

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

PAULA STEILMANN

**Uso integrado de biofumigação com canola e
Trichoderma harzianum no manejo da rizoctoniose em
beterraba**

TESE

PATO BRANCO

2019

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

PAULA STEILMANN

**Uso integrado de biofumigação com canola e
Trichoderma harzianum no manejo da rizoctoniose em
beterraba**

TESE

PATO BRANCO

2019

PAULA STEILMANN

**Uso integrado de biofumigação com canola e
Trichoderma harzianum no manejo da rizoctoniose em
beterraba**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosangela Dallemole Giaretta

Coorientador: Prof. Dr. Idalmir dos Santos

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa Macedo dos Santos

PATO BRANCO

2019

S818u Steilmann, Paula.
Uso integrado biofumigação com canola e *Trichoderma harzianum* no manejo da rizoctoniose em beterraba / Paula Steilmann. -- 2019.
77 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Dallemole Giaretta
Coorientador: Prof. Dr. Idalmir dos Santos
Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Macedo dos Santos
Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2019.
Bibliografia: f. 69 - 77.

1. Sistemas de controle biológico. 2. Fitopatologia. 3. Plantas -
Proteção. I. Giaretta, Rosangela Dallemole, orient. II. Santos, Idalmir dos,
coorient. III. Santos, Larissa Macedo dos, coorient. IV. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia. V. Título.

CDD (22. ed.) 630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Tese n.º 047

USO INTEGRADO DE BIOFUMIGAÇÃO COM CANOLA E *Trichoderma harzianum* NO MANEJO DA RIZOCTONIOSE EM BETERRABA

Por

PAULA STEILMANN

Tese apresentada às oito horas e trinta minutos do dia dezoito de fevereiro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTORA EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Proteção de Plantas, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo designados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Dr. Everaldo Antônio Lopes
UFV/Rio Parnaíba
(À distância, por videoconferência)

Dr. Wilson Itamar Godoy
UTFPR/Pato Branco

Dr. Gustavo Migliorini de Oliveira
Emater/ Vitorino

Dra. Betânia Brum de Bortolli
UTFPR/Pato Branco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde e força para superar as dificuldades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais e noivo pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À orientadora Dr^a. Rosangela Dallemole Giaretta pela orientação ao longo desse período. E também ao co-orientador Dr. Idalmir dos Santos pelos ensinamentos e incentivo de sempre.

Aos amigos de trajetória Elizabeth Koltz, Drieli Reiner, Eliane Carneiro, Vanessa Zanon e Melissa Cabrera pela amizade, apoio e auxílio com os experimentos.

À Dr^a. Katia de Lima Nechet da Embrapa Meio Ambiente, pela disponibilidade em enviar os isolados de *Rhizoctonia solani*.

À Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto pelo auxílio com as análises moleculares.

RESUMO

Uso integrado de biofumigação com canola e *Trichoderma harzianum* no manejo da rizoctoniose em beterraba. 77 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2019.

Este trabalho objetivou avaliar a capacidade do uso da canola incorporada ao solo, na forma de pó ou extrato, com e sem a biofumigação e associada ao fungo *Trichoderma harzianum* em reduzir o potencial de inóculo de *R. solani* e o tombamento de plântulas de beterraba. Foram realizados testes *in vitro*, visando avaliar o efeito de concentrações de pó (0; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2 g) ou extrato (0; 3; 6; 9 e 12%) de parte aérea ou de raiz de canola sobre o crescimento micelial e sobre as hifas do patógeno. As concentrações de 9 e 12% de pó ou extrato causaram maior redução do crescimento micelial do patógeno, sendo o pó de raiz o mais eficiente. Esses tratamentos foram testados em casa de vegetação em associação à biofumigação para verificar a ação sobre a emergência, o tombamento e desenvolvimento de plântulas, e também sobre a sobrevivência do inóculo do patógeno no solo. As concentrações de 9 e 12% pó de parte aérea ou raiz de canola afetaram negativamente a emergência, causando fitotoxidez nas plântulas. Em relação ao tombamento de plântulas, as concentrações de 6% de pó e 12% de extrato associadas à biofumigação controlaram a doença em mais de 80%. Também avaliaram-se as concentrações de 0,6 g de pó e extrato a 12%, em associação a *T. harzianum*, sobre o crescimento micelial do patógeno, *in vitro*. Esses tratamentos também foram avaliados em associação à biofumigação, em casa de vegetação e em campo, sobre a emergência, tombamento de plântulas, desenvolvimento das plântulas, a sobrevivência do inóculo do patógeno e a atividade microbiana do solo. No estudo, *in vitro*, os tratamentos com pó e extrato associados a *T. harzianum*, promoveram o mesmo crescimento micelial do patógeno em relação aos tratamentos utilizados de forma isolada. Nos estudos em casa de vegetação, para as variáveis emergência, tombamento e sobrevivência do inóculo do patógeno, destacaram-se os tratamentos com extrato e extrato + *T. harzianum*, sendo que a biofumigação foi significativa apenas para o estudo com pó e extrato de raiz de canola. A atividade microbiana foi maior nos tratamentos com extrato + *T. harzianum* e apenas o *T. harzianum*. Nos experimentos em campo, para as variáveis emergência, tombamento e redução do inóculo de *R. solani*, de forma geral destacaram-se os tratamentos com pó de parte aérea, pó de raiz e ambos associados ao *T. harzianum*.

Palavras-chave: Sistemas de controle biológico. Fitopatologia. Proteção de plantas.

ABSTRACT

STEILMANN, Paula. Integrated use of biofumigation with canola and *Trichoderma harzianum* in the management of rhizoctoniosis in beet. 77 f. Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology Paraná. Pato Branco, 2019.

The objective of this study was to evaluate the capacity of the incorporation of *Brassica napus* into the soil, in the form of a powder or extract, with and without biofumigation and associated with the fungus *Trichoderma harzianum*, to reduce the density of *R. solani* inoculum and damping-off of beet. *In vitro* tests were conducted to evaluate the effect of powder (0, 0.3, 0.6, 0.9 and 1.2 g) or extract (0, 3, 9, and 12%) of the shoot or roots of *B. napus* on mycelial growth and on the pathogen hyphaes. The concentrations of 9 and 12% of powder or extract caused a greater reduction in pathogen mycelial growth, with the root powder being the most efficient. These treatments were tested, in a greenhouse with biofumigation, on seedling emergence, damping-off and development, as well as pathogen inoculum survival. The 9 and 12% canola root treatments adversely affected seedling emergence, by causing phytotoxicity in the seedlings. Regarding damping-off, the concentrations of 6% of powder and 12% of extract, in association with biofumigation, controlled the disease by more than 80%. The combinations of 0.6 g of powder and 12% extract, in association with *T. harzianum*, were also evaluated against pathogen mycelial growth, *in vitro*. These treatments were also evaluated in association with biofumigation, in the greenhouse and in the field, for their effect on seedling emergence and development, damping-off, pathogen inoculum density and soil microbial activity. In the study, *in vitro*, powder and extract treatments associated with *T. harzianum* promoted the same pathogen mycelial growth as the treatments used alone. In the greenhouse studies, for the variables emergence, damping-off and pathogen inoculum density, the treatments extract, and extract + *T. harzianum* stood out, while biofumigation was only significant in the study with powder and root extract of *B. napus*. The microbial activity was higher in treatments with extract + *T. harzianum* and only *T. harzianum*. In the field experiments, for the variables emergence, damping-off and *R. solani* inoculum density reduction, treatments with shoot powder, root powder and both of these in association with *T. harzianum* stood out.

Keywords: Biological control systems. Plant pathology. Crop protection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Isolados de *Rhizoctonia solani* de diferentes grupos de anastomose crescidos em meio BSA por três dias no escuro a 25 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.38
- Figura 2** – Imagens de microscopia óptica (aumento de 200x) da reação de anastomose de hifas entre isolados de *Rhizoctonia solani*. A) A seta preta para a direita indica o isolado AG4 140, a seta preta para a esquerda indica o isolado *Rhizoctonia solani* AG4-HG1 (em estudo) e a seta branca indica o ponto de anastomose com morte das células; B) A seta preta apontada para cima indica o isolado *Rhizoctonia solani* AG4-HG1 (em estudo), a seta preta apontada para baixo indica o isolado AG4-HG1 e as setas brancas indicam ponto de anastomose entre os isolados. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.39
- Figura 3** – Efeito de concentrações de compostos voláteis liberados por pó e extrato de canola sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI, *in vitro*. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.....40
- Figura 4** – Efeito de concentrações de compostos voláteis liberados por pó e extrato de canola sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI, *in vitro*, após três dias de cultivo em meio BSA, a ± 25 °C no escuro. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.41
- Figura 5** – Efeito de concentrações de compostos de efeito direto liberados pelo extrato de canola sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI, *in vitro*. (A) Extrato de parte aérea; (B) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.42
- Figura 6** – Efeito de concentrações de compostos de efeito direto liberados pelo extrato de canola sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI, *in vitro*, após três dias de cultivo em meio BSA contendo as diferentes concentrações de extrato, a ± 25 °C no escuro. (A) Extrato de parte aérea; (B) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.42
- Figura 7** – Hifas de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI submetidas a tratamentos com extrato e pó de parte aérea ou raiz canola. (A) compostos voláteis de extrato de parte aérea de canola a 12%; (B) compostos voláteis de extrato de raiz de canola a 12%; (C) compostos voláteis de 1,2 g pó de parte aérea de canola; (D) compostos voláteis de 1,2 g pó de raiz de canola; (E) contato direto com extrato de parte aérea a 12%; (F) contato direto com extrato de raiz a 12%; (G) controle. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.....43
- Figura 8** – Cromatograma obtido com a amostra de parte aérea de canola em análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (coluna ZB-5HT Inferno), temperatura inicial de 40°C por 5 minutos, taxa de crescimento de 10°C/min até 250°C. Injeção em modo splitless com hélio como gás de arraste. O espectrômetro de massas foi operado no modo scan, com faixa m/z 41-400. (t_R 13.16 – isotiocianato de metila; t_R 14.83 – Metoxifenil- isotiocianato). UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.44
- Figura 9** – Efeito de concentrações de compostos liberados pelo pó e extrato

de canola e solo infestado com *Rhizoctonia solani* AG4 HGI sobre a emergência (%) de plântulas de beterraba. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.....45

Figura 10 – Efeito de concentrações de compostos liberados pelo pó e extrato de canola e solo infestado com *Rhizoctonia solani* AG4-HGI sobre o tombamento (%) de plântulas de beterraba. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.....46

Figura 11 – Efeito de compostos liberados pelo pó e extrato de canola e solo infestado com *Rhizoctonia solani* AG4-HGI sobre o número de plântulas de beterraba sobreviventes ao final do experimento. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.47

Figura 12 – Efeito de compostos liberados pelo pó de canola e solo infestado com *Rhizoctonia solani* AG4-HGI sobre o comprimento (cm) e massa (mg) de plântulas de beterraba sobreviventes ao final do experimento. (A) Comprimento de plântulas - pó de parte aérea; (B) Massa de plântulas - pó de parte aérea; (C) Comprimento de plântulas - pó de raiz; (C) Massa de plântulas – pó de raiz. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.49

Figura 13 – Efeito de compostos liberados pelo pó e extrato de canola sobre o inóculo de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI no solo ao final do experimento. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.....50

Figura 14 – Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI causada por compostos de ação direta do extrato de parte aérea e voláteis liberados pelos extratos ou pó de parte aérea de canola associados aos compostos voláteis liberados pelo fungo *Trichoderma harzianum*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.51

Figura 15 – Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI causada por compostos de ação direta do extrato de raiz e voláteis liberados pelo extrato ou pó de raiz de canola associados aos compostos voláteis liberados pelo fungo *Trichoderma harzianum*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.52

Figura 16 – Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI causada por compostos voláteis liberados por extratos e pó de parte aérea de canola associados ao fungo *Trichoderma harzianum* em contato direto. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.53

Figura 17 – Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI causada por compostos voláteis liberados por extratos e pó de raiz de canola associados ao fungo *Trichoderma harzianum* em contato direto. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Componentes utilizados para a Reação em Cadeia da Polimerase para identificação do isolado em estudo. UTFPR, Pato Branco – 2019.....27
- Tabela 2** – Inibição do crescimento micelial (%) de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI submetidos a ação de compostos de ação direta do extrato de parte aérea ou raiz de canola e voláteis liberados pelo extrato, pó de parte aérea ou de raiz de canola e *Trichoderma harzianum*, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.51
- Tabela 3** – Inibição do crescimento micelial (%) de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI submetido ao efeito direto do extrato de parte aérea ou de raiz de canola (12%) e do fungo *Trichoderma harzianum*, e de compostos voláteis liberados pelo pó e extrato de parte aérea. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.52
- Tabela 4** – Emergência (%) e tombamento de plântulas (%) de beterraba de um experimento com sete tratamentos associando pó e extrato de parte aérea de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* no controle do tombamento de plântulas, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.54
- Tabela 5** – Unidades formadoras de colônias (UFC g⁻¹ .10²) de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI ao final de um experimento bifatorial composto por sete tratamentos associando pó (6%) e extrato (12%) de parte aérea de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.54
- Tabela 6** – Atividade microbiana (mg CO₂.100 g⁻¹ solo⁻²) em experimentos conduzidos em bifatorial compostos por sete tratamentos associando pó ou extrato de parte aérea de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019. 55
- Tabela 7** – Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de beterraba de um experimento com sete tratamentos associando pó ou extrato de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum*, no primeiro experimento. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.56
- Tabela 8** – Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de beterraba de um experimento com sete tratamentos associando pó ou extrato de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum*, no segundo experimento. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.56
- Tabela 9** – Comprimento e massa de plântulas de beterraba de um experimento com seis tratamentos associando pó e extrato de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum*, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.....57
- Tabela 10** – Unidades formadoras de colônias (UFC g⁻¹.10²) de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI ao final de um experimento bifatorial, composto por sete tratamentos associando pó (6%) ou extrato (12%) de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.57
- Tabela 11** – Atividade microbiana (mg CO₂.100 g⁻¹ solo⁻²) em experimentos conduzidos em bifatorial com sete tratamentos associando pó ou extrato de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação,

em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.	58
Tabela 12 – Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de beterraba de um experimento com seis tratamentos associando pó e extrato de parte aérea e raiz de canola ao fungo <i>Trichoderma harzianum</i> com e sem biofumigação, no primeiro experimento. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.	59
Tabela 13 – Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de beterraba de um experimento com seis tratamentos associando pó e extrato de parte aérea e raiz de canola ao fungo <i>Trichoderma harzianum</i> com e sem biofumigação, no segundo experimento. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.	59
Tabela 14 – Unidades formadoras de colônias (UFC g ⁻¹ .10 ²) de <i>Rhizoctonia solani</i> AG4-HGI ao final de experimentos com sete tratamentos associando pó (6%) ou extrato (12%) de parte aérea e raiz de canola ao fungo <i>Trichoderma harzianum</i> com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.	60
Tabela 15 – Atividade microbiana (mg CO ₂ .100 g ⁻¹ solo ⁻²) em um experimento bifatorial composto por sete tratamentos associando pó ou extrato de parte aérea e raiz de canola ao fungo <i>Trichoderma harzianum</i> com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019. ...	61

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

BSA	Batata Sacarose Ágar
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DBC	Delineamento Blocos ao acaso
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
GSLs	Glucosinolatos
ITCs	Isotiocianatos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 <i>Rhizoctonia solani</i>	19
2.2 Uso de brássicas e da biofumigação no controle do tombamento de plântulas	21
2.3 <i>Trichoderma</i> sp. no controle do tombamento de plântulas	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Obtenção e multiplicação do fungo <i>Rhizoctonia solani</i>	26
3.2 Confirmação do grupo de anastomose do isolado de <i>Rhizoctonia solani</i>	26
3.3 Sequenciamento	27
3.3.1 Extração do ácido desoxirribonucleico	27
3.3.2 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose	27
3.3.3 Purificação das bandas e sequenciamento	28
3.4 Obtenção do pó de canola e preparo do extrato aquoso	28
3.5 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	28
3.6 Canola associada a biofumigação no manejo do tombamento de plântulas	29
3.6.1 Experimentos <i>in vitro</i>	29
3.6.1.1 Inibição do crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> AG4-HGI por compostos voláteis liberados por pó e extratos de parte aérea e raiz de canola ...	29
3.6.1.2 Inibição do crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> AG4-HGI pelo efeito direto do extrato de parte aérea ou raiz de canola.....	30
3.6.1.3 Efeito do pó e extrato de parte aérea ou raiz de canola sobre as hifas de <i>Rhizoctonia solani</i> AG4-HGI	30
3.7 Experimentos em casa de vegetação.....	30
3.7.1 Multiplicação do inóculo de <i>Rhizoctonia solani</i> AG4-HGI	31
3.7.2 Concentrações de pó e extrato de canola na supressão do tombamento de plântulas de beterraba	31
3.8 Canola associada ao agente de controle biológico <i>Trichoderma harzianum</i> sobre o crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> AG4 – HGI e em associação a biofumigação no manejo do tombamento de plântulas	33
3.8.1 Produto de controle biológico	33
3.8.2 Experimentos <i>in vitro</i>	33
3.8.3 Experimentos em casa de vegetação e em campo	35
3.8.4 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Confirmação do grupo de anastomose de hifas do isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG4 HGI.....	38
4.2 Experimentos <i>in vitro</i>	39

4.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	43
4.4 Experimentos em casa de vegetação.....	44
4.5 Canola associada ao agente de controle biológico <i>Trichoderma harzianum</i> e a biofumigação no manejo do tombamento de plântulas causado por <i>Rhizoctonia solani</i> AG4 – HGI	50
4.5.1 Experimentos <i>in vitro</i>	50
4.5.2 Experimentos em casa de vegetação e em campo	53
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO	68
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Rhizoctonia solani* Kuhn pode colonizar e matar as sementes antes de sua germinação, sendo muitas vezes confundido com baixa taxa de germinação. Além disso, o patógeno pode atacar a plântula logo após sua emergência, causando tombamento, *damping-off* ou rizoctoniose (BEDENDO et al., 2011).

A dificuldade no manejo dessa doença se deve à longa sobrevivência de *R. solani* no solo através de escleródios, à alta habilidade de competição saprofítica e de superar as defesas das plantas e o custo e ineficácia da aplicação de fungicidas (DAVID et al., 2018). No entanto, por muitos anos o manejo da rizoctoniose foi realizado através do uso de fungicidas, como fumigantes químicos (DAMICONE et al., 1993). Com a proibição do uso do fumigante brometo de metila e com a resistência do patógeno à fungicidas, o manejo da doença passou a ser uma preocupação para muitos produtores (CASTROAGUDIN et al., 2013). Além disso, o uso de fungicidas causa vários efeitos indesejáveis como a poluição do solo, da água e o desequilíbrio natural do solo, afetando negativamente todo o ecossistema (GROTH et al., 1990; DEHNE; OERKE, 1998; ANAND et al., 2010).

Neste contexto, a demanda crescente por alimentos livres de agroquímicos e a preocupação com o ambiente, tem levado muitos pesquisadores a buscar métodos alternativos para o manejo de doenças de plantas, entre as quais destacam-se o uso de resíduos industriais e domésticos (BUTRINOWSKI, 2016), material vegetal incorporado ao solo (ASCENCION; LIANG; YEN, 2015; MOCELLIN et al., 2017) e a utilização de agentes de controle biológico (BENÍTEZ et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2008).

O uso de material vegetal incorporado ao solo tem sido muito estudado como um método eficiente para o manejo de patógenos habitantes de solo, tendo em vista que muitas plantas apresentam na sua constituição compostos bioativos que atuam sobre os patógenos. Dentre essas plantas, as brássicas têm se destacado para o manejo de muitos patógenos (ASCENCION, LIANG; YEN, 2015; LACASA et al., 2015), as quais ao serem incorporadas ao solo liberam gases oriundos do processo de decomposição de seus tecidos (ROSA et al., 1999). O uso de brássicas incorporadas ao solo também tem sido associada a plasticultura, como forma de reter os gases gerados na decomposição dos tecidos vegetais, conferindo um efeito aditivo

ao manejo da doença (ROS et al., 2008; MOCCELLIN et al., 2017).

O uso de agentes de controle biológico são outra tática alternativa que pode ser utilizada, sendo o fungo *Trichoderma* spp. Pearson, um dos agentes de controle biológico mais utilizado no mundo (LÓPEZ-BUCIO et al., 2015). Esse fato se deve ao seu grande potencial no manejo de patógenos, tendo em vista, os diferentes modos de ação como a competição por espaço e nutrientes, a antibiose, o micoparasitismo, a fungistase, a indução de resistência, entre outros (BENÍTEZ et al., 2004).

Sabendo das particularidades e modos de ação de cada método de controle, acredita-se que a integração entre estes métodos constitui uma alternativa com maiores chances de sucesso, do que a utilização de um único método de forma isolada. Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar a capacidade do uso da canola incorporada ao solo, na forma de pó ou extrato, com e sem a biofumigação e associada ao agente de biocontrole *Trichoderma harzianum* Rifai em reduzir o potencial de inóculo de *R. solani* e, conseqüentemente, o tombamento de plântulas de beterraba.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhizoctonia solani*

O fungo *Rhizoctonia solani* foi primeiramente descrito por Julius Kühn causando doença em batata (*Solanum tuberosum*) em 1858 (ANEES; EDELHERMANN; STEINBERG, 2010). Este fungo não produz conídios e pertence a Ordem Ceratobasidiales (BEDENDO et al., 2011). A fase sexuada deste patógeno pertence ao Filo Basidiomycota (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) (HAWKSWORHT et al., 1995).

O fungo *R. solani* é um fungo cosmopolita, com vasto número de hospedeiros, que causa tombamento de plântulas, podridões de raiz e o apodrecimento do caule ou tronco (BOTELLHO et al., 2001) e o tombamento de plântulas em vários hospedeiros como em eucalipto (SILVEIRA et al., 2000), abobora, capim *Brachiaria*, jambú, urucum (GAINO et al., 2010), amendoim, feijão (CERESINI; FENILLE; SOUZA, 1996), batata (ROSA et al., 2005), maria-pretinha (SILVA-BARRETO et al., 2010), melão, tomate (KURAMAE et al., 2003), soja (FENILLE; SOUZA; KURAMAE, 2002), beterraba (DAVID et al., 2018), entre outros.

Este patógeno sobrevive saprofiticamente na matéria orgânica do solo e por meio de escleródios. Os escleródios atuam como estruturas de resistência e, são detectados no solo com relativa facilidade, porém, de difícil quantificação (BEDENDO et al., 2011). Geralmente, estas estruturas encontram-se nas camadas superficiais do perfil do solo, principalmente nos primeiros 10 cm, devido à dependência de oxigênio (CARDOSO, 1994). Assim, os escleródios e o micélio do fungo constituem o inóculo primário (GALINDO et al., 1983), que são disseminados localmente pelo vento, chuva, animais e implementos agrícolas (YORINORI, 2000). Sementes infectadas também são importantes fontes de inóculo primário do patógeno para o desenvolvimento da doença (ONESIROSAN, 1975).

Algumas condições ambientais que favorecem o desenvolvimento de *R. solani* e, conseqüentemente, o tombamento de plântulas, de forma geral, é a presença de alta umidade no solo e temperaturas maiores que 20 °C (BEDENDO et al., 2011). Para a cultura da beterraba, as condições ideais para a ocorrência da doença são temperaturas entre 22 e 35 °C (AGRIOS, 2005; NEHER; GALLIAN, 2011).

Quando nestas condições ambientais, e na presença do hospedeiro, os sintomas podem ser de pré ou pós emergência. Em pré emergência, as sementes podem ser atacadas logo após absorverem água para iniciar a germinação, pois, o tegumento amolecido e seus tecidos interiores encharcados favorecem a atuação do patógeno (BEDENDO et al., 2011). Em plantas jovens infectadas, os sintomas mais comuns são lesões com aspecto de encharcamento no colo da planta seguido de aparição de manchas de cor marrom no caule que resultam no tombamento (BEDENDO et al., 2011).

Para o manejo de doenças causadas por fitopatógenos habitantes de solo, as medidas de controle são baseadas no método da exclusão, que consiste na prevenção da entrada do patógeno na área. Neste contexto, recomenda-se a utilização de água de irrigação de boa procedência, sem contaminação de patógenos e evitar o transporte de solo e materiais contaminados de uma área para outra (GHINI, 2000). Por outro lado, uma vez uma área infestada por patógenos habitantes de solo deve-se adotar um conjunto de práticas para o manejo dessas doenças.

Para tanto, tradicionalmente, utiliza-se o tratamento das sementes com fungicidas (GOULART, 2002; MORATELLI et al., 2012), o tratamento químico do solo (GHINI, 1991; BEDENDO et al., 2011), a rotação de culturas (EMBRAPA, 2000; BEDENDO et al., 2011), o tratamento térmico (SILVA; OLIVEIRA-NAPOLEÃO; FALCÃO, 2001; BEDENDO et al., 2011) e tratamentos alternativos como tratamento biológico do solo (BEDENDO et al., 2011) e o uso de matéria orgânica incorporada ao solo (AMBRÓSIO et al., 2008).

O manejo do tombamento de plântulas, na maioria das vezes, é feito por meio de produtos químicos, como tratamentos de sementes ou fumigantes químicos de solo. O fumigante químico mais utilizado por anos consecutivos foi o brometo de metila que apesar de ser eficaz, mas por ser um produto de alta toxicidade, no Brasil desde 2002, a sua utilização tem sido restrita a fins específicos, seguindo o cronograma estipulado pelo Protocolo de Montreal, por ser prejudicial a camada de ozônio (BESRI et al., 2011).

Neste contexto, em muitos casos, os agricultores têm buscado métodos alternativos que sejam eficazes para serem utilizadas no manejo de patógenos habitantes de solo (GAMLIEL et al., 2000). Dentre os métodos alternativos, a incorporação de material vegetal ao solo, o uso de extratos ou óleos essenciais vêm sendo significativamente explorados, pois, muitas espécies apresentam compostos

bioativos como alcalóides, quinonas, flavonóides, saponinas, taninos, terpenos e glicosídeos, com baixo potencial de contaminação ao ambiente e sem risco a saúde dos seres humanos (DHINGRA et al., 2004) e que atuam diretamente sobre os patógenos (AMBRÓSIO et al., 2008).

Devido a isso, uma grande variedade de plantas tem sido estudada com potencial no controle de fitopatógenos, entre elas destacam-se as Brássicas que possuem em seus tecidos compostos conhecidos como glucosinolatos (GSLs) (FAHEY et al., 2001), os quais, são responsáveis pelo odor e pelo gosto característicos dessas espécies (DAS; TYAGI; KAUER, 2000). Após a hidrólise dos GSLs pela enzima mirosinase resultam principalmente nitrilas, isotiocianatos e o cianeto (SHAPIRO et al., 2001), dentre estes compostos, o alil-isotiocianato (AITC) é o mais bioativo entre as quebras de GSL (FAHEY et al., 2001; GIMSING; KIRKEGAARD, 2009), pode matar propágulos fúngicos por ação de vapor, atuando assim como um fumigante (NIELSEN; RIOS, 2000).

Produtos biológicos também mostram-se eficientes no controle de fitopatógenos habitantes de solo. Para o controle biológico de *R. solani* destacam-se *Pseudomonas aeruginosa* (SASIREKHA; SRIVIDYA, 2016), *Bacillus subtilis* (KHEDHER et al., 2015), *Trichoderma* spp. (LEWIS; LUMSDEN, 2001; TRILLAS et al., 2006; HUANG et al., 2016), entre outros.

2.2 Uso de brássicas e da biofumigação no controle do tombamento de plântulas

Vários estudos têm demonstrado que a incorporação de brássicas ao solo pode inibir vários agentes patogênicos (OLIVIER et al., 2006; LARKIN; GRIFFIN, 2007; LAZZERI et al., 2009). A incorporação de folhas de mostarda (*Brassica rapa* L.) (2,5 t ha⁻¹) ao solo reduziu a incidência de doenças causadas por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. Cumini Patel, Prasad e Mathur, após 15 dias da incorporação do tratamento ao solo (MAWAR; LODHA, 2002). Em outro estudo, onde se investigou o potencial do pó de folhas secas de mostarda, canola e mostarda-da-índia (*Brassica juncea* L.) incorporadas ao solo (concentração de 1%) uma semana antes da semeadura, com o objetivo de verificar o controle do tombamento de plântulas de pimenta causado por *R. solani*, observou-se que, no solo onde incorporou-se a mostarda foram obtidos os maiores índices de controle da

doença (ASCENCION; LIANG; YEN, 2015). Quando solo infestado com o fungo *R. solani* foram irrigados com 150 mL L⁻¹ de óleo essencial, extraído de sementes de mostarda constatou-se que houve 95% de controle do tombamento, em plântulas de feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris*), sem qualquer efeito aparente de fitotoxidez (DHINGRA et al., 2004).

O tratamento de sementes com brássicas também pode ser uma alternativa eficiente no manejo de doenças causadas por patógenos habitantes de solo. Sementes de repolho tratadas com sementes moídas de mostarda-da-índia associadas ao produto Biolan® não apresentaram danos a germinação e resultaram em uma redução significativa do tombamento de plântulas causado por *R. solani*, além disso, em testes cromatográficos constatou-se que o AITC foi o composto predominante nas sementes de mostarda-da-índia (CHUNG et al., 2002).

Apesar dessas espécies vegetais serem eficientes no manejo de doenças, tem se observado que, a quantidade de GSL ou de AITC produzidos pelas brássicas, varia de acordo com a espécie, condições de cultivo, parte da planta e condições ambientais no momento da degradação dos GSLs. Dentre as brássicas, a mostarda-da-índia, canola, repolho (*Brassica oleracea* L.) e nabiça (*Raphanus raphanistrum*) apresentam maior potencial no controle de fitopatógenos, principalmente habitantes do solo (DHINGRA et al., 2004; COHEN et al., 2005; MOTISI et al., 2009). Também há a influência da estação de semeadura e época de cultivo no teor de GSL, como observado num estudo realizado na Espanha, onde constatou-se que a concentração de GSL nas folhas de repolho colhidas na primavera foi maior do que a concentração de GSL em folhas colhidas na estação de outono (CARTEA et al., 2008).

Além disso, em outro estudo realizado na Califórnia, observou-se que após a incorporação do material proveniente das brássicas ao solo, as condições de umidade e temperatura também influenciam na quebra dos GSLs em AITCs, sendo que as concentrações de substâncias voláteis aumentaram com o aumento da temperatura do solo, quando este resíduo vegetal foi associado a solarização, e consequentemente, o controle dos patógenos *P. ultimum* e *S. rolfsii* foi mais eficiente (GAMLIEL; STAPLETON, 1993). O número de estruturas de sobrevivência viáveis de *R. solani* foi reduzido significativamente em tratamentos onde incorporou-se brócolis seguido da solarização do solo, assim como, o controle da doença foi significativamente maior onde houve a associação das técnicas de homogeneização de brócolis ao solo e aplicação de lona plástica (BLOK et al., 2000).

Neste contexto, sabendo da eficiência da utilização das brássicas no manejo de doenças causadas por patógenos habitantes de solo e, além disso, tendo evidências de que os isotiocianatos são os compostos mais bioativos contra fitopatopatógenos, é possível potencializar a ação destas moléculas com a biofumigação ao solo. Esse método promove o aprisionamento de gases fungitóxicos provenientes da decomposição acelerada, conferindo um efeito aditivo ao manejo da doença (ROS et al., 2008).

Material vegetal oriundo das brássicas podem ser associados a biofumigação propiciando resultados satisfatórios, a utilização de repolho associado a biofumigação para o controle de *F. oxysporium*, onde a associação proporcionou a eliminação dos propágulos do fungo após quinze dias de tratamento (RAMIREZ-VILLAPUDUA; MUNNECKE, 1988). O número de estruturas de sobrevivência viáveis de *R. solani* também foi reduzido significativamente em tratamentos onde incorporou-se brócolis seguido da solarização do solo, assim como, o controle da doença foi significativamente maior onde houve a associação das técnicas de homogeneização de brócolis ao solo e aplicação de lona plástica (BLOK et al., 2000). Resultado similar foi observado, ao incorporar ao solo resíduo de canola (30, 60, 90 e 120 t ha⁻¹), associadas a utilização de lona para a biofumigação por 10 dias, nas estações de inverno e verão, onde foi possível concluir que a associação entre as táticas foi eficiente no controle do tombamento de plântulas de pepino, causada pelo fungo *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., que a incorporação de resíduos de canola ao solo pode ser realizada em qualquer estação do ano, incluindo o inverno, uma vez que não houve diferença no controle do patógeno nas diferentes estações (MOCCELLIN et al., 2017).

2.3 *Trichoderma* sp. no controle do tombamento de plântulas

Dentre os fungos utilizados como agentes de controle biológico, os do gênero *Trichoderma* são reconhecidamente os mais importantes e mais estudados em relação a atividade de biocontrole, modo de ação, propriedades fisiológicas e bioquímicas, como também, adaptabilidade ecológica e ambiental (SILVA, 2000). Além disso, são isolados facilmente e possuem crescimento rápido, o que é uma grande vantagem na sua utilização como agente de biocontrole, pois facilita a sua

produção em larga escala (SAITO et al., 2009), e colonizam com eficiência o sistema radicular de diversas espécies de plantas (LÓPEZ-BUCIO et al., 2015).

Esses fungos são naturalmente encontrados no solo, e apresentam funções ecológicas importantes, pois participam da decomposição e mineralização dos resíduos vegetais, contribuindo com a disponibilização de nutrientes para as plantas (MENEZES et al., 2010). Após a descrição do gênero em 1794, o primeiro trabalho que descreveu um isolado de *Trichoderma* sp. como agente de biocontrole foi publicado em 1932, onde a espécie *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz foi descrita micoparasitando *R. solani* em mudas de citrus (WEINDLING, 1932). Dois anos depois, o mesmo autor relatou que a espécie poderia também atuar por competição por nutrientes (WEINDLING, 1934).

Desde então, muitas espécies do gênero estão sendo pesquisadas e desenvolvidas como agentes de biocontrole para diversos patógenos (LOUZADA, 2009). Espécies de *Trichoderma* spp. como agentes de controle biológico de organismos fitopatogênicos habitantes de solo podem atuar sobre os patógenos pela competição por espaço e nutrientes (VERMA et al., 2007), parasitismo ou antibiose (HARMAN, 2006; MUKHERJEE et al., 2008). Estes microrganismos podem controlar patógenos diretamente ou induzir a produção de substâncias no metabolismo das plantas, capazes de aumentar a resistência à patógenos (HERMOSA et al., 2012; LÓPEZ-BUCIO et al., 2015).

Alguns isolados de *Trichoderma* spp. testados em campo demonstraram ter efeitos nas plantas, aumentando seu potencial de crescimento e absorção de nutrientes, porcentagem de germinação das sementes e indução de mecanismos de defesa em plantas contra danos bióticos e abióticos (SHORESH et al., 2010). Dentre as espécies do gênero *Trichoderma* spp. os fungos *T. harzianum*, *T. viride* Pers., *T. virens* JH Mill., Giddens e AA Foster, *T. hamatum* Bonord., *T. pseudokoningii* Rifai são capazes de inibir o crescimento micelial, *in vitro*, de *R. solani*, onde constataram-se em análises de microscopia eletrônica de varredura o micoparasitismo para o isolado *T. koningii* e inibição por antibiose de até 70% (GAJERA et al., 2016). Em experimentos onde testaram-se os isolados de *Trichoderma* e *Gliocladium* Corda ao solo infestado com *R. solani* foi observado que ambos os fungos reduziram o tombamento das plântulas em 85% após quatro semanas da adição dos agentes de biocontrole ao solo, em comparação ao tratamento controle (LEWIS; LUMSDEN, 2001). Em outro estudo, ao testarem os isolados *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg, *T.*

harzianum e *Trichoderma* spp. como possíveis agentes de controle biológico contra o fungo *R. solani*, no manejo do tombamento de plântulas de feijão, os autores constataram que apenas o fungo *T. asperellum* foi eficaz, reduzindo a incidência da doença em 30,5% (ASAD-UZ-ZAMAN et al., 2015).

Apesar desta tática de controle ser eficiente, a integração entre diferentes métodos pode potencializar o controle. Em experimentos, realizados com o objetivo de controlar a podridão negra da raiz do morango causada por *R. solani*, onde testou-se a integração de um isolado de *T. harzianum*, óleo de mostarda e um fungicida químico, os resultados demonstraram que o melhor controle da doença foi obtido com o uso integrado dos métodos de controle (ASAD-UZ-ZAMAN et al., 2015). Em experimentos onde foram associados diferentes métodos de controle, incorporando ao solo *B. carinata* e *Trichoderma* spp. e posterior biofumigação com lona plástica, observou-se um efeito protetor adicional exercido pelo fungo *Trichoderma*. Esse resultado foi atribuído à capacidade do fungo em colonizar a rizosfera da beterraba açucareira, pois verificou-se uma grande quantidade de micélio crescida sobre toda a superfície da raiz (GALLETTI et al., 2008).

Deste modo, a associação entre diferentes técnicas como o uso de brássicas, a biofumigação e microrganismos antagonistas podem potencializar o controle de fitopatógenos habitantes de solo. Além de ser uma alternativa livre de danos ambientais e que não deixará resíduos nos alimentos, podendo ser utilizada no manejo de doenças em cultivos convencionais e orgânicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia e em casa de vegetação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, no Câmpus de Pato Branco.

3.1 Obtenção e multiplicação do fungo *Rhizoctonia solani*

O isolado de *R. solani* AG4-HGI foi obtido da coleção de fungos do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, concedido anteriormente pelo Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, previamente isolado de plantas de beterraba com sintomas de rizoctoniose.

3.2 Confirmação do grupo de anastomose do isolado de *Rhizoctonia solani*

Para a realização deste teste foram utilizados isolados padrões de *R. solani* obtidos da Coleção de Cultura de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente: AG 1-IA (CMAA 908) AG 1-IB (CMAA 909); AG 2-2 IIIB (CMAA 907); AG3 ST11-6 (CMAA 1588); AG4-AHI (CMAA 903); AG4 140 (CMAA 904). O experimento foi realizado de acordo com o procedimento padrão de identificação do grupo de anastomose (AG), segundo a metodologia descrita por Ceresini, Fenille, Souza (1996).

O experimento foi conduzido por meio do teste de cultura dupla entre dois isolados. Em uma das extremidades da placa de Petri (9 cm de diâmetro), contendo o meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) foi colocado um disco de meio de cultivo BDA contendo o micélio de *R. solani* AG4-HGI em estudo, previamente crescido por 48 horas a 25 °C. Na extremidade oposta foi adicionado um disco de BDA contendo o micélio de um dos isolados de *R. solani* obtidos da EMBRAPA. A classificação das reações de anastomoses de hifas foi realizada utilizando o critério de MacNish e Sweetingham, (1993). A reação de anastomose foi observada em microscópio óptico no aumento de 200 x.

3.3 Sequenciamento

3.3.1 Extração do ácido desoxirribonucleico

Para a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) do isolado de *R. solani* AG4-HGI, o fungo foi previamente crescido em meio de cultivo BDA por três dias a ± 24 °C, no escuro. Posteriormente, o micélio do patógeno foi raspado e macerado em cadinho adicionando-se nitrogênio líquido. Após a maceração o DNA foi extraído através da metodologia descrita por Doyle e Doyle (1987).

3.3.2 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose

Para a realização da PCR foram utilizados os primers ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3) e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3 ') descritos por White et al. (1990). Os primers foram utilizados para amplificar regiões de aproximadamente 700 pb entre ITS1 / ITS4, que incluiu as regiões ITS e o gene 5.8S. Todos os reagentes necessários foram reunidos em uma mistura, contendo volume final de 12,5 μ L (Tabela 1). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 72 °C e 1 minuto e meio a 72 °C e extensão final de 72 °C por 10 min.

Tabela 1 – Componentes utilizados para a Reação em Cadeia da Polimerase para identificação do isolado em estudo. UTFPR, Pato Branco – 2019.

Reagente	Quantidade
Buffer 10x	5,0 μ L
dNTP (2mm)	2,0 μ L
Primer ITS1F Forward	2,0 μ L
Primer ITS-4 Reverse	2,0 μ L
DNA	1,0 μ L
Taq	0,4 μ L
H ₂ O miliq	34,6 μ L
MgCl	3,0 μ L

O produto da PCR foi utilizado para a realização da eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5%, acrescidos de brometo de etídio (EtB), a 10 mg/mL, em tampão Tris/Borato/EDTA 1X para visualização dos fragmentos amplificados em luz ultravioleta. Após 40 minutos, o gel foi revelado em luz ultravioleta e com auxílio de um bisturi, as bandas foram recortadas para purificação e

sequenciamento.

3.3.3 Purificação das bandas e sequenciamento

As bandas de DNA formadas em gel de agarose após a eletroforese foram purificadas por meio do kit de purificação de DNA da Ludwig Biotecnologia®. Em seguida, os materiais foram enviados para sequenciamento da região amplificada. As sequências de nucleotídeos obtidas por meio do sequenciamento do DNA do isolado foi utilizado para realizar a análise Blast no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para determinar a identidade do isolado em estudo.

3.4 Obtenção do pó de canola e preparo do extrato aquoso

Para a obtenção do pó de canola, plantas da cultivar “Hyola 433” foram colhidas no estágio fenológico de floração, separando-se a parte aérea das raízes. As raízes foram lavadas e ambas as partes foram secas a ± 25 °C, no escuro, até atingir massa constante. Em seguida foram moídas em moinho de facas (peneira 0,25mm) e armazenadas em sacos plásticos pretos em geladeira a ± 4 °C até utilização.

Para o preparo dos extratos de canola foram colocados 12 gramas de material vegetal desidratado (raiz ou parte aérea) em 88 mL de água destilada fria em Becker de 500 mL. A mistura foi homogeneizada e, logo em seguida, o extrato vegetal foi filtrado em camada dupla de gaze, obtendo o extrato na concentração de 12%. A partir desta concentração foram realizadas diluições com água para obtenção das concentrações de 3; 6; 9 e 12%.

3.5 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Amostras de pó de parte aérea e raiz de canola foram colocadas até a metade de um balão de 10 mL de capacidade e adicionado diclorometano até o menisco. Essa suspensão foi filtrada e a partir dela foram retirados 20 μ L, os quais foram diluídos em 1,5 mL de acetona.

As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química

da Universidade de São Paulo. A composição química das amostras dos extratos de canola foi determinada por cromatografia a gás, acoplada a espectrômetro de massas GC-MS (Shimadzu, modelo QP2010), equipado com coluna ZB-5HT Inferno (30m x 0,25mm – filme 0,25 μ m). A coluna foi aquecida a 40 °C por 5 minutos, taxa de crescimento de 10 °C/min até 250 °C. O gás de arraste utilizado foi o Hélio (83,5 kPa, vazão de 1,5 mL/min), com injeção no modo splitless. O espectrofotômetro de massas foi operado no modo scan, com faixa m/z 41-400.

A identificação das substâncias foi realizada por meio de comparação com o tempo de retenção do padrão e confirmados pelo espectro de massa das substâncias analisadas, com banco de dados do sistema GC-MS (Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology - NIST 98 MS Library /Database in Saturn and NIST Format).

3.6 Canola associada a biofumigação no manejo do tombamento de plântulas

3.6.1 Experimentos *in vitro*

3.6.1.1 Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI por compostos voláteis liberados por pó e extratos de parte aérea e raiz de canola

Para a montagem destes experimentos, pó de parte aérea ou raiz de canola (0,00; 0,03; 0,06; 0,09 e 0,12 mg) e 100 μ L de água destilada esterilizada a cada 0,03 mg de pó, ou 3 mL de extrato da parte aérea ou raiz (0, 3, 6, 9 e 12%) foram colocados no fundo de placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Em outro fundo de placa de Petri, contendo o meio de cultura BDA, foi colocado um disco de 5 mm de micélio do patógeno cultivado em meio por sete dias a ± 24 °C. Em seguida, os fundos das placas de Petri foram sobrepostos, cuja placa de Petri contendo o patógeno permaneceu na parte superior e vedados com plástico filme para reter os gases. Como tratamento controle foram utilizadas placas de Petri com o meio de cultivo BDA contendo apenas um disco de 5 mm de meio de micélio do patógeno.

Após a montagem do experimento, as placas de Petri foram armazenadas a ± 25 °C em câmara de crescimento, no escuro, até que o patógeno crescesse totalmente em uma das placas de Petri. Em seguida, todas as placas foram

destampadas e fotografadas para avaliar a área do crescimento micelial do patógeno por meio do programa Uthsca Image Tool®.

Os experimentos foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com cinco concentrações de pó ou extrato de parte aérea ou de raiz de canola e 10 repetições por concentração. O percentual de inibição do patógeno foi calculado de acordo com a fórmula: $\text{Inibição (\%)} = (Dc - Dt) / Dc \times 100$, onde Dc = diâmetro da colônia no tratamento controle e Dt = diâmetro da colônia em uma determinada concentração do pó ou extrato de canola.

3.6.1.2 Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI pelo efeito direto do extrato de parte aérea ou raiz de canola

Para verificar o efeito direto do extrato sobre o crescimento do patógeno, os extratos de canola nas concentrações 0, 3, 6, 9 e 12% foram adicionados ao meio de cultivo BDA fundente e vertido em placas de Petri de (9 cm de diâmetro). Após solidificar foi repicado um disco de 5 mm de BDA, contendo o micélio do patógeno. O desenho experimental e a avaliação seguiram o procedimento descrito no item 3.6.1.1.

3.6.1.3 Efeito do pó e extrato de parte aérea ou raiz de canola sobre as hifas de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI

Para avaliar o efeito dos compostos liberados pelo pó ou extrato de canola sobre o micélio de *R. solani* AG4-HGI foram realizadas análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso foram retirados aleatoriamente amostras de micélio dos experimentos descritos nos itens 3.6.1.1 e 3.6.1.2, nas maiores concentrações de pó e extrato de aérea/raiz de canola (1,2 g e 12%) e tratamento controle. Três amostras de micélio do patógeno de cada tratamento foram fixadas em fita adesiva de cobre com auxílio de um suporte de alumínio, posteriormente foram alocadas no microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM 3000 operando em 15 kV. As imagens foram obtidas em ampliações de 800 x.

3.7 Experimentos em casa de vegetação

3.7.1 Multiplicação do inóculo de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI

Duzentas gramas de arroz e 100 mL de água destilada foram adicionados em sacos plásticos de 1 L e autoclavados por 30 minutos a 120 °C. Em seguida, em cada saco foram adicionados 10 discos de micélio (5 mm de diâmetro) de *R. solani* AG4-HGI, previamente crescido em meio de cultivo BSA por três dias a 24 °C. Posteriormente, o substrato foi homogeneizado manualmente e armazenado em câmara de crescimento por 15 dias a 24 °C. Decorrido esse período, os sacos foram abertos e o substrato colonizado pelo patógeno foi colocado em bandejas plásticas de 52 x 30 cm para a secagem em temperatura ambiente (25 °C) por aproximadamente 5 dias. Em seguida, o inóculo de *R. solani* AG4-HGI foi moído em liquidificador, na baixa rotação e armazenado em sacos plásticos pretos na geladeira, no escuro até a utilização.

3.7.2 Concentrações de pó e extrato de canola na supressão do tombamento de plântulas de beterraba

Para a realização dos experimentos em casa de vegetação, utilizou-se solo (horizonte B) não esterilizado, obtido na área experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A análise química do solo apresentou os seguintes valores: pH em água de 5,40; matéria orgânica de 18,76 g.dm⁻³; Mg (1,70 cmol_c⁽⁺⁾).dm⁻³, K (0,85 cmol_c⁽⁺⁾).dm⁻³; P (1,02 mg).dm⁻³ e Ca (2,20 cmol_c⁽⁺⁾).dm⁻³.

Para a montagem dos experimentos dez sacos plásticos pretos de 5 L de capacidade foram individualmente preenchidos com 3,5 kg de solo e 35 g de inóculo de *R. solani* AG4-HGI. Em seguida, o conteúdo de cada saco foi homogeneizado e mantido em casa de vegetação por oito dias. Decorrido esse período, pó de canola ou extrato foram adicionados em duplicata. No experimento com pó de parte aérea ou raiz de canola foram adicionadas as concentrações 0, 3, 6, 9 e 12% do pó ao solo, e nos experimentos com extratos de parte aérea ou raiz de canola foram adicionados 100 mL de extrato de cada uma das respectivas concentrações (0, 3, 6, 9 e 12%) ao solo. Em seguida, metade dos sacos (um de cada concentração) foram fechados com elástico para a retenção dos gases, e os demais permaneceram abertos. Os sacos foram mantidos em repouso em casa de vegetação,

por mais oito dias. Após esse período, os nos sacos foram manualmente agitados visando a homogeneização do substrato e metade do material foi transferido para vasos de plástico pretos com capacidade para 300 g. Dez sementes de beterraba da cultivar Katrina, tratadas com 0,15% de Thiram foram semeadas por vaso. O solo foi irrigado diariamente de acordo com a necessidade da cultura. Após a emergência da primeira plântula foram avaliadas diariamente a emergência e o tombamento de plântulas. O número de plantas sobreviventes, a comprimento das plântulas (cm) e a massa das plântulas (mg) foram avaliados ao final do experimento.

Foram instalados experimentos individuais para o pó e extrato de parte aérea e de raiz de canola, totalizando quatro estudos. Estes experimentos foram conduzidos em DIC, em esquema bifatorial (5 x 2), com cinco concentrações de pó ou extrato (parte aérea ou de raiz de canola) com e sem a biofumigação, com 10 repetições por tratamento.

A outra metade do solo foi utilizado para avaliar a atividade microbiana do solo ($\text{mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ solo}$) e quantificar o inóculo de *R. solani* AG4-HGI sobrevivente no solo (UFC g^{-1} de solo).

Atividade microbiana.

A atividade microbiana do solo foi avaliada por meio do método de desprendimento de CO_2 (GRISI, 1978) a partir das ampstras coletadas no dia da semeadura e no último dia de avaliação de emergência e tombamento de plântulas.

Estes experimentos foram conduzidos em DIC, em esquema bifatorial (5 x 2), com cinco concentrações de pó ou extrato de parte aérea ou de raiz de canola com e sem a biofumigação, com três repetições por tratamento.

Quantificação do inóculo de *Rhizoctonia solani*.

Para a quantificação do inóculo de *R. solani* AG4-HGI utilizaram-se amostras de solo coletadas após oito dias da infestação com o patógeno e no final do experimento. Para o isolamento e quantificação do patógeno foram utilizadas placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo o meio de cultura semi-seletivo para *R. solani* AG4-HGI (KO; HORA, 1971), onde foi plaqueado 1 mL das soluções (10^2) preparadas a partir do solo contendo os respectivos tratamentos. As placas foram armazenadas a $\pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas até o crescimento das unidades formadoras de colônias (UFCs) do fungo nas placas.

Para a análise desta variável, os experimentos foram conduzidos em DIC, em esquema bifatorial (5 x 2), com cinco concentrações de pó ou extrato de parte

aérea ou de raiz de canola com e sem a biofumigação, com três repetições por tratamento.

3.8 Canola associada ao agente de controle biológico *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4 – HGI e em associação a biofumigação no manejo do tombamento de plântulas

3.8.1 Produto de controle biológico

O produto de controle biológico (PB) utilizado foi o TRICHODERMIL® um fungicida microbiológico composto de linhagem selecionada do fungo *Trichoderma harzianum*, denominada ESALQ 1306.

3.8.2 Experimentos *in vitro*

Efeito de compostos de pó ou extrato de canola e de compostos voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI.

Neste estudo foram testados os seguintes tratamentos: T1) extrato de canola (parte aérea ou raiz) em meio fundente + *T. harzianum*; T2) extrato de canola (parte aérea ou raiz) + *T. harzianum*; T3) pó de canola (parte aérea ou raiz) + *T. harzianum*; T4) apenas o *T. harzianum*; T5) apenas extrato de canola (parte aérea ou raiz) em meio fundente; T6) apenas pó de canola (parte aérea ou raiz); T7) apenas extrato de canola (parte aérea ou raiz); e T8) controle.

Para a montagem deste estudo foi utilizado o método de placas sobrepostas. Para tanto, placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BSA onde no centro da placa foi adicionado um disco de 5 mm de diâmetro de BSA contendo o micélio de *R. solani* AG4-HGI, previamente crescido por três dias a 25 °C, exceto nos tratamentos T1 e T5. Nesses tratamentos, o meio BSA foi substituído pelo meio de cultivo BSA acrescido de extrato a 12%. No fundo da placa oposta foram adicionados os respectivos tratamentos. No T1 em outro fundo de placa de Petri, contendo o mesmo meio de cultivo foi feita uma linha reta com o produto biológico, com uma lâmina de vidro esterilizada. No tratamento T2 foram utilizados fundos de

placas de Petri bipartidas, onde em uma das divisórias foi adicionado o meio de cultivo BSA e foi adicionado o *T. harzianum* em linha reta, e na outra foram adicionados 5 mL do extrato a 12%. No tratamento T3 foram utilizados fundos de placa de Petri e adicionadas 0,6 g de pó de canola (parte aérea ou de raiz) e 600 µL de água destilada esterilizada. No tratamento T4, em uma placa de Petri, contendo meio de cultura BSA foi adicionado o produto biológico em linha reta.

Nos tratamentos T5, T6, T7 e T8 o *T. harzianum* não foi adicionado. No tratamento T5 foi utilizada apenas a placa de meio fundente contendo o patógeno. No tratamento T6, em um fundo de placa de Petri foram adicionadas 0,6 g de pó de canola e 600 µL de água destilada esterilizada. No tratamento T7, em um fundo de placa de Petri foram adicionados 5 mL de extrato, a 12%, e no tratamento controle (T7) foi utilizada apenas a placa contendo o meio de cultivo BSA com o disco do patógeno. Após a sobreposição das placas, as mesmas foram vedadas com plástico filme e incubadas a ± 25 °C até que o crescimento do fungo *R. solani* AG4-HGI ocupasse totalmente a placa em qualquer um dos tratamentos. Este experimento foi conduzido em DIC, com seis repetições por tratamento e conduzido duas vezes.

Efeito de compostos de pó ou extrato de canola e efeito direto exercido pelo *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI.

Foi avaliado também o efeito do produto biológico em contato direto com o patógeno, associado ou não ao pó e ao extrato de parte aérea ou raiz de canola. Para tanto foi montado um experimento com os tratamentos: T1) extrato de canola (parte aérea ou raiz) em meio fundente + *T. harzianum*; T2) extrato de canola (parte aérea ou raiz) + *T. harzianum*; T3) pó de canola (parte aérea ou raiz) + *T. harzianum*; T4) apenas o *T. harzianum*; e T5) controle.

Para a montagem dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 foram utilizadas placas de Petri com meio de cultivo BSA. No tratamento T1, o meio de cultivo BSA foi acrescido de 12% de extrato de canola (parte aérea ou de raiz). Em uma das extremidades de todas as placas dos respectivos tratamentos foi adicionado um disco de 5 mm de diâmetro de BSA, contendo o micélio de *R. solani* AG4-HGI, previamente crescido por três dias a ± 24 °C, e na extremidade oposta foi feita uma linha reta de *T. harzianum*, com uma lâmina esterilizada. Para a montagem dos tratamentos T2 e T3 em outros fundos de placas de Petri foram adicionados, separadamente, 5 mL do

respectivo extrato vegetal a 12% ou 0,6 g do pó de canola (parte aérea ou raiz) e 600 μL de água destilada esterilizada, respectivamente. No tratamento controle foram utilizadas placas de Petri contendo o meio de cultivo BSA, onde foi adicionado na extremidade da placa de Petri um disco de 5mm de BSA contendo o micélio do patógeno. Após a montagem do experimento, quando necessário as placas de Petri foram sobrepostas. Em seguida todas as placas foram vedadas e incubadas a $\pm 25^\circ\text{C}$ em câmara de crescimento, no escuro, até que o crescimento micelial do fungo preenchesse totalmente o meio de cultivo de uma das placas de Petri. Este experimento foi conduzido no DIC com seis repetições por tratamento e repetido duas vezes. As avaliações destes estudos *in vitro* seguiram o descrito no item 3.6.1.

3.8.3 Experimentos em casa de vegetação e em campo

Experimento em casa de vegetação.

Para a condução dos experimentos, o solo utilizado foi obtido do horizonte B na área experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A análise química do solo apresentou os seguintes valores: pH em água de 5,4, matéria orgânica de $18,76 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, Mg ($1,7 \text{ cmol}_c^{(+)}\cdot\text{dm}^{-3}$), K ($0,85 \text{ cmol}_c^{(+)}\cdot\text{dm}^{-3}$), P ($1,02 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) e Ca ($2,2 \text{ cmol}_c^{(+)}\cdot\text{dm}^{-3}$).

Para a instalação dos experimentos, primeiramente foram colocados 3,5 kg de solo e 35 g de inóculo de *R. solani* AG4-HGI, em dez sacos plásticos pretos (capacidade de 5 L). Em seguida, o solo de cada saco foi homogeneizado e mantidos em casa de vegetação por oito dias. Decorrido esse período foram adicionadas separadamente em duplicata os tratamentos: T1) controle positivo (solo infestado com *R. solani* AG4-HGI); T2) controle negativo (solo sem patógeno); T3) pó de canola; T4) extrato de canola; T5) pó de canola + *T. harzianum*; T6) extrato de canola + *T. harzianum*; e T7) Apenas o *T. harzianum*.

Para os tratamentos com pó de parte aérea ou raiz de canola foi utilizada a concentração de 6%, e posteriormente, o solo foi umedecido com 100 mL de água. Nos tratamentos com extrato foram adicionados 100 mL de extrato de parte aérea ou de raiz de canola, a 12% ao solo infestado. Quando nos tratamentos associou-se o *T. harzianum* foram adicionadas as respectivas concentrações de pó ou extrato juntamente com 1 mL de produto biológico (2×10^8 conídios/mL) a cada 300g de solo.

Nos tratamentos controle, o solo foi infestado com inóculo de *R. solani* AG4-HGI no controle positivo, e no controle negativo foi utilizado apenas o solo sem infestação.

Foram preparados dois sacos de cada tratamento, assim, metade dos sacos permaneceram abertos após a adição dos tratamentos e a outra metade dos sacos foram fechados com um elástico de borracha para a biofumigação. Os sacos permaneceram em repouso em casa de vegetação por mais oito dias. Decorrido esse período, o substrato dos sacos foi agitado para a total homogeneização e, posteriormente foi transferido para vasos de plástico preto com capacidade de 300 g. Em cada vaso foram semeadas 10 sementes de beterraba monogérmica tratadas com 0,15% de Thiram, após a semeadura foi realizada a irrigação do solo dos vasos diariamente de acordo com a necessidade.

As avaliações de emergência e tombamento de plântulas foram realizadas diariamente por 21 dias, iniciando a partir da primeira plântula emergida. A base de comparação para obter os valores (%) de emergência e tombamento foi o número de sementes plantadas e o número de plântulas tombadas. Ao final do experimento foram quantificadas as plântulas sobreviventes de todos os tratamentos, a comprimento e a massa de plântulas.

Os experimentos em casa de vegetação foram conduzidos em DIC, em esquema fatorial (Tratamentos X Biofumigação) com dez repetições por tratamento e em dois experimentos para cada parte da planta de canola (parte aérea ou raiz).

O restante do solo dos respectivos tratamentos foi utilizado para análise de atividade microbiana do solo e para a quantificação do inóculo de *R. solani* AG4-HGI presente no solo. Estas variáveis foram avaliadas conforme o descrito no item 3.7.2.

Experimento em campo.

Parcelas de 1 m² foram infestadas com 100 g de inóculo de *R. solani*, exceto no tratamento controle. Após oito dias da infestação do solo, 300 g de pó (parte aérea ou raiz) ou 300 mL de extrato de parte aérea ou raiz de canola (12% m/v) foram adicionados ao solo. Nos tratamentos contendo o *T. harzianum* adicionaram-se 2 mL do produto Trichodermil® por parcela. Os tratamentos foram: T1) Controle com patógeno; T2) Controle sem patógeno; T3) Pó de parte aérea; T4) Pó de raiz; T5) Pó de parte aérea + *T. harzianum*; T6) Pó de raiz + *T. harzianum*; T7) Extrato de parte aérea; T8) Extrato de raiz; T9) Extrato de parte aérea + *T. harzianum*; T10) Extrato de

raiz + *T. harzianum* e T11) Apenas o *T. harzianum*.

Após a adição dos tratamentos, o solo foi irrigado conforme a necessidade da cultura e, posteriormente foram colocados filmes plásticos tipo dupla-face com 1,25 m² de área, nos tratamentos com biofumigação. Nas bordas da parcela, o plástico foi enterrado, deixando 25 cm de bordadura. O plástico permaneceu sobre as parcelas por oito dias. Decorrido esse período, o plástico foi retirado e coletadas amostras de solo de cinco parcelas, formando uma amostra composta usada para a avaliação da atividade microbiana e quantificação do inóculo do patógeno. Em seguida, 50 sementes de beterraba foram semeadas por parcela. Após a emergência da primeira plântula, o número de plântulas tombadas e emergidas foi avaliado ao longo de 21 dias. Amostras de solo foram coletadas novamente para verificar a atividade microbiana e quantificar o inóculo de *R. solani* AG4-HGI nas parcelas ao final do experimento (21 dias após início das avaliações), conforme descrito na metodologia do item 3.7.2.

3.8.4 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos *in vitro* foram testados quanto aos pressupostos da análise de variância (ANOVA), utilizando-se os testes de normalidade de Shapiro Wilk e de homogeneidade de Bartlett ($\alpha= 5\%$). Quando os dados não atenderam aos pressupostos foram transformados com arcoseno raiz quadrada. Em seguida, realizou-se a ANOVA e teste de comparação múltipla de médias de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro.

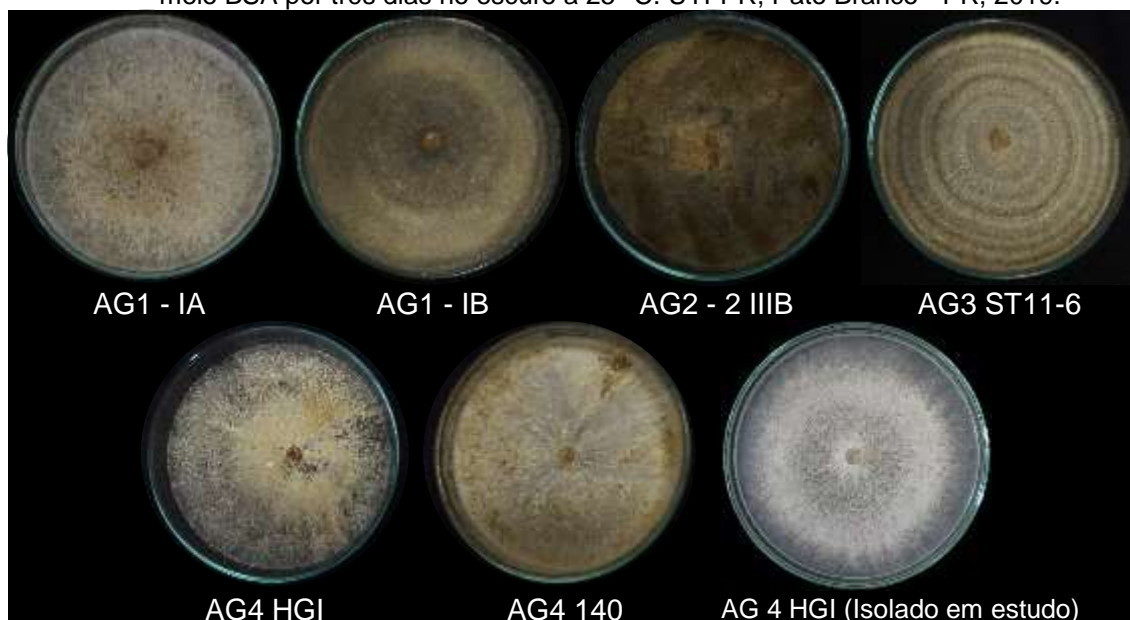
Os dados dos experimentos em casa de vegetação e em campo foram testados quanto aos pressupostos da ANOVA e, quando não atenderam foram transformados para arcoseno raiz quadrada ou $x = \log(x)$. Em seguida realizou-se a ANOVA e teste de comparação múltipla de médias de Duncan, em nível de 5% de probabilidade de erro.

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação do grupo de anastomose de hifas do isolado de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI

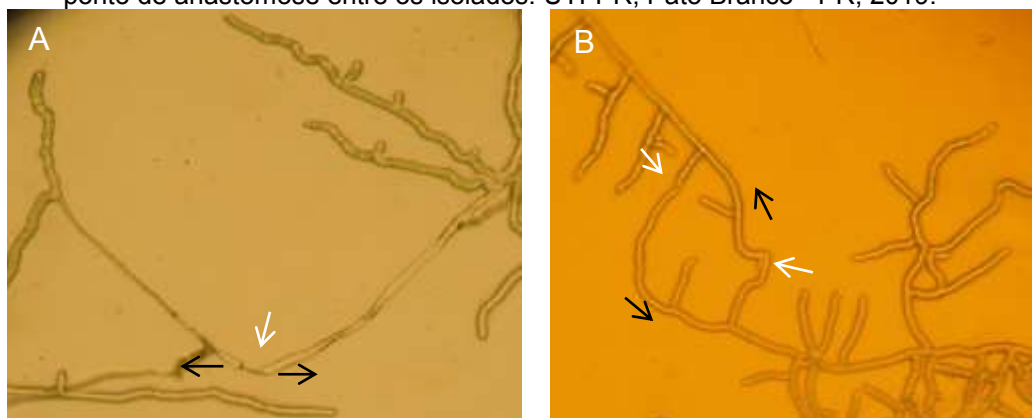
Observou-se diferenças na coloração do micélio dos isolados de *R. solani* de diferentes grupos de anastomose em meio de cultivo BSA. A coloração do micélio variou entre marrom escuro, marrom claro e branco (Figura 1). Em meio de cultivo BSA, o isolado *R. solani* AG4 HGI (em estudo) cresceu com coloração inicialmente branca, tornando-se marrom escura com o passar dos dias.

Figura 1 – Isolados de *Rhizoctonia solani* de diferentes grupos de anastomose crescidos em meio BSA por três dias no escuro a 25 °C. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.



Não houve reação de anastomose de hifas entre os isolados de *R. solani* AG 1-IA, AG 1-IB, AG 2-2 IIIB e AG3 ST11-6 e o isolado *R. solani* AG4 HGI em estudo. Por outro lado, ao observar o pareamento de hifas entre os isolados AG4 140 e o isolado *R. solani* AG4 HGI em estudo, observou-se a reação de anastomose de hifas; no entanto, ocorreu a morte das células em anastomose e das células adjacentes (Figura 2A). Quando o estudo foi realizado entre o isolado AG4-HGI proveniente da EMBRAPA e o isolado *R. solani* AG4 HGI em estudo, observou-se que houve a fusão da membrana e da parede da hifa; no entanto, o ponto de anastomose não é claramente visível (Figura 2B).

Figura 2 – Imagens de microscopia óptica (aumento de 200x) da reação de anastomose de hifas entre isolados de *Rhizoctonia solani*. A) A seta preta para a direita indica o isolado AG4 140, a seta preta para a esquerda indica o isolado *Rhizoctonia solani* AG4-HG1 (em estudo) e a seta branca indica o ponto de anastomose com morte das células; B) A seta preta apontada para cima indica o isolado *Rhizoctonia solani* AG4-HG1 (em estudo), a seta preta apontada para baixo indica o isolado AG4-HG1 e as setas brancas indicam ponto de anastomose entre os isolados. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.



Além disso, após a amplificação por PCR da região ITS1 / ITS4 e sequenciamento, confirmou-se que o isolado em estudo pertence a espécie *Rhizoctonia solani* e ao grupo de anastomose AG4-HGI, com 98% de similaridade de acordo com a análise Blast no GenBank.

4.2 Experimentos *in vitro*

Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI por compostos voláteis liberados por extratos e pó de parte aérea e de raiz de canola

Os compostos voláteis liberados pelo pó e extrato de parte aérea e raiz de canola inibiram o crescimento micelial de *R. solani* AG4 HGI (Figuras 3 e 4). Nos experimentos com o pó de parte aérea e extrato de parte aérea e raiz de canola, a inibição do crescimento micelial ocorreu em função do aumento das concentrações de pó testadas (Figuras 3A, 3C e 3D). No experimento com o pó de raiz de canola, o ponto de máxima foi estimado na concentração de 0,11 g, com 83,3% de inibição do crescimento micelial do isolado *R. solani* AG4-HG1 (Figura 3B).

Figura 3 – Efeito de concentrações de compostos voláteis liberados por pó e extrato de canola sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI, *in vitro*. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

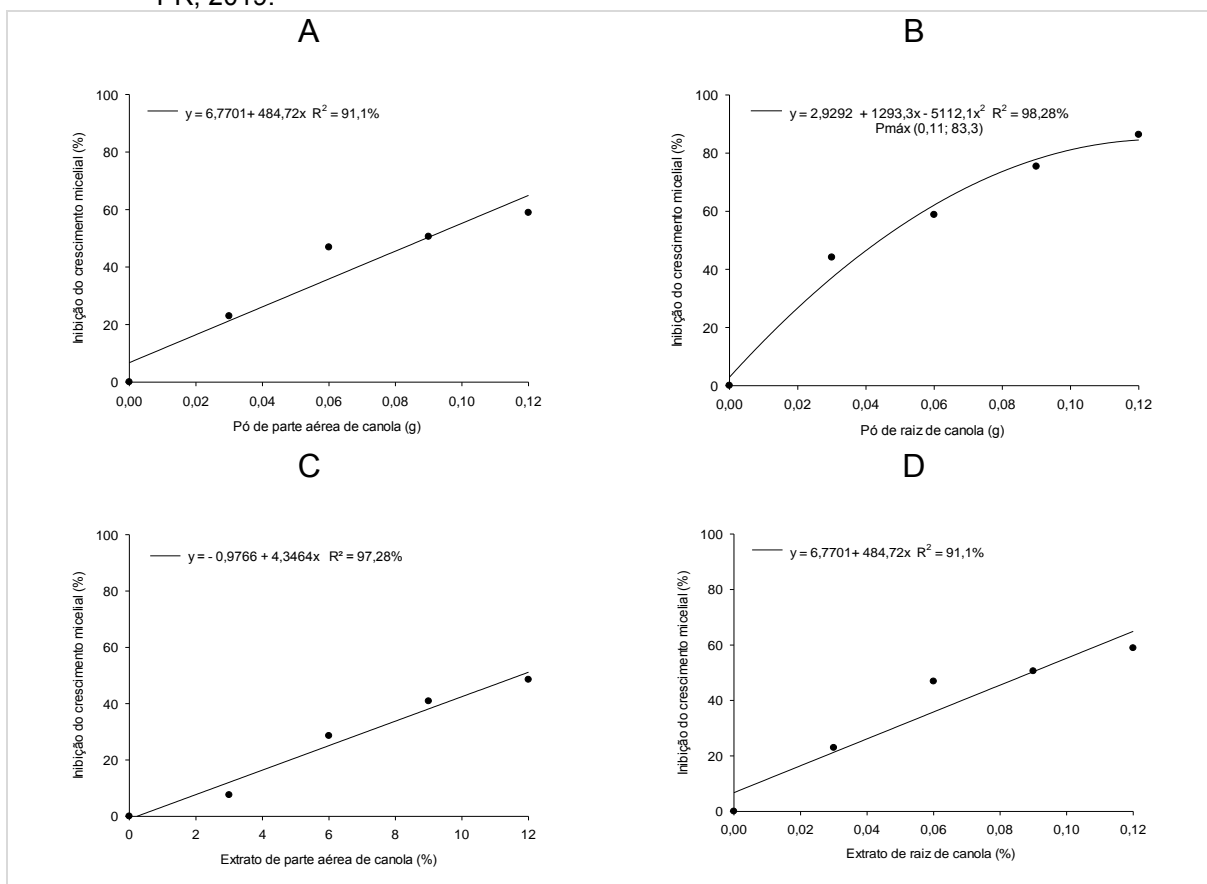


Figura 4 – Efeito de concentrações de compostos voláteis liberados por pó e extrato de canola sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI, *in vitro*, após três dias de cultivo em meio BSA, a ± 25 °C no escuro. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.



Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI por compostos de efeito direto liberados por extratos de canola

Quando os extratos de parte aérea e de raiz de canola foram misturados ao meio de cultivo BSA, a inibição do crescimento micelial do fungo *R. solani* AG4 HGI também aumentou em função do aumento das concentrações testadas neste estudo (Figuras 5 e 6). Os extratos de parte aérea e de raiz de canola a 12% inibiram o crescimento micelial de *R. solani* em 36,8% e 97%, respectivamente (Figura 5A e 5B).

Figura 5 – Efeito de concentrações de compostos de efeito direto liberados pelo extrato de canola sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI, *in vitro*. (A) Extrato de parte aérea; (B) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

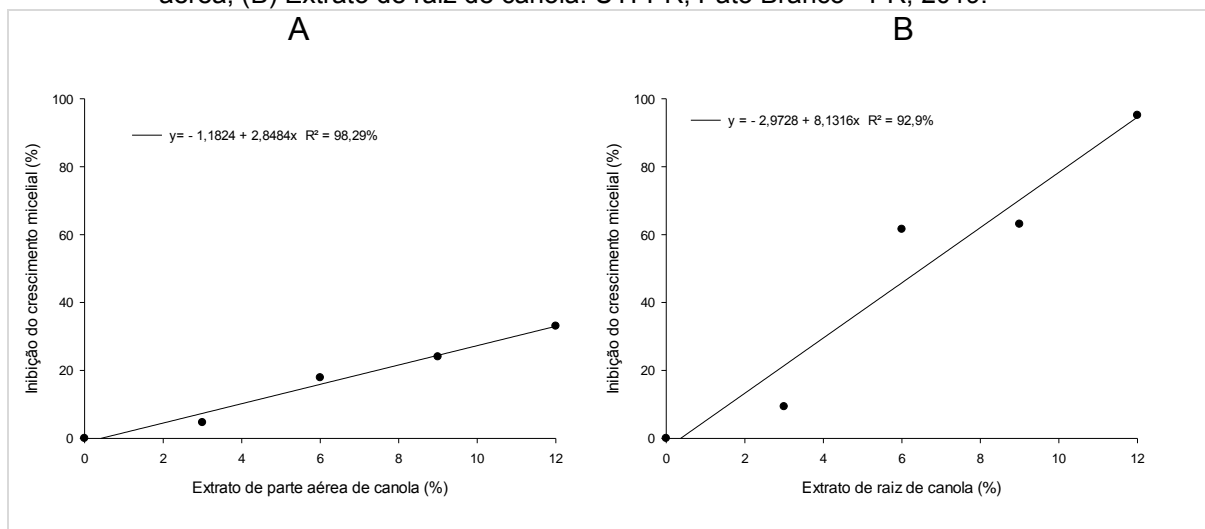
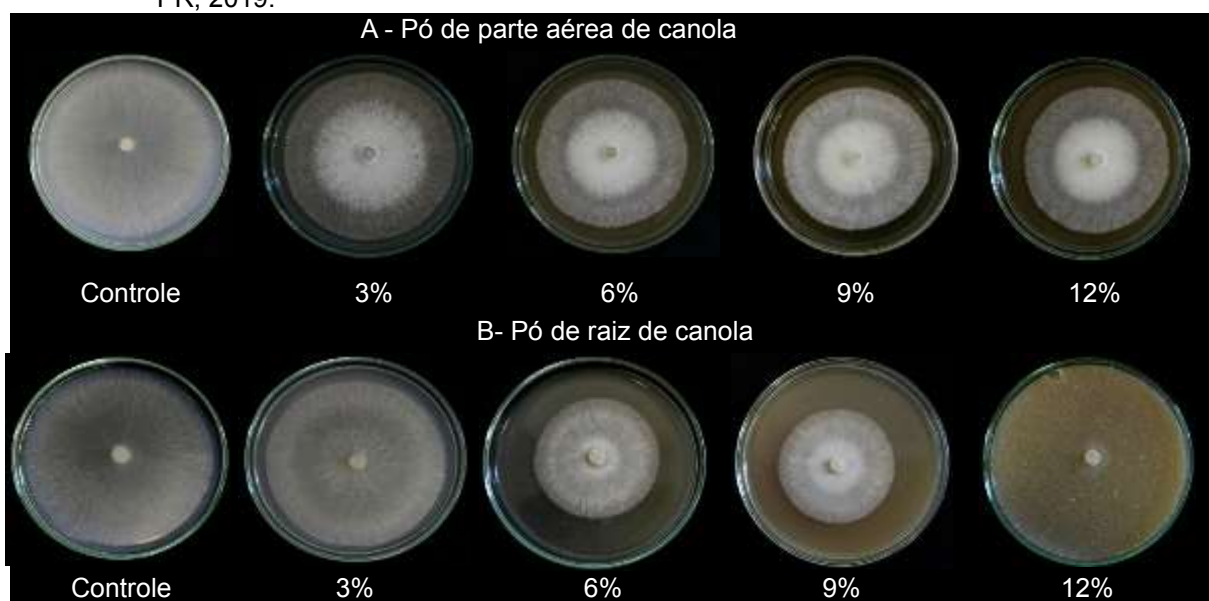
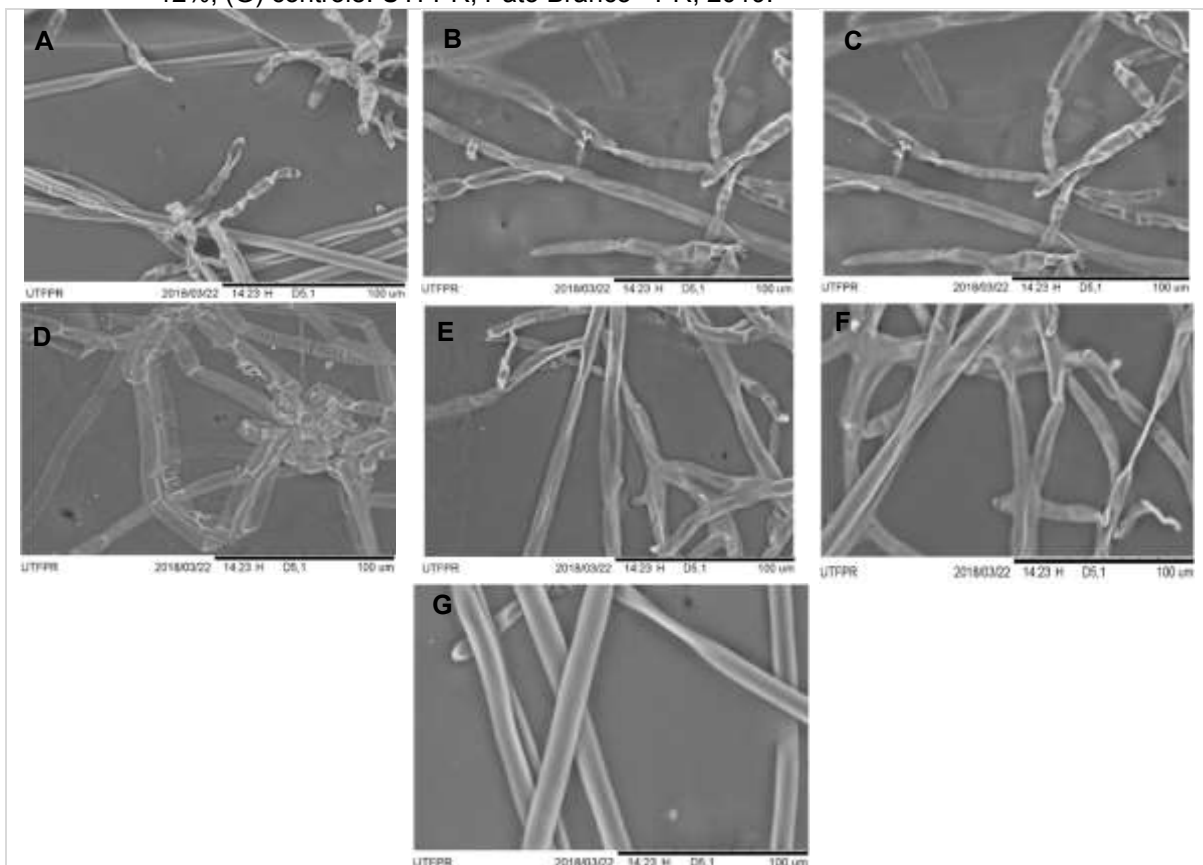


Figura 6 – Efeito de concentrações de compostos de efeito direto liberados pelo extrato de canola sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI, *in vitro*, após três dias de cultivo em meio BSA contendo as diferentes concentrações de extrato, a $\pm 25^\circ\text{C}$ no escuro. (A) Extrato de parte aérea; (B) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.



Nas imagens obtidas no MEV, observou-se que os compostos liberados pelo pó e extrato de parte aérea ou raiz de canola danificaram as hifas de *R. solani* AG4-HGI (Figura 7A, 7B, 7C, 7D, 7E e 7F), em comparação com as hifas do patógeno, no tratamento controle (Figura 7G).

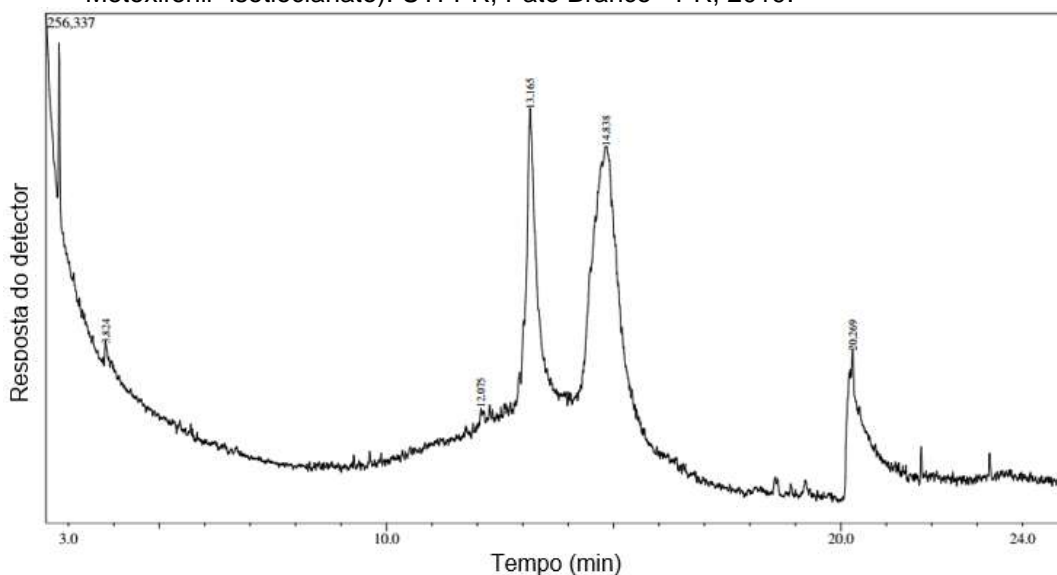
Figura 7 – Hifas de *Rhizoctonia solani* AG4 HGI submetidas a tratamentos com extrato e pó de parte aérea ou raiz canola. (A) compostos voláteis de extrato de parte aérea de canola a 12%; (B) compostos voláteis de extrato de raiz de canola a 12%; (C) compostos voláteis de 1,2 g pó de parte aérea de canola; (D) compostos voláteis de 1,2 g pó de raiz de canola; (E) contato direto com extrato de parte aérea a 12%; (F) contato direto com extrato de raiz a 12%; (G) controle. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.



4.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Através da análise de CG-MS realizada com as amostras de parte aérea de canola, obteve-se um cromatograma com diversos picos, indicando a presença dos compostos benzeno (isotiocianato de metila) e 4-metoxifenil-isotiocianato, detectados nos tempos de retenção 13,16 e 14,83 minutos, respectivamente (Figura 8), quando estes foram comparados a biblioteca NIST® (National Institute Standards and Technology). Os cromatogramas gerados a partir das análises da amostra de raiz de canola por CG-MS e headspace não detectaram nenhum isotiocianato (dados não apresentados).

Figura 8 – Cromatograma obtido com a amostra de parte aérea de canola em análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (coluna ZB-5HT Inferno), temperatura inicial de 40°C por 5 minutos, taxa de crescimento de 10°C/min até 250°C. Injeção em modo splitless com hélio como gás de arraste. O espectrômetro de massas foi operado no modo scan, com faixa m/z 41-400. (t_R 13.16 – isotiocianato de metila; t_R 14.83 – Metoxifenil- isotiocianato). UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

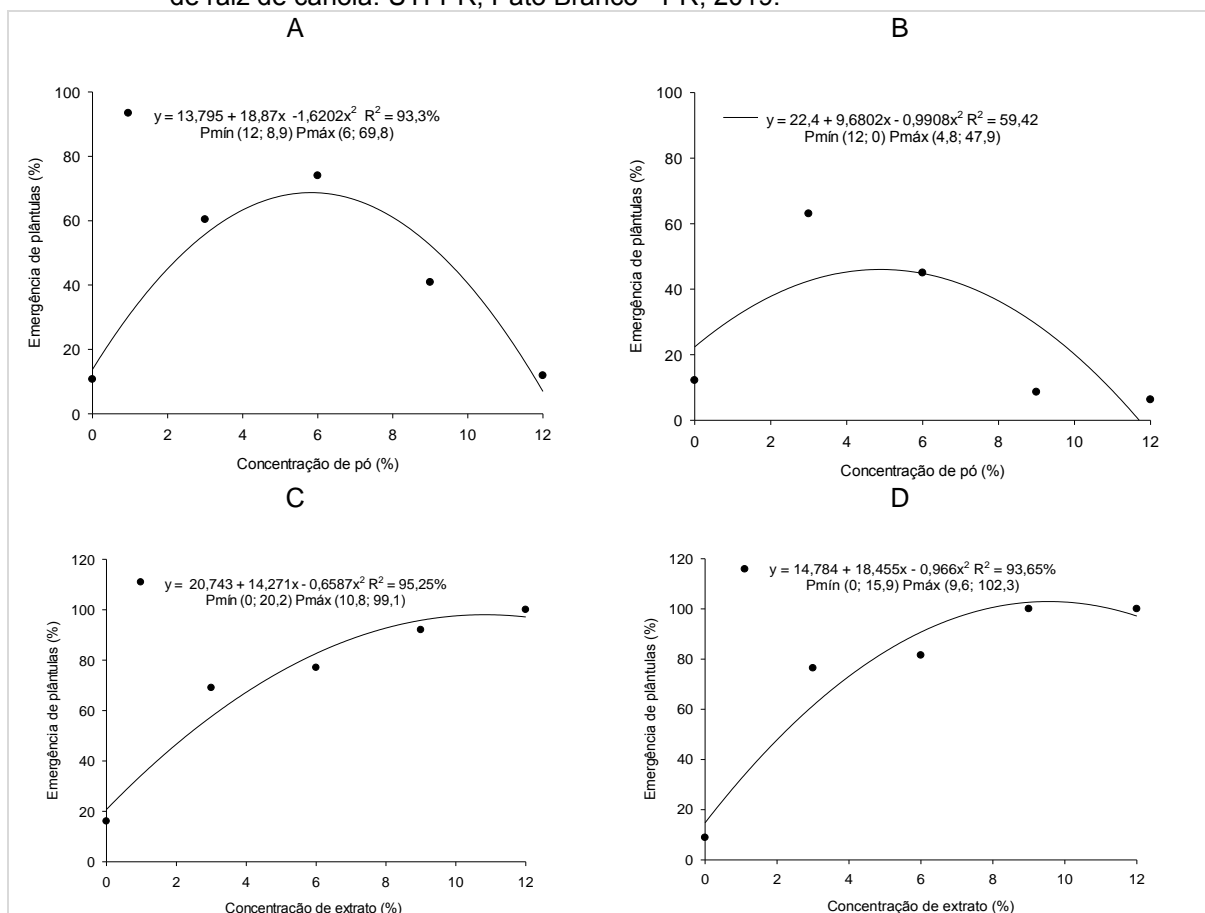


4.4 Experimentos em casa de vegetação

No período em que os experimentos foram realizados em casa de vegetação a temperatura variou entre 15,4 e 37,2°C, e a umidade relativa do ar entre 42 e 88%.

A emergência de plântulas de beterraba não foi afetada pelo fator biofumigação do pó ou extrato de canola. Observou-se efeito significativo apenas para o fator concentrações, no qual, no experimento com pó de parte aérea destacou-se a concentração de 6% com 69,8% de plântulas emergidas (Figura 9A). No experimento com pó de raiz de canola estimou-se que a melhor concentração foi de 5,1% com 49,6% de emergência (Figura 9B). Nos experimentos com os extratos (parte aérea e de raiz de canola), destacaram-se concentrações maiores de 10% e 9%, cuja porcentagem de emergência foi superior a 98% (Figura 9C e 9D).

Figura 9 – Efeito de concentrações de compostos liberados pelo pó e extrato de canola e solo infestado com *Rhizoctonia solani* AG4 HGI sobre a emergência (%) de plântulas de beterraba. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

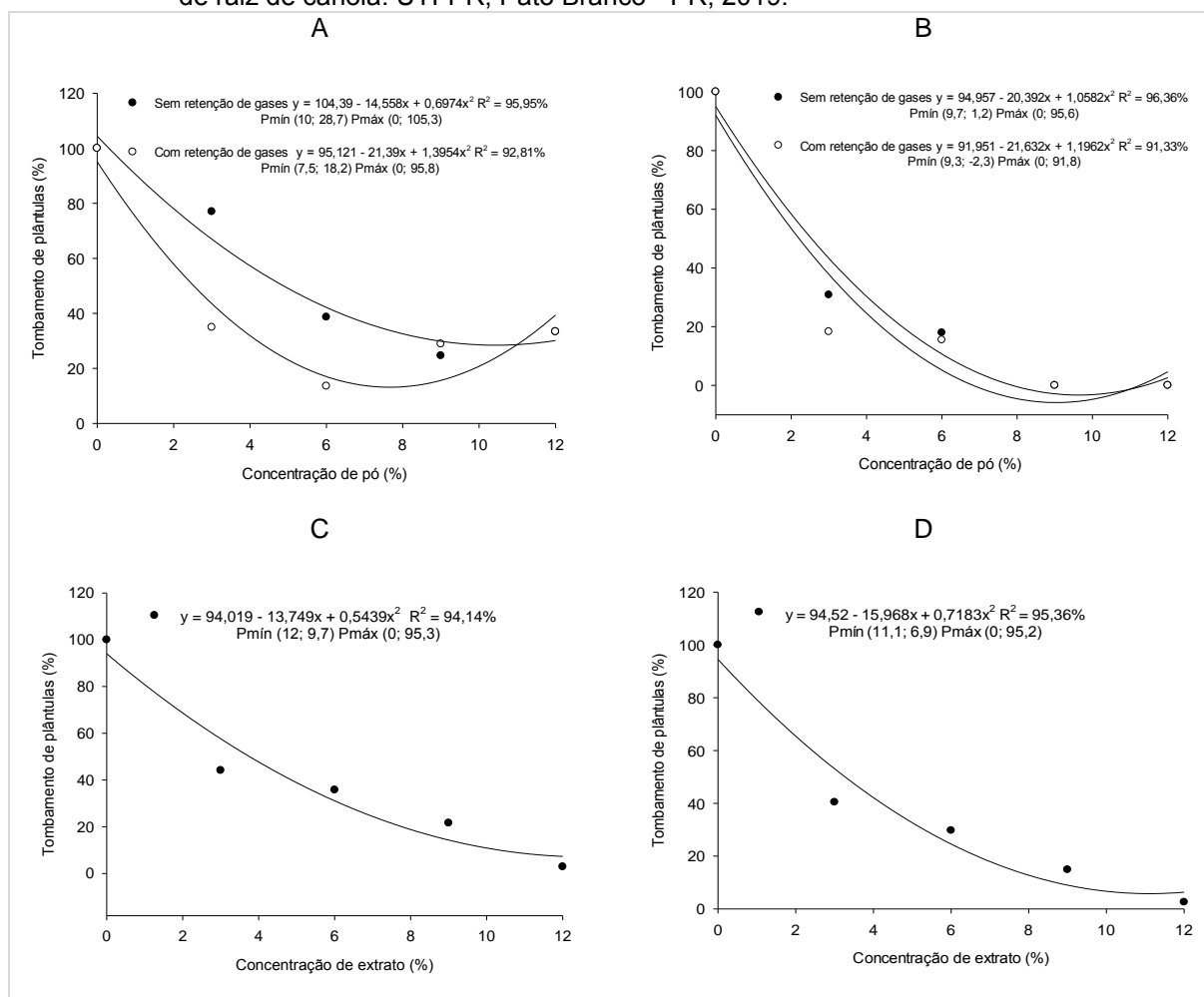


Houve interação entre os fatores concentrações de pó e biofumigação nos experimentos com pó de parte aérea e de raiz de canola em relação ao tombamento de plântulas (Figura 10). No experimento com pó de parte aérea, com biofumigação, o ponto de máximo controle foi estimado na concentração de 7,5% com 81,2% de controle do número de plântulas de beterraba tombadas. Resultados similares também foram obtidos no experimento, sem a biofumigação, cujo controle da doença foi superior a 70%, na concentração a 10% (Figura 10A). Quando utilizou-se o pó de raiz de canola, na concentração de 9%, o controle foi próximo de 100% com ou sem a biofumigação (Figura 10B).

Nos experimentos com extrato de parte aérea ou raiz de canola não houve interação entre os fatores concentrações de extrato e biofumigação, sendo significativo apenas o fator concentrações de extrato (Figuras 10C e 10D). Nesses estudos, o extrato de parte aérea ou raiz de canola testadas foram mais eficientes,

obtendo controle de mais de 90% no número de plântulas de beterraba tombadas.

Figura 10 – Efeito de concentrações de compostos liberados pelo pó e extrato de canola e solo infestado com *Rhizoctonia solani* AG4-HGI sobre o tombamento (%) de plântulas de beterraba. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

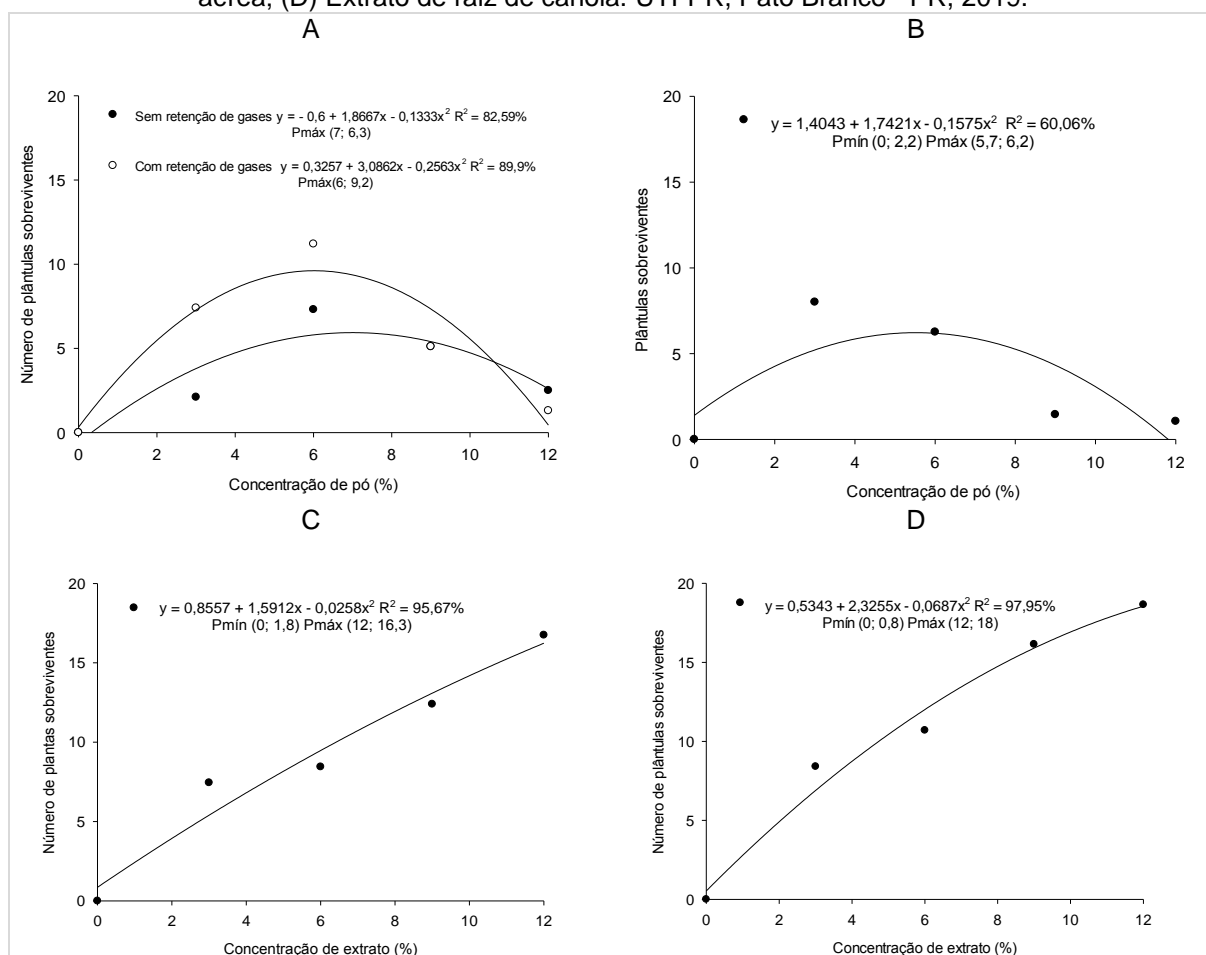


Quando avaliou-se o número de plântulas sobreviventes, houve interação entre os fatores concentrações de pó de canola e biofumigação apenas no experimento com pó de parte aérea de canola (Figura 11A). Neste estudo, o ponto de máxima estimado para essa variável foi na concentração de 6% e 7% com e sem a biofumigação, respectivamente, com médias de 76,6% e 52,5% de plântulas sobreviventes, respectivamente (Figura 11A).

Nos outros estudos realizados com o pó de raiz, extrato de parte aérea e extrato de raiz de canola, não houve interação entre os fatores concentrações de pó ou extrato e a biofumigação, sendo significativo apenas o fator concentrações (Figuras 11B, 11C e 11D). Para o experimento com pó de raiz de canola, o ponto máximo de plântulas de beterraba sobreviventes foi estimado na concentração de 5,7%, com

51,7% de plântulas sobreviventes (Figura 11B). Quando utilizou-se extrato de parte aérea e de raiz de canola na maior concentração (12%), observou-se que sobreviveram 90,5% e 100% das plântulas, respectivamente (Figuras 11C e 11D).

Figura 11 – Efeito de compostos liberados pelo pó e extrato de canola e solo infestado com *Rhizoctonia solani* AG4-HGI sobre o número de plântulas de beterraba sobreviventes ao final do experimento. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.



Para as variáveis comprimento e massa de plântulas observou-se diferença significativa apenas para os experimentos com pó de parte aérea e raiz de canola (Figura 12). No experimento com o pó de parte aérea não houve interação entre os fatores concentrações de pó e biofumigação, sendo significativo apenas o fator concentrações para as duas variáveis. Neste estudo, para as variáveis comprimento e massa de plântulas, o ponto de máxima foi estimado nas concentrações de 6,7% e 7% de pó, respectivamente, onde as plântulas alcançaram em média 9,1 cm e 48,6 mg (Figura 12A e 12B).

No experimento com pó de raiz de canola, para a variável comprimento médio de plântulas, não houve interação entre os fatores concentrações de pó e

biofumigação, sendo significativo apenas o fator concentrações. A concentração de pó 6,3% foi a que proporcionou o maior desenvolvimento das plântulas de beterraba (Figura 12C). No entanto, para a variável massa de plântulas houve interação entre os fatores avaliados. Quando não foi utilizada a biofumigação com o pó de raiz de canola, o ponto de máxima foi estimado na concentração de 6,5% atingindo 32,2 mg. E quando aplicou-se a biofumigação, o ponto de máxima foi estimado em 6,4%, com plântulas de 34,6 mg (Figura 12D).

Quando avaliou-se a quantidade de inóculo de *R. solani* AG4-HGI no solo, observou-se que aos sete dias após a incorporação do inóculo do patógeno ao solo não houve diferença estatística (dados não apresentados). Na amostragem realizada ao final do experimento (21 dias após a semeadura), não houve interação entre os fatores concentrações de pó ou extrato de canola e a biofumigação, sendo significativo apenas o fator concentrações (Figura 13). Em todos os experimentos, a redução do inóculo foi maior nas maiores concentrações de pó ou extrato, onde a quantificação de UFC aproximou-se de zero, enquanto que nas concentrações 0% foram quantificados em média $271,3 \text{ UFC g}^{-1} \cdot 10^2$ (Figuras 13A, 13B, 13C e 13D).

Figura 12 – Efeito de compostos liberados pelo pó de canola e solo infestado com *Rhizoctonia solani* AG4-HGI sobre o comprimento (cm) e massa (mg) de plântulas de beterraba sobreviventes ao final do experimento. (A) Comprimento de plântulas - pó de parte aérea; (B) Massa de plântulas - pó de parte aérea; (C) Comprimento de plântulas - pó de raiz; (D) Massa de plântulas - pó de raiz. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

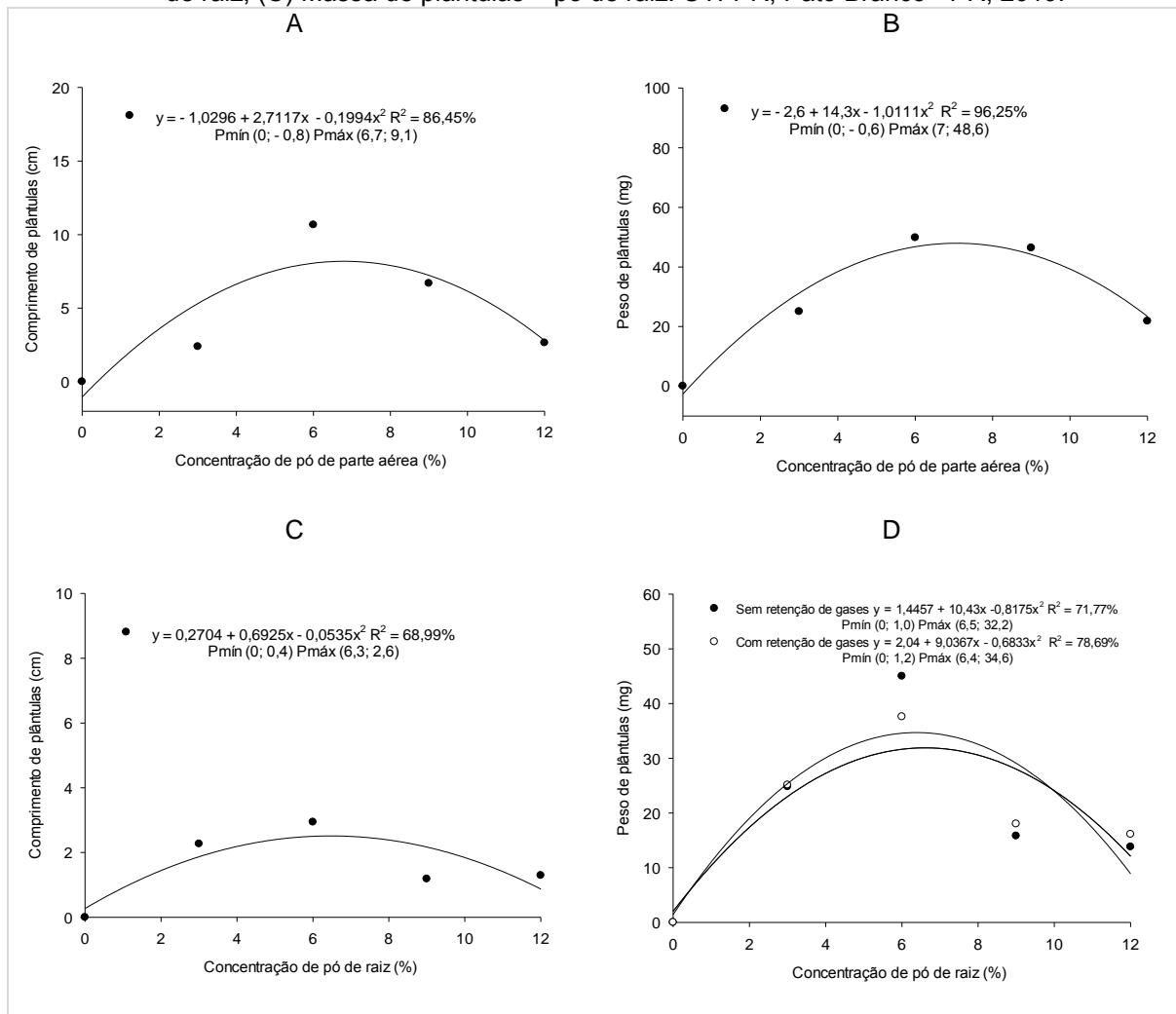
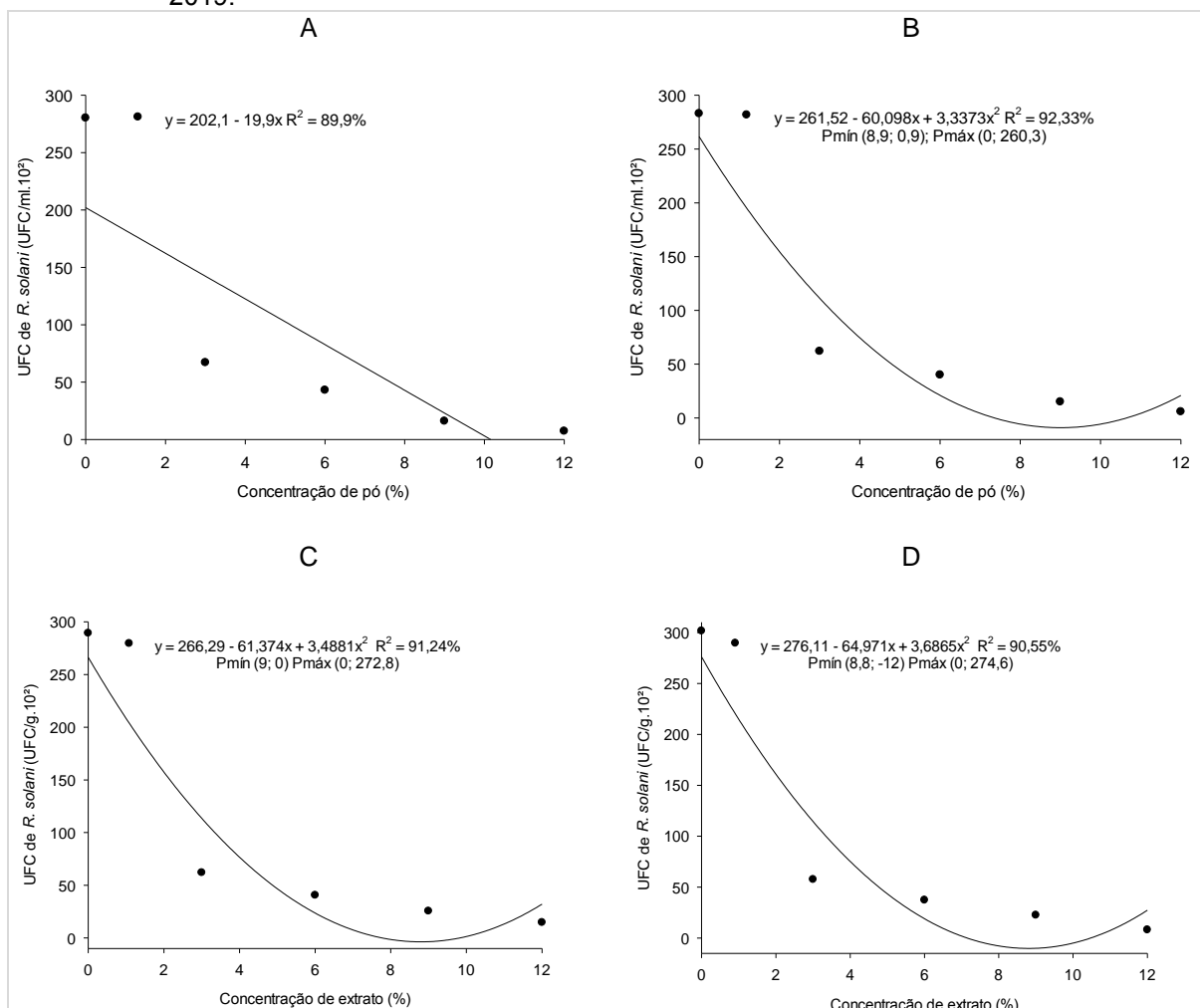


Figura 13 – Efeito de compostos liberados pelo pó e extrato de canola sobre o inóculo de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI no solo ao final do experimento. (A) Pó de parte aérea; (B) Pó de raiz; (C) Extrato de parte aérea; (D) Extrato de raiz de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.



4.5 Canola associada ao agente de controle biológico *Trichoderma harzianum* e a biofumigação no manejo do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani* AG4 – HGI

4.5.1 Experimentos *in vitro*

Efeito de pó ou extrato de canola e de compostos voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI.

Quando associou-se o agente de controle biológico às melhores concentrações determinadas no estudo anterior, observou-se que no experimento com pó ou extrato de parte aérea de canola (Figura 14), destacaram-se os tratamentos

extrato e pó de canola associados ou não a *T. harzianum*, cujo crescimento micelial de *R. solani* AG4-HGI foi inibido em média em 49,82%, no primeiro experimento (Tabela 2). No segundo experimento destacaram-se apenas os tratamentos extrato + *T. harzianum* e pó utilizado isoladamente (Tabela 2).

No estudo com pó ou extrato de raiz de canola (Figura 15), no primeiro experimento, os melhores tratamentos foram o pó e extrato de canola associados a *T. harzianum* e apenas o extrato de canola, com inibição média de 89,95% e, no segundo experimento, destacaram-se o pó associado a *T. harzianum*, e o extrato e o pó utilizados isoladamente, ambos com mais de 80% de inibição do crescimento micelial (Tabela 2).

Figura 14 – Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI causada por compostos de ação direta do extrato de parte aérea e voláteis liberados pelos extratos ou pó de parte aérea de canola associados aos compostos voláteis liberados pelo fungo *Trichoderma harzianum*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

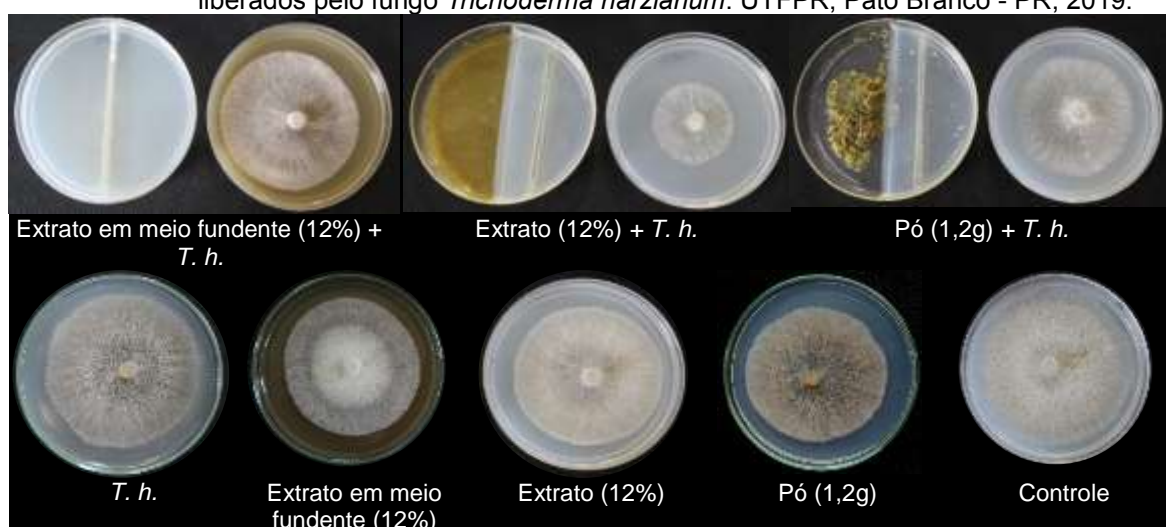
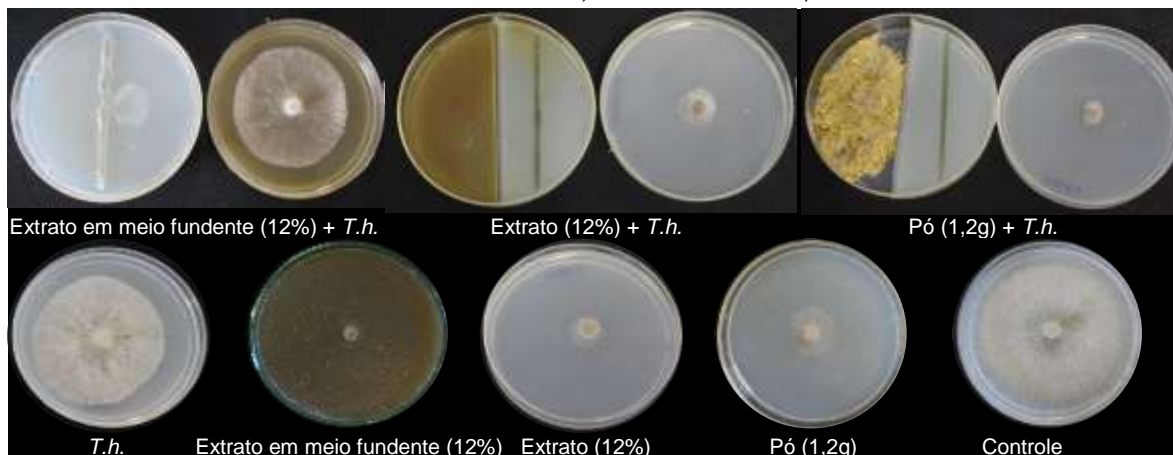


Tabela 2 – Inibição do crescimento micelial (%) de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI submetidos a ação de compostos de ação direta do extrato de parte aérea ou raiz de canola e voláteis liberados pelo extrato, pó de parte aérea ou de raiz de canola e *Trichoderma harzianum*, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamento	Parte aérea		Raiz	
	Experimento I ¹	Experimento II ¹	Experimento I ¹	Experimento II ¹
Controle	0,00 c	0,00 c	0,00 e	0,00 d
Extrato (meio fundente) + <i>T.h.</i>	36,88 b	31,19 b	83,24 c	85,84 b
Extrato + <i>T.h.</i>	53,37 a	66,86 a	89,38 a	87,09 b
Pó + <i>T.h.</i>	45,05 a	42,74 b	89,97 a	88,42 a
<i>T.h.</i>	35,48 b	38,03 b	67,18 d	60,94 c
Extrato (meio fundente)	35,53 b	39,97 b	86,83 b	86,32 b
Extrato	52,68 a	48,02 b	90,52 a	89,36 a
Pó	48,19 a	61,69 a	86,56 b	88,58 a
Coeficiente de variação (%)	25,83	24,75	2,91	2,53

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ¹Dados transformados para arcoseno raiz quadrada.

Figura 15 – Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI causada por compostos de ação direta do extrato de raiz e voláteis liberados pelo extrato ou pó de raiz de canola associados aos compostos voláteis liberados pelo fungo *Trichoderma harzianum*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.



Efeito de pó ou extrato de canola e o efeito direto de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI.

Neste estudo, destacaram-se os tratamentos com extrato e pó de parte aérea de canola associados a *T. harzianum* e apenas o extrato, nos dois experimentos (Tabela 3 e Figura 16). No experimento com pó ou extrato de raiz de canola (Tabela 3), destacaram-se os tratamentos com extrato e pó + *T. harzianum* e o extrato utilizado isoladamente, com mais de 70% de inibição, no primeiro experimento (Figura 17). No segundo experimento, destacaram-se os mesmos tratamentos e o extrato em meio fundente, com resultados similares (Tabela 3).

Tabela 3 – Inibição do crescimento micelial (%) de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI submetido ao efeito direto do extrato de parte aérea ou de raiz de canola (12%) e do fungo *Trichoderma harzianum*, e de compostos voláteis liberados pelo pó e extrato de parte aérea. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamento	Parte aérea ¹				Raiz ¹	
	Experimento I		Experimento II		Experimento I	Experimento II
Controle	0,00	c	0,00	c	0,00	d
Extrato (meio fundente) + <i>T.h.</i>	31,38	b	20,59	b	68,85	b
Extrato + <i>T.h.</i>	47,05	a	36,41	a	77,05	a
Pó + <i>T.h.</i>	42,63	a	33,42	a	76,34	a
<i>T.h.</i>	32,59	b	25,95	b	38,72	c
Extrato (meio fundente)	32,84	b	26,43	b	62,76	b
Extrato	47,99	a	35,69	a	80,64	a
Pó	33,04	b	24,98	b	66,53	b
Coeficiente de variação (%)	26,35		24,67		13,82	15,2

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ¹Dados transformados por arcoseno raiz quadrada.

Figura 16 – Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI causada por compostos voláteis liberados por extratos e pó de parte aérea de canola associados ao fungo *Trichoderma harzianum* em contato direto. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

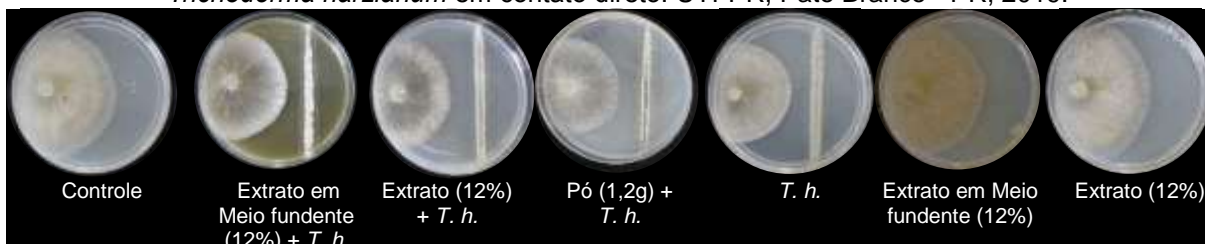


Figura 17 – Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI causada por compostos voláteis liberados por extratos e pó de raiz de canola associados ao fungo *Trichoderma harzianum* em contato direto. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.



4.5.2 Experimentos em casa de vegetação e em campo

Experimentos com pó ou extrato de parte aérea de canola, em casa de vegetação Emergência e Tombamento.

Nos dois experimentos realizados não houve interação significativa entre os fatores tratamentos e biofumigação para as variáveis emergência e tombamento de plântulas, sendo significativo apenas o fator tratamentos (Tabela 4). Para a emergência de plântulas de beterraba, no primeiro experimento, destacou-se o tratamento extrato de parte aérea de canola, onde a emergência igualou-se ao controle (solo não infestado com o patógeno). No entanto, no segundo experimento destacaram-se os tratamentos com pó e extrato utilizados isoladamente e o extrato associado a *T. harzianum*, com média de emergência superior a 60%.

Quanto ao tombamento de plântulas no primeiro experimento, destacaram-se os tratamentos com pó e extrato de canola, o extrato + *T. harzianum* e o *T. harzianum*, com controle médio da doença acima de 60%. No segundo experimento destacaram-se os tratamentos extrato + *T. harzianum* e o *T. harzianum*, atingindo 90% de controle do tombamento de plântulas de beterraba (Tabela 4).

Tabela 4 – Emergência (%) e tombamento de plântulas (%) de beterraba de experimentos com sete tratamentos associando pó e extrato de parte aérea de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* no controle do tombamento de plântulas, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	Experimento I		Experimento II	
	Emergência (%)	Tombamento (%) ¹	Emergência (%)	Tombamento (%) ¹
Controle com patógeno	11,43 d*	100 a	16,01 d	100 a
Controle sem patógeno	98,00 a	0,00 d	92,29 a	0,00 d
Pó de parte aérea	55,44 c	23,52 c	69,16 b	32,17 b
Extrato de parte aérea	83,45 a	28,25 c	70,30 b	30,82 b
Pó de parte aérea + <i>T.h.</i>	43,44 c	49,86 b	41,15 c	30,00 b
Extrato de parte aérea + <i>T.h.</i>	64,01 b	37,17 c	65,16 b	7,65 c
<i>T.h.</i>	48,01 c	35,41 c	43,44 c	10,71 c
Coeficiente de variação (%)	32,87	47,33	32,09	44,35

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ¹Dados transformados por arco seno raiz quadrada.

Massa e comprimento de plântulas.

As variáveis massa e comprimento de plântulas não foram significativas ($\alpha=5\%$), no entanto, apresentaram em média plântulas de 10,97 cm e 48,89 mg.

Quantificação do inóculo de *R. solani* AG4-HGI.

A densidade de inóculo de *R. solani* AG4-HGI no solo foi similar em todos os tratamentos na primeira avaliação, com média de 161 UFC g⁻¹.10² (dados não apresentados). No entanto, para a amostragem realizada no final dos experimentos houve interação significativa entre os fatores (Tabela 5). Nos dois experimentos destacaram-se os tratamentos extrato e extrato + *T. harzianum*, sendo que ambos tratamentos potencializaram a redução do inóculo do patógeno quando houve a biofumigação (Tabela 5).

Tabela 5 – Unidades formadoras de colônias (UFC g⁻¹ .10²) de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI ao final de experimentos bifatorial composto por sete tratamentos associando pó (6%) e extrato (12%) de parte aérea de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	UFC de <i>Rhizoctonia solani</i> g ⁻¹ .10 ²			
	Experimento I		Experimento II	
	Sem biofumigação	Com biofumigação	Sem biofumigação	Com biofumigação
Controle	172,34 a	161,67 a	224,43 a	195,00 a
Pó de parte aérea	103,96 c	99,50 b	118,15 b	100,00 b
Extrato de parte aérea	73,28 d	54,17 c	62,78 d	48,33 d
Pó de parte aérea + <i>T.h.</i>	111,00 c	96,83 b	73,51 c	62,66 c
Extrato de parte aérea + <i>T.h.</i>	68,21 d	44,17 c	65,03 d	37,50 d
<i>T.h.</i>	123,45 b	105,83 b	83,94 c	79,16 c
Coeficiente de variação (%)	12,76	16,81	15,42	26,54

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-

Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Atividade microbiana do solo.

Houve interação entre os fatores para a atividade microbiana do solo nos dois experimentos, onde com e sem biofumigação destacaram-se os tratamentos extrato + *T. harzianum* e apenas o *T. harzianum* (Tabela 6).

Tabela 6 – Atividade microbiana (mg CO₂.100 g⁻¹ solo⁻²) em experimentos conduzidos em bifatorial compostos por sete tratamentos associando pó ou extrato de parte aérea de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	mg CO ₂ .100 g ⁻¹ solo ⁻²			
	Experimento I		Experimento II	
	Sem biofumigação	Com biofumigação	Sem biofumigação	Com biofumigação
Controle com patógeno	5,43 c [*]	5,21 c	4,88 c	5,21 c
Controle sem patógeno	4,89 c	4,33 d	4,62 c	4,97 b
Pó de parte aérea	5,02 c	2,12 e	4,03 c	3,76 d
Extrato de parte aérea	5,82 c	5,38 c	5,97 b	5,66 b
Pó de parte aérea + <i>T.h</i>	6,73 b	6,95 b	6,23 b	5,90 b
Extrato de parte aérea + <i>T.h</i>	8,56 a	8,96 a	7,98 a	8,25 a
<i>T.h</i>	8,67 a	9,04 a	8,45 a	8,96 a
Coeficiente de variação (%)	18,45		16,43	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Experimentos com pó ou extrato de raiz de canola, em casa de vegetação.

Emergência e tombamento de plântulas.

A emergência e o tombamento de plântulas apresentaram interação entre os fatores nos dois experimentos (Tabelas 7 e 8). Para a variável emergência de plântulas, no primeiro experimento, destacaram-se os tratamentos extrato, extrato + *T. harzianum* e apenas o *T. harzianum*, com emergência acima de 50% sem a biofumigação e acima de 78% com a biofumigação (Tabela 7). No segundo experimento, sem a biofumigação destacaram-se os mesmos tratamentos. Nos tratamentos que houve a biofumigação, a emergência de plântulas foi maior, destacando-se o tratamento extrato + *T. harzianum*, cuja emergência aumentou 90% em relação ao mesmo tratamento sem a biofumigação (Tabela 8).

Para a variável tombamento de plântulas, sem a biofumigação destacou-se o tratamento extrato, com 60% e 48% de controle da doença, no primeiro e segundo experimento respectivamente, e com a biofumigação destacou-se o extrato + *T. harzianum* com mais de 80% de controle do tombamento de plântulas, nos dois experimentos (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 – Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de beterraba de um experimento com sete tratamentos associando pó ou extrato de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum*, no primeiro experimento. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	Emergência (%)		Tombamento (%) ¹	
	Sem biofumigação	Com biofumigação	Sem biofumigação ¹	Com biofumigação ¹
Controle com patógeno	13,72 d	9,14 d	100,00 a	100,00 a
Controle sem patógeno	96,39 a	88,20 a	0,00 e	0,00 e
Pó de raiz	27,43 c	26,29 c	68,05 b	90,28 a
Extrato de raiz	62,87 b	83,45 a	39,47 d	23,47 c
Pó de raiz + <i>T.h</i>	34,58 c	32,29 c	75,66 b	62,38 b
Extrato de raiz + <i>T.h</i>	56,01 b	80,01 a	59,14 c	12,29 d
<i>T.h</i>	59,15 b	78,01 a	52,88 c	24,88 c
Coeficiente de variação (%)	36,57		41,75	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ¹Dados transformados por arcoseno raiz quadrada.

Tabela 8 – Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de beterraba de um experimento com sete tratamentos associando pó ou extrato de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum*, no segundo experimento. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	Emergência (%)		Tombamento (%) ¹	
	Sem biofumigação	Com biofumigação	Sem biofumigação	Com biofumigação
Controle com patógeno	21,72 d	10,29 e	100,00 a	100,00 a
Controle sem patógeno	96,39 a	88,20 a	0,00 e	0,00 d
Pó de raiz	34,58 c	34,29 d	77,08 b	31,94 b
Extrato de raiz	46,29 b	68,59 b	51,06 d	33,03 b
Pó de raiz + <i>T.h</i>	30,86 c	31,44 d	93,33 a	30,00 b
Extrato de raiz + <i>T.h</i>	44,96 b	85,73 a	63,05 c	6,32 c
<i>T.h</i>	43,44 b	53,44 c	62,37 c	9,63 c
Coeficiente de variação (%)	34,16		37,71	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ¹Dados transformados por arcoseno raiz quadrada.

Comprimento e massa de plântulas.

Em relação a comprimento e massa de plântulas, nos dois experimentos, a biofumigação não causou efeito aditivo aos tratamentos, sendo significativo apenas o fator tratamentos. Destacou-se neste estudo apenas o tratamento *T. harzianum*, para as duas variáveis, nos dois experimentos (Tabela 9).

Tabela 9 – Comprimento e massa de plântulas de beterraba de um experimento com seis tratamentos associando pó e extrato de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum*, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	Experimento I		Experimento II	
	Comprimento (cm) ¹	Massa (mg) ¹	Comprimento (cm) ¹	Massa (mg) ¹
Controle com patógeno	0,00 e	0,00 b	0,00 e	0,00 b
Controle sem patógeno	12,43 a	0,34 a	12,20 a	0,48 a
Pó de raiz	1,24 d	0,02 b	0,98 e	0,03 b
Extrato de raiz	5,21 c	0,11 b	2,43 d	0,07 b
Pó de raiz + <i>T.h</i>	2,37 d	0,03 b	1,98 d	0,02 b
Extrato de raiz + <i>T.h</i>	5,91 c	0,08 b	4,96 c	0,09 b
<i>T.h</i>	11,15 b	0,29 a	10,23 b	0,41 a
Coeficiente de variação (%)	14,76	16,43	18,12	15,01

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ¹Dados transformados por $x = \log(x)$.

A densidade do inóculo de *R. solani* AG4-HGI no solo não apresentou diferença estatística entre os fatores e entre os tratamentos na primeira avaliação, com média de 232 UFC g⁻¹.10² (dados não apresentados). Na amostragem realizada ao final do experimento houve interação entre os fatores tratamentos e biofumigação (Tabela 10). Nos dois experimentos, com e sem a biofumigação destacou-se o tratamento com extrato associado a *T. harzianum*.

Tabela 10 – Unidades formadoras de colônias (UFC g⁻¹.10²) de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI ao final de um experimento bifatorial, composto por sete tratamentos associando pó (6%) ou extrato (12%) de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	UFC de <i>Rhizoctonia solani</i> g ⁻¹ .10 ²			
	Experimento I		Experimento II	
	Sem biofumigação	Com biofumigação	Sem biofumigação	Com biofumigação
Controle	188,33 a	180,00 a	298,09 a	286,67 a
Pó de raiz	151,02 b	106,27 b	75,00 c	70,00 b
Extrato de raiz	150,00 b	115,00 b	41,67 e	30,00 d
Pó de raiz + <i>T.h</i>	138,39 c	112,00 b	128,21 b	71,82 b
Extrato de raiz + <i>T.h</i>	88,31 d	61,66 c	35,07 f	19,13 e
<i>T.h</i>	155,00 b	103,53 b	50,00 d	45,00 c
Coeficiente de variação (%)	18,03	21,45	13,89	18,47

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Quando avaliou-se a atividade microbiana do solo também houve interação entre os fatores tratamentos e biofumigação, nos dois experimentos, destacando-se os tratamentos extrato + *T. harzianum* e apenas o *T. harzianum* (Tabela 11).

Tabela 11 – Atividade microbiana ($\text{mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ solo}^{-2}$) em experimentos conduzidos em bifatorial com sete tratamentos associando pó ou extrato de raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	mg $\text{CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ solo}^{-2}$								
	Experimento I				Experimento II				
	Sem biofumigação		Com biofumigação		Sem biofumigação		Com biofumigação		
Controle com patógeno	6,96	b	6,11	b	4,89	a	5,05	b	
Controle sem patógeno	5,78	b	6,13	b	3,61	b	2,96	c	
Pó de raiz	1,25	c	0,32	e	1,03	c	1,23	d	
Extrato de raiz	5,99	b	4,18	c	3,72	b	5,24	b	
Pó de raiz + <i>T.h</i>	2,03	c	2,51	d	1,46	c	1,93	d	
Extrato de raiz + <i>T.h</i>	9,51	a	8,27	a	4,53	a	6,85	a	
<i>T.h</i>	9,73	a	8,42	a	4,79	a	7,12	a	
Coeficiente de variação (%)		14,83				15,06			

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Experimentos em campo

Houve interação significativa entre o fator tratamentos e biofumigação em todas as variáveis analisadas nos experimentos realizados em campo. Para emergência de plântulas, no primeiro experimento, sem a biofumigação, destacaram-se apenas os tratamentos pó de parte aérea, pó de raiz e ambos associados ao fungo *T. harzianum*, por apresentarem média de 78,88% de emergência de plântulas. Quando as sementes foram semeadas em solo com biofumigação, destacaram-se os tratamentos pó de parte aérea e pó de raiz associados ao *T. harzianum*, cuja emergência de plântulas foi superior a 90%, igualando-se ao tratamento controle sem patógeno (Tabela 12). No segundo experimento, sem a biofumigação, a emergência de plântulas foi maior nos tratamentos pó de raiz e pó de raiz + *T. harzianum*, os quais se igualaram ao tratamento controle sem patógeno, com média de emergência de plântulas acima de 98%. Quando houve a biofumigação no solo, destacaram-se os tratamentos pó de parte aérea, pó de raiz, e ambos associados a *T. harzianum*, os quais, igualaram-se ao tratamento controle sem patógeno, com emergência média acima de 96% (Tabela 13).

Tabela 12 – Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de beterraba de um experimento com 11 tratamentos associando pó e extrato de parte aérea e raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem biofumigação, no primeiro experimento. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	Emergência (%)		Tombamento (%)	
	Sem biofumigação	Com biofumigação	Sem biofumigação	Com biofumigação
Controle com patógeno	38,97 d	39,09 e	100,00 a	100,00 a
Controle sem patógeno	98,02 a	98,67 a	0,00 d	0,00 e
Pó de parte aérea	75,41 b	83,41 b	42,41 c	38,07 c
Pó de raiz	80,04 b	89,63 b	37,96 c	24,75 d
Pó de parte aérea + <i>T.h</i>	78,32 b	91,04 a	35,05 c	25,53 d
Pó de raiz + <i>T.h</i>	81,77 b	95,78 a	28,07 c	16,31 d
Extrato de parte aérea	41,23 d	40,59 e	87,08 b	74,62 b
Extrato de raiz	54,05 c	55,36 d	88,39 b	76,66 b
Extrato de parte aérea + <i>T.h</i>	45,97 d	62,48 c	75,43 b	64,37 b
Extrato de raiz + <i>T.h</i>	56,52 c	64,02 c	79,86 b	72,85 b
Apenas o <i>T.h</i>	44,63 d	50,96 d	78,33 b	73,69 b
Coeficiente de variação (%)	24,82		19,47	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados transformados por $x = \log(x)$.

Para a variável tombamento de plântulas, no primeiro experimento, sem biofumigação, os tratamentos pó de parte aérea, pó de raiz e ambos em associação a *T. harzianum* controlaram em média 64% da doença. Quando houve a biofumigação, destacaram-se os tratamentos pó de raiz, pó de parte aérea + *T. harzianum* e pó de raiz + *T. harzianum*, com uma média de 77,8% de controle do tombamento de plântulas (Tabela 12). No segundo experimento, com e sem a biofumigação, o tombamento de plântulas foi menor nos tratamentos pó de parte aérea e de raiz de canola associados a *T. harzianum*, onde a biofumigação aumentou o controle em 13%, em relação aos mesmos tratamentos sem a biofumigação (Tabela 13).

Tabela 13 – Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de beterraba de um experimento com 11 tratamentos associando pó e extrato de parte aérea e raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem biofumigação, no segundo experimento. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	Emergência (%)		Tombamento (%)	
	Sem biofumigação	Com biofumigação	Sem biofumigação	Com biofumigação
Controle com patógeno	23,45 e	21,23 d	100,00 a	100,00 a
Controle sem patógeno	99,01 a	100,00 a	0,00 e	0,00 f
Pó de parte aérea	83,67 b	91,56 a	56,24 c	40,89 d
Pó de raiz	96,89 a	98,33 a	47,83 c	33,67 d
Pó de parte aérea + <i>T.h</i>	89,46 b	92,78 a	28,62 d	17,34 e
Pó de raiz + <i>T.h</i>	98,93 a	99,97 a	24,85 d	12,03 e
Extrato de parte aérea	21,32 e	25,89 d	100,00 a	100,00 a
Extrato de raiz	23,48 e	39,71 c	100,00 a	100,00 a
Extrato de parte aérea + <i>T.h</i>	51,75 c	59,66 b	86,89 b	82,65 b
Extrato de raiz + <i>T.h</i>	54,12 c	62,96 b	78,99 b	71,04 c
Apenas o <i>T.h</i>	42,18 d	43,87 c	39,68 c	31,33 d
Coeficiente de variação (%)	17,33		19,96	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-

Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados transformados por $x = \log(x)$.

No primeiro experimento, a densidade de inóculo de *R. solani* AG4-HGI em solo sem biofumigação foi reduzido em maior quantidade pelos tratamentos pó de raiz, pó de parte aérea + *T. harzianum* e pó de raiz + *T. harzianum*. Quando houve a biofumigação no solo, destacou-se o tratamento com pó de raiz (Tabela 14). No segundo experimento, em solo com e sem a biofumigação, os melhores tratamentos foram o pó de raiz e o pó de raiz + *T. harzianum* (Tabela 14).

Tabela 14 – Unidades formadoras de colônias (UFC g⁻¹.10²) de *Rhizoctonia solani* AG4-HGI ao final de experimentos com 11 tratamentos associando pó (6%) ou extrato (12%) de parte aérea e raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	UFC de <i>Rhizoctonia solani</i> g ⁻¹ .10 ²							
	Experimento I				Experimento II			
	Sem biofumigação		Com biofumigação		Sem biofumigação		Com biofumigação	
Controle com patógeno	179,87	a	185,34	a	246,77	a	231,86	a
Controle sem patógeno	00,00	e	00,00	h	00,00	f	00,00	e
Pó de parte aérea	88,35	c	72,12	d	76,89	d	65,88	c
Pó de raiz	65,74	d	31,53	g	48,31	e	33,76	d
Pó de parte aérea + <i>T.h</i>	66,43	d	61,89	e	68,98	d	56,42	c
Pó de raiz + <i>T.h</i>	57,78	d	45,74	f	43,25	e	28,07	d
Extrato de parte aérea	175,66	a	173,69	b	224,64	b	230,05	a
Extrato de raiz	168,99	a	171,45	b	232,96	b	225,61	a
Extrato de parte aérea + <i>T.h</i>	123,74	b	121,53	c	189,53	c	182,18	b
Extrato de raiz + <i>T.h</i>	128,45	b	126,36	c	184,99	c	182,85	b
Apenas o <i>T.h</i>	126,44	b	125,78	c	185,32	c	181,45	b
Coeficiente de variação (%)	24,38				22,59			

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Nos dois experimentos, a atividade microbiana do solo sem a biofumigação, destacou-se o tratamento com apenas o fungo *T. harzianum*, com média de 13,87 mg CO₂.100⁻¹ solo⁻². Quando houve biofumigação no solo destacaram-se os tratamentos extrato de parte aérea e de raiz associados ao *T. harzianum* e apenas o *T. harzianum*, com média de 11,39 mg mg CO₂.100 g⁻¹ solo⁻² (Tabela 15).

Tabela 15 – Atividade microbiana ($\text{mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ solo}^{-2}$) em um experimento bifatorial composto por 11 tratamentos associando pó ou extrato de parte aérea e raiz de canola ao fungo *Trichoderma harzianum* com e sem a biofumigação, em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2019.

Tratamentos	$\text{mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ solo}^{-2}$			
	Experimento I		Experimento II	
	Sem biofumigação	Com biofumigação	Sem biofumigação	Com biofumigação
Controle com patógeno	11,68 b	8,33 b	10,03 c	9,34 b
Controle sem patógeno	9,93 c	7,82 b	8,15 d	7,53 c
Pó de parte aérea	3,24 f	1,03 e	4,45 f	3,69 e
Pó de raiz	1,79 g	0,67 f	2,68 g	1,27 f
Pó de parte aérea + <i>T.h</i>	5,46 e	4,37 c	6,32 e	5,14 d
Pó de raiz + <i>T.h</i>	4,73 e	3,21 d	4,31 f	3,83 e
Extrato de parte aérea	8,79 d	8,32 b	7,29 d	6,22 c
Extrato de raiz	9,21 c	8,65 b	7,53 d	6,13 c
Extrato de parte aérea + <i>T.h</i>	11,75 b	10,39 a	12,64 b	11,88 a
Extrato de raiz + <i>T.h</i>	10,92 b	10,87 a	12,43 b	11,97 a
Apenas o <i>T.h</i>	13,69 a	10,76 a	14,05 a	12,47 a
Coeficiente de variação (%)	18,23%		21,42%	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

5 DISCUSSÃO

O sequenciamento genético e o teste de grupo de anastomose entre os isolados de *R. solani* confirmaram que o fungo em estudo pertence ao grupo AG4-HG1. Este grupo de anastomose é conhecido por representar desafio para os produtores, pois as doenças causadas por esse patógeno não são adequadamente manejadas com fungicidas (DAVID et al., 2018) e por meio da utilização de rotação de culturas (CERESINI; FENILLE; SOUZA, 1996; SILVEIRA et al., 2000; ROSA et al., 2005; GAINO et al., 2010; OKUBARA et al., 2014). Apesar da dificuldade de controle das doenças causadas por este patógeno, muitas pesquisas têm sido realizadas na busca de métodos alternativos, com resultados satisfatórios para o manejo das doenças causadas por patógenos habitantes de solo (ASCENCION; LIANG; YEN, 2015; LACASA et al., 2015), como os realizados neste estudo, *in vitro* e *in vivo*.

Nos experimentos, *in vitro*, observou-se o efeito inibitório dos compostos voláteis liberados pelo pó e extrato de canola e o efeito direto destes extratos sobre o crescimento micelial de *R. solani* AG4-HG1. Este efeito inibitório no desenvolvimento do patógeno deve-se ao fato das plantas da família *Brassicaceae* constitutivamente possuírem altos níveis de glucosinolatos (FAHEY; ZALCMANN; TALAY, 2001). Estes glucosinolatos após danos nos tecidos são enzimaticamente convertidos em nitrilas, tiocianatos e isotiocianatos (ITCs) (LAMBRUX et al., 2001), entre outros, cujo efeito supressor contra fitopatógenos, também já foi comprovado em inúmeros estudos (OLIVIER et al., 2006; LARKIN; GRIFFIN, 2007; LAZZERI et al., 2009). Entre estes compostos, os ITCs têm sido estudados como os mais tóxicos produzidos pelas brássicas (TSAO et al., 2000). Neste estudo foi observado a presença de benzeno (isotiocianato de metila) e 4-metoxifenil-isotiocianato na amostra de pó de parte aérea de canola após a análise de cromatografia. Contudo, estes compostos não foram detectados na amostra de pó de raiz de canola, apesar de ter sido eficiente sobre o controle do patógeno. O fato destes compostos não terem sido detectados nesta amostra, pode ter sido em decorrência do método de análise utilizado, ou mesmo por estar ausente na amostra, no entanto, sugere-se que novos estudos sejam realizados para confirmar tal hipótese.

Por meio de imagens obtidas em MEV, constatou-se que as hifas do patógeno que tiveram contato com os compostos liberados pelo pó ou extrato de canola perderam a turgidez. Estes compostos possivelmente provocaram a

desestabilização da parede celular das hifas, ocasionando com isso, o extravasamento do conteúdo intracelular. Tal fato é sugerido, pois, ITCs sintéticos causam a morte de células fúngicas através da diminuição na taxa de consumo de oxigênio e pela despolarização da membrana mitocondrial (SELLAM et al., 2007; CALMES et al., 2015).

Nos testes, *in vitro*, também se constatou que os compostos liberados pelo pó ou extrato de canola associados ao do fungo *T. harzianum* não potencializou a redução do crescimento micelial do patógeno. Apesar disso, não se deve descartar a hipótese da associação dessas táticas de controle, pois, muitas vezes os resultados obtidos *in vitro*, com agentes de controle biológico podem ser diferentes dos obtidos em campo (BARRA et al., 2008).

Os componentes químicos liberados pelo pó ou extrato de canola também não inibem o desenvolvimento de *T. harzianum*. Diferentemente dos resultados relatados por Dandurand, Mosher e Knudsen (2000), cujos autores observaram um efeito fungistático de compostos liberados por extratos de semente de canola desengordurada sobre o crescimento micelial de *T. harzianum*. Além disso, os autores ao realizarem análise de cromatografia verificaram que os compostos tóxicos foram absorvidos pelas hifas do antagonista, e conseqüentemente, o efeito sobre o agente patogênico foi menor (DANDURAND; MOSHER; KNUDSEN, 2000).

Os compostos liberados pelo pó e extrato de raiz de canola promovem maior redução do crescimento micelial do patógeno do que o pó e extrato de parte aérea de canola, mesmo em associação com *T. harzianum*. Essa diferença entre a eficiência era esperada, pois diferentes partes da mesma planta apresentam diferentes compostos e concentrações. Este fato também foi constatado por Yim et al., (2016), contudo, neste estudo os níveis mais altos de GSLs foram encontrados em inflorescências e em folhas de mostarda-da-índia, com concentrações totais de GSLs entre 34,11 e 54,65 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa seca e, as raízes, apresentaram concentrações variando entre 1,64 e 12,26 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa seca.

Da mesma forma, após a incorporação do pó e extrato de canola ao solo, esses compostos inibiram o tombamento das plântulas de beterraba, em casa de vegetação e em campo, causado pelo fungo *R. solani*. O efeito supressor das brássicas sobre fitopatógenos habitantes de solo é bastante estudado (ASCENCION, LIANG; YEN, 2015; LACASA et al., 2015). Além disso, sabe-se também que a quantidade de ITCs produzidos pode variar de acordo com a espécie, condições de

cultivo, condições ambientais no momento da degradação dos GSLs e também em diferentes partes da planta (ZHANG et al., 2008; ANTONIOUS; BOMFORD; VINCELLI, 2009). Por exemplo, em um estudo realizado na Alemanha observou-se que as maiores concentrações de GSLs foram encontradas em inflorescências, sem diferenças entre os locais e épocas de cultivo (YIM et al., 2016). Neste mesmo estudo, na espécie *B. juncea* foi identificado como sendo abundante o composto isotiocianato de 2-propenilo, e em *Raphanus sativus*, o 4-metiltio-3- isotiocianato de butenilo (YIM et al., 2016).

Novamente nos estudos realizados com o pó ou extrato de parte aérea e raiz de canola, apesar de estes terem sido realizados separadamente, observou-se que, nos experimentos em casa de vegetação houve diferença no controle do tombamento das plântulas de beterraba causado por *R. solani* AG4-HGI, quando utilizaram-se as diferentes partes da planta de canola na forma de pó e extrato. No entanto, em casa de vegetação e em campo quando associados com a biofumigação e o agente de controle biológico, os resultados foram similares. Quando utilizou-se pó ou extrato de raiz de canola constatou-se que são necessárias concentrações menores para reduzir o tombamento de plântulas de beterraba causado por *R. solani* AG4-HGI, em comparação ao pó ou extrato de parte aérea. Entretanto, ambas as partes das plantas foram eficientes, por controlarem em mais de 80% a doença em todos os experimentos realizados.

A presença de compostos bioativos também pode ser influenciada pela estação de semeadura e época de cultivo, conforme comprovado em outro estudo realizado na Espanha, no qual constatou-se que a concentração de GSLs nas folhas de repolho colhidas na primavera foi maior, do que a concentração de GSLs em folhas colhidas na estação de outono (CARTEA et al., 2008). Neste estudo, a canola foi cultivada entre as estações de outono e inverno nos meses de abril e julho de 2016, e passou por alguns períodos de estiagem, permanecendo por até 20 dias sem chuva, o que pode ter influenciado no teor de GSLs presentes no material utilizado.

Apesar da eficiência comprovada das brássicas na supressão de fitopatógenos, a liberação dos ITCs no solo após a incorporação ocorre em poucas horas. Em um estudo realizado por Handiseni, Jo e Zhou (2016), ao incorporarem a parte aérea de *B. juncea* ao solo, constataram que a liberação dos ITCs ocorre dentro de 12 a 24 horas após a incorporação, e diminuindo para níveis indetectáveis após 72 horas, independentemente da concentração utilizada. Em outro estudo, quando

plantas frescas inteiras de mostarda e canola foram incorporadas ao solo, em um experimento em campo, também observou-se que o pico máximo de liberação de alil-ITC ocorreu após duas horas, no entanto, a liberação deste composto foi detectada por cerca de quatro dias (MORRA; KIRKEGAARD, 2002). Neste sentido, tendo em vista que o período de liberação e volatilização dos ITCs ocorre entre dois a quatro dias, e que podem dissipar-se rapidamente no ambiente, estes compostos podem ter a eficácia reduzida. Tais informações permitem inferir que a incorporação de tecidos oriundos de brássicas associados a plasticultura, pode ser uma forma eficaz de potencializar a ação dos compostos gerados na hidrólise dos GSLs, considerando que estes compostos ficam retidos por mais tempo em contato com o microrganismo alvo. Tal efeito foi constatado quando testaram-se o pó ou extrato de canola em associação a biofumigação sobre o tombamento de plântulas de beterraba e a redução do inóculo do patógeno.

No entanto, a quantidade de inóculo de *R. solani* AG4-HGI presente no solo, mesmo sem a biofumigação, nas maiores concentrações de pó ou extrato de parte aérea ou de raiz de canola foi reduzido para níveis próximos de zero. Resultado similar também foi observado por Moccellini et al. (2017), ao incorporarem ao solo resíduo de canola (30, 60, 90 e 120 t ha⁻¹), associado a utilização de plástico para a biofumigação por 10 dias, nas estações de inverno e verão no controle do tombamento de plântulas de pepino, causada pelo fungo *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Neste estudo, os autores também observaram que a associação entre as diferentes táticas foi mais eficiente no controle da doença. Além disso, constataram que a incorporação de resíduos de canola ao solo pode ser realizada em qualquer estação do ano, uma vez que não houve diferença no controle do patógeno nas diferentes estações do ano testadas.

Nos experimentos, em casa de vegetação, ao testar a associação entre a biofumigação com canola e o fungo *T. harzianum*, destacaram-se os tratamentos extrato (parte aérea e raiz) + *T. harzianum* e apenas o fungo *T. harzianum*, os quais, promoveram um controle da doença superior a 60%. No entanto, em campo observou-se que, de forma geral, os tratamentos com pó de canola (parte aérea e raiz) associado a *T. harzianum* e a biofumigação foram os mais eficazes no controle do tombamento das plântulas de beterraba.

Com isso, pode-se concluir que a associação entre diferentes métodos de controle é capaz de potencializar a eficiência do manejo do tombamento de plântulas.

Resultados semelhantes também foram encontrados em experimentos realizados com o objetivo de controlar a podridão negra da raiz do morango, causada por *R. solani*, quando testou-se a integração de um isolado de *T. harzianum*, óleo de mostarda e um fungicida químico. Neste estudo, observaram que o melhor controle da doença foi obtido com o uso integrado dos métodos de controle, em comparação ao uso de cada método isoladamente (ASAD-UZ-ZAMAN et al., 2015).

Neste estudo também esperava-se que ao associar a ação da biofumigação com canola e a ação do agente de controle biológico, a atividade microbiana fosse outro fator importante que poderia influenciar a redução da doença, nos experimentos realizados em casa de vegetação e em campo. Contudo, observou-se que houve uma diminuição da atividade microbiana, quando utilizaram-se os tratamentos com pó de parte aérea ou raiz de canola.

Por outro lado, apesar das maiores concentrações de pó de canola terem sido mais eficientes no controle do tombamento de plântulas de beterraba, no geral elas também reduziram a emergência. Além disso, o comprimento e a massa das plântulas também variaram em função das concentrações de pó de canola, indicando que os compostos causaram um efeito fitotóxico às plântulas de beterraba, em casa de vegetação. Dessa forma, para minimizar a redução da emergência das plântulas de beterraba, ao utilizar as táticas de manejo demonstradas neste estudo, o agricultor pode aumentar o período entre a incorporação do pó ou extrato ao solo e a semeadura, garantindo com isso, que os compostos fitotóxicos volatilizem totalmente. Entretanto, caso o manejo da doença necessite ser realizado em áreas com pequenos intervalos entre a incorporação e a semeadura, há a opção de utilizar concentrações de 6% de pó ou de 9% de extrato, visto que, estas concentrações tiveram pouco efeito negativo sobre a emergência e também controla satisfatoriamente o tombamento de plântulas, conforme constatado em campo.

Com isso, pelos resultados obtidos neste estudo, de maneira geral, pode-se inferir que a associação entre diferentes métodos alternativos é viável para a utilização no manejo do tombamento de plântulas de beterraba, pois, constatou-se maior controle da doença em pré e pós emergência. Isso possivelmente ocorreu em virtude da associação entre os modos de ação: compostos biocidas liberados pela brassica, aprisionamento destes gases por um maior período de tempo, e por fim, a ação do fungo *T. harzianum*, o qual atua por diversos modos de ação. O pó de canola possui vantagem em relação aos demais biofumigantes, devido a possibilidade de

armazenamento, não exigindo o uso imediato como é o caso das brássicas que são incorporadas na forma de matéria fresca. Dessa forma, o agricultor pode cultivar a canola em períodos de entressafra e, posteriormente, desidratar e armazená-la sem a perda das suas características, e utilizar quando houver necessidade.

6 CONCLUSÃO

Os compostos benzeno (isotiocianato de metila) e 4-metoxifenil-isotiocianato são encontrados em pó de parte aérea de canola.

Os compostos voláteis liberados pelo pó e extrato de raiz de canola inibem o crescimento micelial e danificaram as hifas do patógeno. No entanto, a associação entre o pó e extrato de parte aérea ou raiz de canola a *T. harzianum* se igualaram ao uso dos tratamentos de forma isolada sobre a redução do crescimento micelial, *in vitro*.

As concentrações de 12% de pó de parte aérea ou raiz de canola afetam a emergência de plântulas e reduzem o desenvolvimento das plântulas de beterraba. No entanto, nos experimentos em campo esse fato não foi observado.

O controle do tombamento de plântulas e a redução do inóculo de *R. solani* foi mais eficiente com a aplicação da biofumigação associada aos tratamentos com extrato de raiz ou parte aérea de canola associados a *T. harzianum* e apenas o fungo *T. harzianum*, em casa de vegetação. Em campo destacam-se os tratamentos com pó de parte aérea ou raiz de canola associados ao fungo *T. harzianum* e a biofumigação.

A atividade microbiana do solo é maior em solo com aplicação da biofumigação e com os tratamentos extrato de parte aérea ou raiz de canola associados a *T. harzianum* e apenas o *T. harzianum* em casa de vegetação e em campo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação entre diferentes métodos alternativos é uma forma eficiente de potencializar o controle do tombamento de plântulas. Além disso, os métodos utilizados neste estudo são opções baratas e de fácil acesso pelo produtor, por exemplo a canola, que pode ser cultivada e armazenada na própria propriedade.

Devido aos resultados promissores, sugere-se que em trabalhos futuros sejam testados outros agentes de controle biológico em associação ao uso das brássicas e a biofumigação. Além disso, há também a possibilidade de estudo com canola colhida em outros estádios fenológicos, diferentes cultivares e cultivada em outras épocas de cultivo, visando verificar possíveis alterações nos níveis de isotiocianatos.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005.
- AMBRÓSIO, M. M. Q.; BUENO, C. J.; PADOVANI, C. R.; SOUZA, N. L. Controle de fitopatógenos do solo com materiais vegetais associados à solarização. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 354–358, 2008.
- ANAND, T.; CHANDRASEKARAN, A.; KUTTALAM, S.; SENTHILRAJA, G.; SAMIYAPPAN, R. Integrated control of fruit rot and powdery mildew of chilli using the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* and a chemical fungicide. **Biological Control**, v. 52, s/n, p. 1–7, 2010.
- ANEES, M.; EDEL-HERMANN, V.; STEINBERG, C. Build up of patches caused by *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 4, p.1661–1672. 2010.
- ANTONIOUS, G. F.; BOMFORD, M.; VINCELLI, P. Screening Brassica species for glucosinolate content. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 44, n. 3, p. 311–316, 2009.
- ASAD-UZ-ZAMAN, M.; BHUIYAN, M. R.; KHAN, M. A. I.; BHUIYAN, M. K. A.; LATIF, M. A. Integrated options for the management of black root rot of strawberry caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Comptes Rendus Biologies**, v. 338, n. 12, p. 112–120. 2015.
- ASCENCION, L.C.; LIANG, W. J.; YEN, T. B. Control of *Rhizoctonia solani* damping off disease after soil amendment with dry tissues of Brassica results from increase in Actinomycetes population. **Biological Control**, v. 82, n. 16, p. 21–30. Mar. 2015.
- BARRA, V. R.; ROMEIRO, R. S.; FERRAZ, H. G. M.; MACAGNAN, D.; SILVA, H. S. A.; MOURA, A. B.; HALFELD-VIEIRA, B. A; MENDONÇA, H. L.; VIEIRA JÚNIOR, J. R. Potencialidade antagonística em alguns procariontos agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p.121-126, 2008.
- BEDENDO, I. P. IN: AMORIM, L.; REZENDE, J.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. v. 1, 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 255–270, 2011.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.
- BESRI, M.; MARCOTTE, M.; PIZANO, M.; PORTER, I. **2010 Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee**. v. 1, 1. ed. Montreal, United Nations Environment Programme (UNEP). 2011.
- BLOK, W. J.; LAMERS, J. G.; TERMORSHUIZEM, A. J.; BOLLEN, G. J. Control of

soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, v. 90, n. 4, p. 253–259, 2000.

BOTELHO, S. A.; FARIA, J. M. R.; FURTINI NETO, A. E.; RESENDE, A. V. **Implantação de floresta de proteção**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81 p.

CALMES, B.; N'GUYEN, G.; DUMUR, J.; BRISACH, C. A.; CAMPION, C.; IACOMI, B.; PIGNÉ, S.; DIAS, E.; MACHEREL, D.; GUILLEMETTE, T.; SIMONEAU, P. Glucosinolate-derived isothiocyanates impact mitochondrial function in fungal cells and elicit an oxidative stress response necessary for growth recovery. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 414–421, 2015.

CARDOSO, J. E. **Podridões radiculares**. In: SARTORATO, A.; RAVA, A. (Eds.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: Embrapa-SPI, 1994, p.151–64.

CARTEA, M. E.; VELASCO, P.; OBREGO, S.; PADILLA, G.; HARO, A. de. Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 403–410, 2008.

CASTROAGUDIN, V. L.; FISER, S.; CARTWRIGHT, R. D.; WAMISHE, Y.; CORRELL, J. C. Evaluation of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA and *Rhizoctonia* species for resistance to QoI fungicides. **Phytopathology**, v. 103, s/n, p. 224–232, 2013.

CERESINI, P. C.; FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA 4 HGI a vagens de amendoinzeiro (*Arachis hypogaea*) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 22, n. 3, p. 145–156, 1996.

CHUNG, W. C.; HUANG, J. W.; HUANG, H. C.; JEN, J. F. Effect of ground *Brassica* seed meal on control of *Rhizoctonia* damping-off of cabbage. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 6, p. 211–218, 2002.

DAMICONE, J. P.; PATEL, M. V.; MOORE, W. F. Density of sclerotia of *R. solani* and incidence of sheath blight in rice field in Mississippi. **Plant Disease**, v. 77, pp. 257–260, 1993.

DANDURAND, L. M.; MOSHER, R. D.; KNUDSEN, G. R. Combined effects of *Brassica napus* seed meal and *Trichoderma harzianum* on two soilborne plant pathogens. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 1051–1057, 2000.

DAS, S.; TYAGI, A. K.; KAUR, H. Cancer modulation by glucosinolates: a review. **Current Science**, v. 79, n. 12, p.1665–1671, 2000.

DAVID, G. Q.; CHAVARRO-MESA, E.; SCHURT, D. A.; CERESINI, P. C. *Rhizoctonia* como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In: Lopes, U.P. & Michereff, S.J. **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. 1. ed. -

Recife: EDUFRPE, p. 35–55, 2018.

DEHNE, H. W.; OERKE, E. C. **Impact of diseases and disease control on crop production.** In: HUTSON, D.; MIYAMOTO, J. (Eds.), *Fungicidal Activity: Chemical and Biological Approaches to Plant Protection*, John Wiley and Sons, New York. pp. 121, 1998.

DHINGRA, O. D.; COSTA, M. L. N.; SILVA, J. R. G. J.; MIZUBUTI, E. S. G. O óleo essencial de mostarda para controlar *Rhizoctonia solani* em mudas amorteamento e praga de plântulas no viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p.683–686, 2004.

DOYLE, J. D.; DOYLE, J. L. Um procedimento rápido de isolamento de DNA para pequenas quantidades de tecido foliar fresco. **Boletim Fitoquímico**, v. 19, n. 6, p. 11–15, 1987.

EMBRAPA. Influência da rotação de culturas nas populações de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp *phaseoli* em solo de cerrado. 2000.

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 2. p. 5–51, 2001.

FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L.; KURAMAE, E. E. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 783–792, 2002.

GAINO, A. P. D. S. D. C.; BASSETO, M. A.; GASPAROTTO, L.; POLTRONIERI, L. S.; CERESINI, P. C. Phylogenetic inference reveals the complex etiology of the target and leaf spot diseases on rubber tree and other species cultivated in the Amazon. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 385–395, 2010.

GAJERA, H. P.; HIRPARA, D. G.; KATAKPARA, Z. A.; PATEL, S. V.; GOLAKIYA, B. A. Molecular evolution and phylogenetic analysis of biocontrol genes acquired from SCoT polymorphism of mycoparasitic *Trichoderma koningii* inhibiting phytopathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 45, n. 8, p. 383–392, 2016.

GALINDO, J. J.; ABAWI, G. S.; THURSTON, H. D.; GALVEZ, G. Sources of inoculum and development of bean web-blight in Costa Rica. **Plant Disease**, v. 67, p. 1021–1033, 1983.

GALLETTI, S.; SALA, E.; LEONI, O.; BURZI, P. L.; CERATO, C. *Trichoderma* spp. tolerance to *Brassica carinata* seed meal for a combined use in biofumigation. **Biological Control**, v. 45, n. 7, p. 319–327, 2008.

GAMLIEL, A.; AUSTERWEIL, M.; KRITZMAN, G. Non-chemical approach to soilborne pest management, organic amendments. **Crop Protection**, v. 19, n.2, p.

847–853, 2000.

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J. J. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. **Phytopathology**, v. 83, n. 9, p. 899–905, 1993.

GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariuna: Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, p. 201–217, 1991.

GHINI, R. **Solarização do solo para cultivo de hortaliças**. In: Anais, III Reunião Intinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. Mogi das Cruzes. p. 23–27, 2000.

GIMSING, A. L.; KIRKEGAARD, J. A. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, n. 2, p.299–310, 2009.

GRISI, B. M. Método químico de medição da respiração edáfica: alguns aspectos técnicos. **Ciência e Cultura**, v. 30, n. 1, p. 82–88, 1978.

GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, s/n, p. 399–402, 2002.

GROTH, D. E.; RUSH, M. C.; LINDBERG, G. D. Foliar fungicides for control of rice diseases in the United States. In: GRAYSON, B. T.; GREEN, M.B.; COPPING, L. G. **Pest Management in Rice**. Elsevier Applied Science Publication, London and New York, pp. 31–52, 1990.

HANDISENI, M.; JO, Y. K.; ZHOU, K. G. Screening Brassicaceous Plants as Biofumigants for Management of *Rhizoctonia solani* AG1-IA. **Plant Disease**, v. 100, n. 4, p. 758–763, 2016.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 4, p.190–194, 2006.

HAWKSWORHT, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 8.ed. New York: CAB International, 1995. 616p.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plantbeneficial effects of *Trichoderma* and its genes. **Microbiology**, v. 158, n. 3, p. 17–25. 2012.

HUANG, H.; LIU, L.; WEN, T.; ZHANG, J.; SHEN, Q.; CAI, Z. Reductive soil disinfestations combined or not with *Trichoderma* for the treatment of a degraded and *Rhizoctonia solani* infested greenhouse soil. **Scientia Horticulturae**, v. 206, n. 5, p. 51–61, 2016.

KHEDHER L.; RAMÍREZ J.; GÓRRIZ J. M.; BRAHIM A.; ILLÁN, I. **Independent component analysis-based classification of alzheimers disease from segmented MRI data**. In: International Work-Conference on the Interplay between Natural and Artificial Computation (Cham: Springer), p. 78–87, 2015.

KO, W.; HORA, F. K. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, v. 61, n. 6, p. 707–710, 1971.

KURAMAE, E. E.; BUZETO, A. L.; CIAMPI, M. B.; SOUZA, N. L. Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in lettuce, AG-4 HG-I in tomato and melon, and AG-4 HGIII in broccoli and spinach, in Brazil. **European journal of plant pathology**, v. 109, n. 4, p. 391–395, 2003.

LACASA, C. M.; MARTÍNEZ, V.; HERNÁNDEZ, A.; ROS, C.; LACASA, A.; GUERRERO, M. del M.; RODRIGUEZ-MOLINA, M. del C.; SERRANO-PÉREZ, P.; LARREGLA, S. Survival reduction of *Phytophthora capsici* oospores and *P. nicotianae* chlamydospores with Brassica green manures combined with solarization. **Scientia Horticulturae**, v. 197, n.14, p. 607–618, 2015.

LAMBRIX, V.; REICHEL, M.; MITCHELL-OLDS, T.; KLIEBENSTEIN, D. J.; GERSHENZON J. The Arabidopsis Epithiospecifier Protein Promotes the Hydrolysis of Glucosinolates to Nitriles and Influences *Trichoplusia* ni Herbivory. **The Plant Cell**, v. 13, p. 2793–2807, 2001.

LARKIN, R. P.; GRIFFIN, T. S.; Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures. **Crop Protection**, v. 26, s/n, p. 1067–1077, 2007.

LAZZERI, L.; CURTO, G.; DALLAVALLE, E.; D'AVINO, L.; MALAGUTI, L.; SANTI, R.; PATALANO, G. Nematicidal efficacy of biofumigation by defatted Brassicaceae meal for control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. on a Full Field Zucchini Crop. **International Journal of Sustainable Future for Human Security**, v. 33, n. 8, p. 349–358, 2009.

LEWIS, J. A.; LUMSDEN, R. D. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 20, p. 49–56, 2001.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, v. 196, n. 7, p. 109–123, 2015.

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**, v. 9, n. 3, p. 145–149, 2009.

MAWAR, R. S.; LODHA, S. K. Brassica amendments and summer irrigation for control

of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumuni* in hot arid regions. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 41, n. 9, p.45–54, 2002.

MAC NISH, G. C.; SWEETINGHAM, M. W. Evidence of stability of pectic zymogram groups within *Rhizoctonia solani* AG-8. **Mycological Research**, v. 97, n. 7, p.1056–1058, 1993.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de *trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 132–139, 2010.

MOCCELLIN, R.; SANTOS, I. dos.; HECK, D. W.; MALAGI, G.; DALLEMOLEGIARETTA, R. Control of cucumber damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* using canola residues. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 4, p. 291–297, 2017.

MORATELLI, R. F.; THEODORO, G. F.; PRANDO, M. B.; SEHN, K. K.; RIBEIRO, S. G. S. P. Controle do tombamento de plântulas de algodoeiro, causado por *Rhizoctonia solani*, através do tratamento de sementes. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 580–588, 2012.

MORRA, M. J.; KIRKEGAARD, J. A. Isothiocyanate release from soil- incorporated Brassica tissues. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, s/n, p.1683–1690, 2002.

MUKHERJEE, P. K.; NAUTIYAL, C. S.; MUKHOPADHYAY, A. N. Molecular mechanisms of biocontrol by *Trichoderma* spp. In: NAUTIYAL, C. S.; DION, P. **Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence**, vol. 15, p. 243–262, 2008.

NEHER, O. T.; GALLIAN, J. J. ***Rhizoctonia* on sugar beet – Importance, identification and control in Northwest**. A Pacific Northwest Extension Publication: Oregon State University. 2011.

NIELSEN, V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 219–229, 2000.

OKUBARA, P. A.; DICKMAN, M. B.; BLECHL, A. E. Molecular and genetic aspects of controlling the soilborne necrotrophic pathogens *Rhizoctonia* and *Pythium*. **Plant Science**, v. 228, s/n, p. 61–70, 2014.

OLIVIER, A. R.; UDA, Y.; BAMG, S. W.; HONJO, H.; FUKAMI, M.; FUKUI, R. Dried residues of specific cruciferous plants incorporated into soil can suppress the growth of *Ralstonia solanacearum*, independently of glucosinolate content of the residues. **Microbes and Environments**, v. 21, n. 4, 216–226, 2006.

ONESIROSAN, P. T. Seed borne and weedborne inoculum in web-blight of cowpea. **The Plant Disease Reporter**, v. 59, n. 4, p. 338–339, 1975.

RAMIERZ-VILLAPUDUA, J.; MUNNECKE, D. E. Effect of solar heating and soil amendments of cruciferous residues on *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and other organisms. **Phytopathology**, v. 78, n. 12, p. 289–295, 1988.

ROSA, D. D.; KURAMAE, E. E.; FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L. Caracterização citomorfológica, molecular e patogênica de isolados de *Rhizoctonia solani* na cultura da batata (*Solanum tuberosum*). **Summa Phytopathologica**, v. 31, n. 2, p. 133–141, 2005.

ROSA, E. A. S.; RODRIGUES, P. M. F. Towards a more sustainable agriculture system: the effect of glucosinolates on the control of soilborne diseases. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 667–674, 1999.

ROS, M.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, M. T.; LACASA, A.; FERNÁNDEZ, P.; PASCUAL, J. A. Effects of biosolarization as methyl bromide alternative for *Meloidogyne incognita* control on quality of soil under pepper. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 5, p. 37–44, 2008.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspects of the effects of the fungus *Trichoderma* spp. in biocontrol of pathogens of agricultural crops. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 3, p. 203–209, 2009.

SASIREKHA, B.; SRIVIDYA, S. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, n. 4, p. 250–256, 2016.

SELLAM, A.; DONGO, A.; GUILLEMETTE, T.; HUDHOMME, P.; SIMONEAU, P. Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, s/n, p. 195–208, 2007.

SHAPIRO, T. A.; FAHEY, J. J. W.; WADE, K. L.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, P. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, n. 5, p. 501–508, 2001.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 21, p. 21–43, 2010.

SILVA-BARRETO, F. A. D.; PEREIRA, W. V.; CIAMPI, M. B.; CÂMARA, M. P. S.; CERESINI, P. C. Associação de *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose 4 (AG-4 HGI

e HGIII) a espécies de plantas invasoras de área de cultivo de batata. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 4, p. 145–154, 2010.

SILVA, P.R.Q. da. **Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida benomil**. Tese de doutorado, Brasília, UnB, 130p., 2000.

SILVA, J. B. C.; OLIVEIRA-NAPOLEÃO, I. T.; FALCÃO, L. L. Desinfestação de substratos para produção de mudas, utilizando vapor de água. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 155–158, 2001.

SILVEIRA, S. F.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; SUTTON, J. C. Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated Eucalyptus in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, s/n, p. 27–36, 2000.

TRILLAS, M. I.; CASANOVA, E.; COTXARRERA, L.; ORDOVÁS, J.; BORRERO, C.; AVILÉS, M. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. **Biological Control**, v. 39, n. 2, p. 32–38, 2006.

TSAO, R.; YU, Q.; FRIESEN, I.; POTTER, J.; CHIBA, M. Factors Affecting the Dissolution and Degradation of Oriental Mustard-Derived Sinigrin and Allyl Isothiocyanate in Aqueous Media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1898–1902, 2000.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALERO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 1–20, 2007.

YIM, B.; HANSCHEN, F. S.; WREDE, A.; NITT, H.; SCHREINER, M.; SMALLA, K.; WINKELMANN, T. Effects of biofumigation using *Brassica juncea* and *Raphanus sativus* in comparison to disinfection using Basamid on apple plant growth and soil microbial communities at three field sites with replant disease. **Plant Soil**, v. 406, n. 2, p. 389–408, 2016.

YORINORI, J. T. **Evolução da ocorrência e da severidade da podridão vermelha da raiz da soja (PVR/SDS) e reação das cultivares comerciais à doença**. Resumos, XXII Reunião de pesquisa de soja da região Central do Brasil. Cuiabá MS. 2000. p. 94.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, v. 22, s/n, p. 837–845, 1932.

WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopatolology**, v. 24, s/n, p. 1153–1179, 1934.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols: A guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego, pp. 315–322, 1990.

ZHANG, H.; SCHONHOF, I.; KRUMBEIN, A.; GUTEZEIT, B.; LI, L.; STÜTZEL, H.; SCHREINER, M. Water supply and growing season influence glucosinolate concentration and composition in turnip root (*Brassica rapa* spp. *rapifera* L.). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 171, s/n, p. 255–265, 2008.