60 bc
SsL6	750,00 cd	713,28 cd	374,40 hij	159,84 def	146,88 cde	140,40 cde
SsILPL2	748,32 cd	627,36 efg	455,04 def	231,12 bcd	141,12 cde	128,64 cde
SsL7	688,80 de	618,96 efg	351,84 hij	189,60 bcdef	150,48 cde	120,24 de
SsH2	686,88 de	669,84 de	384,48 fghij	160,56 def	162,24 bcde	170,64 bcd
SsH3	684,48 de	607,92 efg	318,72 ij	143,28 f	187,00 bc	195,12 bc
SsILPP4	682,56 de	637,68 ef	492,24 de	231,60 bcd	227,76 b	212,88 b
SsILPP3	646,56 ef	594,00 fgh	521,04 d	257,76 b	231,12 b	219,60 b
SsILPP5	587,28 fg	593,12 fghi	516,24 de	192,00 bcdef	167,64 bcd	166,32 bcd
SsPP1	571,92 g	521,28 ij	315,60 j	157,44 ef	93,84 e	91,92 e
SsL4	569,76 g	542,40 hij	445,68 efg	171,60 cdef	181,68 bc	167,04 bcd
SsILPP1	565,44 g	557,76 ghij	330,00 hij	244,34 b	166,80 bcd	171,36 bcd
SsILPP2	538,56 g	494,40 j	389,28 fghij	231,62 bcd	163,92 bcde	156,24 bcde
SsPD2	515,28 g	515,28 j	329,76 hij	162,24 def	161,76 bcde	150,48 bcde
C.V.(%)	8,13					

*Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na avaliação da AACCM dos isolados com o fungicida iprodiona, não houve interação significativa dos mesmos com as concentrações utilizadas, indicando que os isolados se comportaram da mesma maneira nas concentrações testadas. O isolado de SsH1 apresentou a maior AACCM, condizendo com o resultado encontrado na avaliação da inibição do crescimento do mesmo. Os demais isolados apresentaram médias de AACCM que não diferiram entre si (Quadro 15). As concentrações 1 e 10 não ocasionaram efeito sobre o crescimento micelial, semelhante a testemunha sem fungicida. Já as concentrações maiores proporcionaram melhor efeito nos isolados (Quadro16). Silva et al (1999) observaram reduções de 50 a 70% do crescimento micelial de isolados de *Trichoderma*, com concentração de 10 µg/ml, já, com a concentração de 100 µg/ml de iprodiona, todos os isolados avaliados apresentaram inibição de aproximadamente 100% do crescimento.

QUADRO 15. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) dos isolados antagonistas de *S.sclerotiorum* associados ao fungicida iprodiona.

Isolados de S.s	Médias de AACCM com iprodiona
SsH1	1586,02 a
SsILPL2	586,40 b
SsILPL3	529,52 b
SsILPL1	509,72 b
SsILPP3	446,96 b
SsILPP4	423,92 b
SsILPP5	420,42 b
SsL6	419,32 b
SsPD2	411,16 b
SsPP1	407,12 b
SsPD1	399,68 b
SsL7	391,32 b
SsH2	378,96 b
SsL4	371,68 b
SsH3	369,36 b
SsILPP2	352,12 b
SsILPP1	338,28 b
C.V.(%)	99,90

*Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

QUADRO 16. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) das concentrações do fungicida iprodiona, associado aos antagonistas de *S.sclerotiorum*.

Concentração	Médias de AACCM com iprodiona (mm)
0	708,48 a
1	683,42 a
10	637,81 a
100	314,09 b
500	300,83 b
1000	299,69 b
C.V.(%)	99,90

*Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O isolado SsH1 apresentou a maior AACCM também com a utilização de procimidona, em todas as concentrações utilizadas e na testemunha, porém, na concentração de 1000 ppm do i.a., não apresentou diferença dos isolados SsILPP2, SsILPP3, SsILPP4, SsILPP5, SsILPL3 e SsL6. Com os resultados de inibição e AACCM, o isolado que apresentou menor sensibilidade aos três fungicidas, foi o isolado SsH1. O isolado SsH2 foi o que apresentou menor AACCM na testemunha, diferindo dos demais isolados, também ficou entre os isolados mais afetados pela concentração de 1, 10 e 500 ppm, não diferindo dos isolados SsPD1 e SsL4. Com a concentração de 100 ppm os isolados com menores AACCM foram SsPD1 e SsPD2, e com a concentração máxima de procimidona os isolados que menos cresceram foram SsPD2 e SsILPL2 (Quadro 17).

Foram testados modelos lineares e quadráticos, mas só foram obtidos ajustes em função do logaritmo da concentração. Em relação a inibição do crescimento dos isolados agentes de biocontrole de *S. sclerotiorum*, frente as concentrações do fungicida tiofanato metílico, observa-se variação de CI_{50} e CIM obtidos. SsH3 mostrou-se mais sensível ao produto em relação aos demais isolados, onde apresentou uma sensibilidade moderada com o valor da CI_{50} , e CIM como uma das concentrações mais baixas encontradas do fungicida. Corroborando com as análises de médias de inibição do crescimento e AACCM, o isolado SsH1 não apresentou alteração significativa da CI_{50} e da CIM, com tiofanato metílico, demonstrando ser independente da concentração do produto (Quadro 18 e 19).

QUADRO 17. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) dos isolados antagonistas de *S.sclerotiorum* associados ao fungicida procimidona.

Isolados <i>S. sclerotiorum</i>	Concentrações de procimidona (ppm)					
	0	1	50	100	500	1000
SsH1	1220,88 a*	1194,24 a	1013,28 a	1080,00 a	896,88 a	312,96 ab
SsILPP2	794,40 b	749,28 b	480,96 c	451,20 b	344,88 bc	307,44 ab
SsILPL1	784,32 b	732,48 bc	449,04 c	471,84 b	332,16 bc	299,04 abc
SsILPL3	759,60 b	695,76 bcd	595,20 b	249,84 efg	224,16 defg	199,44 ef
SsPD1	757,00 b	375,36 i	224,16 h	147,60 h	140,88 h	117,84 g
SsILPP4	744,00 b	683,52 cd	374,88 de	360,24 cd	330,96 bc	281,76 abcd
SsL6	649,44 c	569,28 e	261,12 gh	307,92 de	287,28 cd	306,24 ab
SsILPP3	649,20 c	663,36 d	423,84 cd	421,20 bc	374,88 b	345,84 a
SsILPP5	620,88 cd	488,16 fg	327,84 ef	292,80 ef	265,93 de	306,00 ab
SsPP1	615,36 cd	527,52 efg	255,12 gh	240,72 fg	246,24 def	235,44 cdef
SsH3	614,40 cd	538,08 ef	260,40 gh	237,84 fg	227,04 defg	204,00 ef
SsILPP1	581,52 de	493,68 fg	242,64 gh	277,44 ef	242,88 def	257,28 bcde
SsPD2	561,84 de	541,20 ef	359,04 ef	195,12 gh	197,04 fgh	171,84 fg
SsL7	549,12 e	488,16 fg	252,96 gh	250,56 efg	257,52 def	230,88 def
SsILPL2	538,80 e	464,64 gh	306,72 fg	240,00 fg	165,60 gh	132,96 g
SsL4	527,52 e	420,00 hi	210,48 h	264,96 ef	257,52 def	213,36 ef
SsH2	439,92 f	390,24 i	232,80 h	231,36 fg	202,32 efgh	205,93 ef
C.V.(%)	7,41					

*Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O isolado menos sensível ao produto, com concentração CI_{50} calculada foi SsILPP3, apresentando insensibilidade ao produto, e com uma CIM superior aos 1000 ppm testados (Quadro 19). Ishizuka (2016) pode observar uma variação de sensibilidade de três isolados de *Trichoderma* spp., onde, através de uma escala modificada de Edgington et al (1971), classificou o isolado T 12- 10 86605 com CI_{50} de 13,11 mg/L, sendo pouco sensível a tiofanato metílico, e os isolados GF 422 e SF 04 como moderadamente sensíveis, com CI_{50} de 0,93 e 0,92 mg/L, respectivamente.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações inibitórias de 50% (CI_{50}) dos isolados com Tiofanato metílico indicam que é possível a associação de qualquer um deles com o produto, pois *in vitro*, o crescimento de *S. sclerotiorum* apresenta decréscimo considerável com concentrações baixas. Esse comportamento foi observado por Figueirêdo et al. (2010), onde o crescimento micelial deste fitopatógeno foi muito diminuído já com a concentração de 1 ppm do produto, sendo que nas concentrações de 10, 50 e 100 ppm, o crescimento foi anulado.

QUADRO 18. Equações de regressão, coeficientes de variação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do crescimento micelial de isolados antagonistas de *S. sclerotiorum* em relação as concentrações de tiofanato metílico.

Isolados	Equação de regressão	R^2	CI_{50} (ppm)
SsL4	$\bar{y} = 8,390x^2 + 54,214 - 65,001^*$	0,94	37,94
SsL6	$\bar{y} = -15,746x^2 + 79,378x - 66,893$	1	10,74
SsL7	$\bar{y} = -11,085x^2 + 62,153x - 56,383$	0,99	12,75
SsH1	Não significativo		
SsH2	$\bar{y} = -15,888x^2 + 79,129x - 69,881$	1	13,04
SsH3	$\bar{y} = -17,700x^2 + 79,893x - 60,953$	0,99	8,38
SsILPP1	$\bar{y} = -9,590x^2 + 55,471x - 60,846$	0,98	28,58
SsILPP2	$\bar{y} = -6,984x^2 + 47,637x - 57,480$	0,98	35,84
SsILPP3	$\bar{y} = 23,545x - 49,006$	0,95	>100
SsILPP4	$\bar{y} = -8,568x^2 + 52,495x - 61,030$	0,97	35,17
SsILPP5	$\bar{y} = 28,290x - 55,564$	0,9	91,07
SsILPL1	$\bar{y} = -6,699x^2 + 48,650x - 56,239$	0,95	26,7
SsILPL2	$\bar{y} = 25,394x - 38,260$	0,98	21,34
SsILPL3	$\bar{y} = -7,094x^2 + 58,051x - 68,742$	0,88	26,31
SsPD1	$\bar{y} = -9,878x^2 + 52,616x - 45,12$	1	10,87
SsPD2	$\bar{y} = -12,059x^2 + 64,817x - 66,030$	0,99	21,21
SsPP1	$\bar{y} = -9,957x^2 + 60,662x - 58,244$	1	14,64

QUADRO 19. Equações de regressão, coeficientes de variação (R^2) e concentração inibitória mínima (CIM) correspondente a Área abaixo do crescimento micelial (AACCM) de isolados de fungos filamentosos de *S. rolfsii* em relação as concentrações de tiofanato metílico.

Isolados	Equação de regressão	R^2	CIM AACCM (ppm)
SsL4	$\bar{y} = 28,310x^2 - 234,092x + 597,942^*$	0,95	>1000
SsL6	$\bar{y} = 89,270x^2 - 484,592x + 791,812$	0,99	516,85
SsL8	$\bar{y} = 66,351x^2 - 389,690x + 703,302$	0,99	864,14
SsH1	não significativo		
SsH2	$\bar{y} = 78,165x^2 - 424,955x + 733,297$	0,98	522,79
SsH3	$\bar{y} = 104,096x^2 - 481,331x + 709,219$	0,99	205,1
SsILPP1	$\bar{y} = 40,553x^2 - 262,269x + 589,513$	0,98	>1000
SsILPP2	$\bar{y} = -136,309x + 527,028$	0,98	>1000
SsILPP3	$\bar{y} = -153,468x + 643,058$	0,96	>1000
SsILPP4	$\bar{y} = 41,270x^2 - 292,524x + 707,399$	0,97	>1000
SsILPP5	$\bar{y} = -161,603x + 620,107$	0,93	>1000
SsILPL1	$\bar{y} = 46,176x^2 - 377,795x + 892,558$	0,97	>1000
SsILPL2	$\bar{y} = 43,711x^2 - 337,915x + 741,574$	1	>1000
SsILPL3	$\bar{y} = -293,750x + 916,357$	0,9	>1000
SsPD1	$\bar{y} = 84,893x^2 - 439,434x + 760,120$	1	387,41
SsPD2	$\bar{y} = 43,862x^2 - 265,926x + 549,700$	0,97	>1000
SsPP1	$\bar{y} = 46,219x^2 - 305,735x + 587,480$	1	>1000

Na avaliação das CI_{50} dos isolados pela ação de iprodiona, pode-se constatar que o isolado SsH1 também não apresentou alteração significativa no seu crescimento nas concentrações testadas. Os isolados SsH2, SsILPP3, SsILPP5 e SsILPL2 mostraram insensibilidade ao fungicida segundo a escala de Edgington et al. (1971) pois para inibir 50% (CI_{50}) do crescimento micelial de ambos é necessária uma concentração superior a 50 ppm. Assim, como com a utilização de tiofanato metílico, com iprodiona o isolado de maior sensibilidade ao produto foi SsH3, com sensibilidade moderada ao fungicida. Não houve diferença significativa entre os isolados e as concentrações inibitórias mínimas (CIM) com iprodiona, demonstrada com a equação de regressão $y = -156,631x + 726,869$, $R^2 = 0,92$ (Quadro 20).

Figueirêdo et al. (2010), relatam que o crescimento de *S. sclerotiorum* apresentou inibição do seu crescimento a partir de 10 ppm de iprodiona, e inibido completamente com a concentração de 100 ppm. Assim, os isolados biocontroladores testados com o produto em questão, apresentam compatibilidade com as concentrações encontradas.

QUADRO 20. Equações de regressão, coeficientes de variação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do crescimento micelial de isolados antagonistas de *S. sclerotiorum* em relação as concentrações de iprodiona.

Isolados	Equação de regressão	R^2	CI_{50} (ppm)
SsL4	$\bar{y} = -14,118x^2 + 70,963x - 72,016^*$	0,97	24,75
SsL6	$\bar{y} = -12,917x^2 + 61,018x - 56,072$	0,99	16,76
SsL7	$\bar{y} = -6,357x^2 + 36,239x - 3,884$	0,91	81,7
SsH1	não significativo		
SsH2	$\bar{y} = 14,716x - 32,998$	0,74	>100
SsH3	$\bar{y} = -17,066x^2 + 75,610x - 59,863$	0,98	9,77
SsILPP1	$\bar{y} = -8,563x^2 + 51,850x - 60,991$	0,98	38,63
SsILPP2	$\bar{y} = -8,985x^2 + 53,646x - 63,791$	0,95	42,56
SsILPP3	$\bar{y} = -5,745x^2 + 38,811x - 62,318$	0,96	>100
SsILPP4	$\bar{y} = -10,948x^2 + 59,499x - 67,147$	0,95	38,81
SsILPP5	$\bar{y} = 29,474x - 57,817$	0,95	91,54
SsILPL1	$\bar{y} = -7,299x^2 + 51,723x - 63,007$	0,98	35,54
SsILPL2	$\bar{y} = -10,828x^2 + 56,940x - 66,048$	0,98	52,38
SsILPL3	$\bar{y} = -12,833x^2 + 67,381x - 71,481$	0,94	28,89
SsPD1	$\bar{y} = -11,681x^2 + 60,655x - 56,775$	0,99	15,79
SsPD2	$\bar{y} = -9,995x^2 + 58,027x - 66,637$	0,96	36,71
SsPP1	$\bar{y} = -8,566x^2 + 51,315x - 62,707$	0,94	50,32

Com o uso de procimidona o isolado SsH1 mostrou-se insensível ao produto, pois sua CI_{50} foi superior a 50 ppm, o mesmo foi observado com o isolado SsILPL1, SsILPL2, SsILPL3, SsILPP2 e SsILPP3. Na avaliação das CIM, os isolados SsH1, SsILP1, SsILPL2, SsILPL3 também foram os menos sensíveis, apresentando valores superiores a 1000 ppm. O isolado SsPD1 foi altamente sensível ao produto, pois sua CI_{50} foi de 0,80 ppm, e CIM entre as mais baixas entre os isolados (Quadro 21). Em trabalho realizado por Rezende (2011), pode-se constatar que os melhores resultados com uso de procimidona, foram obtidos com concentrações de 0,1 e 1 ppm, apresentando maior índice de velocidade de crescimento micelial de isolados de *Trichoderma*, podendo representar uma possível associação deste produto com fungos biocontroladores no tratamento de sementes, em pulverizações foliares ou aplicação no solo, pois demandam menores concentrações do agrotóxico. O autor ainda observou que *T. harzianum* apresentou seletividade regular nas concentrações de 10 e 100 ppm, e ruim na concentração de 1000 ppm.

Zancan et al. (2012) observaram que, a partir da concentração de 5 ppm de procimidona não houve crescimento micelial *in vitro* de *S. sclerotiorum*. Essa observação sugere que os isolados encontrados neste trabalho apresentam compatibilidade na associação do controle químico com o controle biológico, pois mesmo nas CI_{50} e CIM

mais baixas encontradas, o crescimento do fitopatógeno pode ser inibido, com exceção do isolado SsPD1, que com concentração de 0,80 ppm já apresenta redução de 50% do seu crescimento (Quadro 21 e 22).

QUADRO 21. Equações de regressão, coeficientes de variação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do crescimento micelial de isolados antagonistas de *S. sclerotiorum* em relação as concentrações de procimidona.

Isolados	Equação de regressão	R^2	CI_{50} (ppm)
SsL4	$\bar{y} = -9,362x^2 + 40,803x - 35,405^*$	0,66	14,70
SsL6	$\bar{y} = -14,872x^2 + 60,905x - 49,634$	0,81	12,26
SsL7	$\bar{y} = -12,925x^2 + 56,462x - 50,536$	0,87	17,20
SsH1	$\bar{y} = 14,296x^2 - 28,442x - 33,617$	0,75	>100
SsH2	$\bar{y} = -9,877x^2 + 46,180x - 48,400$	0,9	37,57
SsH3	$\bar{y} = -13,487x^2 + 61,617x - 51,423$	0,91	11,56
SsILPP1	$\bar{y} = -12,578x^2 + 53,779x - 45,331$	0,82	13,28
SsILPP2	$\bar{y} = -5,732x^2 + 37,255x - 51,533$	0,93	98,23
SsILPP3	$\bar{y} = -7,812x^2 + 40,366x - 42,291$	0,89	53,94
SsILPP4	$\bar{y} = -10,465x^2 + 51,085x - 52,075$	0,89	27,19
SsILPP5	$\bar{y} = -9,343x^2 + 41,487x - 39,060$	0,96	21,65
SsILPL1	$\bar{y} = 17,595x - 40,089$	0,83	>100
SsILPL2	$\bar{y} = 21,185x - 36,953$	0,96	54,5
SsILPL3	$\bar{y} = 26,275x - 49,260$	0,93	73,95
SsPD1	$\bar{y} = -5,971x^2 + 31,337x - 7,611$	0,98	0,80
SsPD2	$\bar{y} = 10,890x^2 + 59,430x - 37,325$	0,99	25,82
SsPP1	$\bar{y} = -14,315x^2 + 61,793x - 49,214$	0,9	10,31

QUADRO 22. Equações de regressão, coeficientes de variação (R^2) e concentração inibitória mínima (CIM) correspondente a área abaixo do crescimento micelial (AACCM) de isolados de fungos filamentosos de *S. rolfisii* em relação as concentrações de procimidona.

Isolados	Equação de regressão	R^2	CIM AACCM (ppm)
SsL4	$\bar{y} = 66,903x^2 - 282,544x + 502,106$	0,86	129,3
SsL6	$\bar{y} = 97,125x^2 - 397,621x + 648,647$	0,91	111,42
SsL7	$\bar{y} = 70,301x^2 - 307,475x + 550,087$	0,94	153,76
SsH1	$\bar{y} = -128,999x^2 - 172,089x + 1155,409$	0,76	>1000
SsH2	$\bar{y} = 45,145x^2 - 209,180x + 437,513$	0,95	206,37
SsH3	$\bar{y} = 80,764x^2 - 370,060x + 615,747$	0,96	194,39
SsILPP1	$\bar{y} = 79,317x^2 - 336,460x + 572,549$	0,92	131,12
SsILPP2	$\bar{y} = 42,767x^2 - 285,311x + 798,406$	0,96	>1000
SsILPP3	$\bar{y} = 39,764x^2 - 221,805x + 671,771$	0,91	615,22
SsILPP4	$\bar{y} = 74,349x^2 - 399,597x + 749,094$	0,94	292,00
SsILPP5	$\bar{y} = 73,464x^2 - 316,958x + 598,463$	0,97	143,63
SsILPL1	$\bar{y} = 40,840x^2 - 275,340x + 780,391$	0,92	>1000
SsILPL2	$\bar{y} = 30,064x^2 - 217,763x + 528,804$	0,99	>1000
SsILPL3	$\bar{y} = 25,316x^2 - 276,537x + 780,293$	0,96	>1000
SsPD1	$\bar{y} = 118,253x^2 - 517,878x + 651,274$	0,88	154,77
SsPD2	$\bar{y} = 45,151x^2 - 272,962x + 587,573$	0,98	>1000
SsPP1	$\bar{y} = 89,190x^2 - 389,472x + 613,751$	0,96	143,01

Os resultados de compatibilidade dos isolados de biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* com os três fungicidas se mostraram promissores, porém, devem ser considerados teste *in vivo* para comprovar a eficácia do método integrado do controle químico com estes isolados. Mas, ensaios *in vitro* desta natureza, têm a vantagem de expor o máximo os microrganismos a ações fungicidas dos produtos. A seletividade de um produto em laboratório pode não ser igual no campo, ou seja, a alta toxidade de um fungicida *in vitro* nem sempre indica a sua elevada toxidade no campo, mas sim a possibilidade da ocorrência de danos dessa natureza (MOINO JÚNIOR e ALVES, 1999).

4. CONCLUSÕES

Nenhum dos isolados antagonista de *S. rolfsii* apresentou alta sensibilidade a tiofanato metílico, iprodiona e procimidona.

O fungicida tiofanato metílico proporcionou maiores inibições no crescimento micelial dos isolados antagonistas de *S. rolfsii*.

O isolado SrL1 foi o menos sensível a tiofanato metílico e procimidona, e seu crescimento foi o segundo menos afetado com iprodiona.

Apenas o isolado SsPD1 foi altamente sensível a procimidona, os demais isolados antagonistas de *S. sclerotiorum* mostraram-se como moderadamente sensíveis e insensíveis a tiofanato metílico, iprodiona e procimidona.

O isolado SsH1 mostrou-se menos sensível a ação dos tiofanato metílico, iprodiona e procimidona.

O fungicida tiofanato metílico proporcionou maiores inibições no crescimento micelial dos isolados antagonistas a *S. sclerotiorum*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, Z. R.; CARVALHO, S. S.; BRAÚNA, L. M.; GOMES, D. M. P. A.; MELO, S. C. M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2005 (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 117).
- CONWAY, K. E. Integration of biological and chemical controls for *Rhizoctonia* aerial blight and root rot of rosemary. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 18, n. 7, p. 795-798, 1997.
- DUARTE, M. L.; TABARANA, M. G. F.; ALBUQUERQUE, F. A. B.; MORAIS, A. J. G. **Controle químico da Podridão-das-estacas (*Sclerotium rolfsii*) da Pimenteira-do-reino**. Embrapa Amazônia Ocidental, Belém, 2006 (Comunicado Técnico, 157).
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.
- EHR, R. J. e KEMMITT, G. **Periodic table of the fungicides**. Dow Agrosiences, Indianapolis, 2002.
- FIGUEIRÊDO, G. S.; FIGUEIRÊDO, L. C.; CAVALCANTE, F. C. N.; SANTOS, A. C.; COSTA, A. F.; OLIVEIRA, N. T. Biological and chemical controlo f *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 1-9, 2010.
- GOWDAR, S. B.; RAMESH-BABU, H. N.; NARGUND, V. B. KRISHNAPPA, M. Compatibility of fungicides with *Trichoderma harzianum*. **Agriculture Science Digest. Lafayette**, v. 26, n. 3, p. 279-281, 2006.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. **Perspectiva do uso do controle biológico contra doenças florestais**. Embrapa Floresta, Colombo, v. 30, n. ½, p. 155-165, 2000.
- ISHIZUKA, M. S. **Compatibilidade entre tratamento químico e biológico de semente de feijão para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo – SP.
- KREYCI, P. F. e MENTEN, J. O. M. Limitadoras de produtividade. **Cultivar Grandes Culturas**, São Paulo, v. 3, n. 167, p. 3-10, 2013.
- MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; NUNES JUNIOR, J.; VENANCIO, W. S.; GODOY, C. V. Chemical control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) on soybean in Brazil. **Acta Phytopathologica Sinica**, Budapest, v. 43, (suplemento), p. 137, 2013.

MOINO JÚNIOR, A.; ALVES, S. B. Efeito de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Sorok. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 217-224, 1999.

PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, M. B.; LECCHI, M. G.; AZEREDO, J. O.; PEREIRA, S. F.; PEREIRA, L. L. Sensibilidade de *Trichoderma* sp. a fungicidas utilizados na cultura do feijão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA TROPICAL PLANT PATHOLOGY, v. 34, 2009, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, RJ: SBF, 2009.

REZENDE, A. A. **Eficiência de diferentes produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. no controle da podridão branca da haste da soja**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais – MG.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas: Guia para controle químico racional de doenças de plantas**. 7 ed. Passo Fundo: Berthier, 2016. 280 p.

RIBAS, P. P. **Compatibilidade de *Trichoderma* spp. a princípios ativos de fungicidas comerciais aplicados na cultura do feijão**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS.

SARKAR, S.; NARAYANAN, P.; DIVAKARAN, A.; BALAMURUGAN, A.; PREMKUMAR, R. The in vitro effect of certain fungicides, insecticides, and biopesticides on mycelia growth in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Turkish Journal of Biology**, Saxena, v.34, n. 5, p. 399-403, 2010.

SILVA, A. C. F.; ROSA, C. R.; MELO, I. S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 395-399, 1999.

SILVA, A. N.; AZEVEDO, G. B.; SOBRINHO, G. G. R.; NOVAES, Q. S. Efeito de produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do Maracujazeiro. **Interciência**, Panamá, v. 39, n. 6, p. 398-403, 2014.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W.; OLIVEIRA, S. H. F. **Manejo de resistência do fungos a fungicidas**. Viçosa: UFV, 2007. 168p.

ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; SOUZA, B. F. M.; MATOS, C. S. M. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 782-789, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungos antagonistas apresentam grande importância no controle de doenças de plantas, sendo alguns com elevado potencial de inibição do desenvolvimento de fitopatógenos. A pesquisa sobre controle biológico, com a introdução de antagonistas, está baseada, quase que exclusivamente, em fungos do gênero *Trichoderma* sp.

Porém, outros fungos podem expressar altas interferências no crescimento de fungos causadores de enfermidades. Neste trabalho foram encontrados vários isolados fúngicos, que não apresentaram aspectos de *Trichoderma* sp., em solos de agrossistema de lavoura, integração lavoura-pecuária – lavoura, integração lavoura-pecuária – Pecuária, plantio direto e pastagem permanente, que causaram mais de 50% de inibição do crescimento de *Sclerotium rolfsii*. Também, foram encontrados isolados em solos de agrossistema de lavoura, horta, Integração Lavoura-Pecuária – Lavoura, Integração Lavoura-Pecuária – Pecuária, plantio direto e pastagem permanente, que inibiram mais de 50% do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Este resultado pode indicar que existem diferentes fungos antagonistas ainda não estudados quanto ao seu potencial de controle aos fungos *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, sendo necessária a sua identificação e avaliação *in vivo*, para comprovar suas eficácias.

A introdução do controle biológico no campo, ainda, não está muito difundida na agricultura, contudo, uma estratégia que pode ser utilizada, afim de maior controle das doenças causadas por *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, é a associação de antagonistas com agrotóxicos, objetivando diminuir a quantidade do mesmo e o número de aplicação, assim reduzindo os efeitos nocivos que causam, além de poder resultar na economia do produtor.

Com o estudo da interferência de fungicidas no crescimento de isolados, que apresentaram potenciais antagonistas superiores a 40% de inibição do crescimento dos fitopatógenos *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, foi observado que os isolados antagonistas de *S. rolfsii*, foram moderadamente sensíveis, pouco sensíveis e insensíveis aos fungicidas tiofanato metílico, iprodiona e procimidona. Os isolados antagonistas a *S. sclerotiorum* foram classificados em sua maioria como moderadamente sensíveis, pouco sensíveis e insensíveis aos fungicidas, apenas um isolado foi classificado como altamente sensível ao fungicida procimidona.

Essa pesquisa possibilitou obter diferentes isolados antagonistas aos fitopatogenos *S. rolfii* e *S. sclerotiorum* e, também, conhecer melhor a interferência de fungicidas sobre os isolados. Entretanto, novas pesquisas devem ser desenvolvidas com outros fungicidas e *in vivo*, para que se comprove a compatibilidade dos isolado com o controle químico.