



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

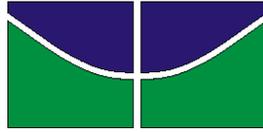
**BIOCHAR E *Trichoderma harzianum* NO
CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina***

ALYSON SILVA DE ARAUJO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF

MARÇO/2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**BIOCHAR E *Trichoderma harzianum* NO
CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina***

ORIENTADOR: LUIZ EDUARDO BASSAY BLUM
CO-ORIENTADOR: CÍCERO CÉLIO DE FIGUEIREDO

ALYSON SILVA DE ARAUJO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF
MARÇO/2018

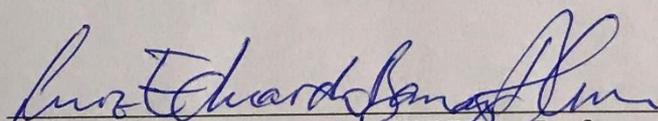
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

BIOCHAR E *Trichoderma harzianum* NO CONTROLE DE
Macrophomina phaseolina

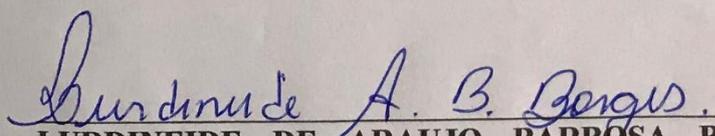
ALYSON SILVA DE ARAUJO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.

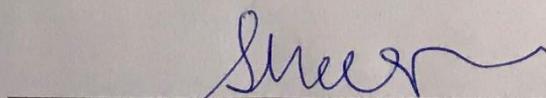
APROVADA POR:



LUIZ EDUARDO BASSAY BLUM – Professor Doutor (Universidade de Brasília)
(Orientador) CPF: 333.965.071-34 / Email: luizblum@unb.br



LURDINEIDE DE ARAUJO BARBOSA BORGES – Professora Doutora
(Universidade de Brasília)
(Examinadora interna) CPF: 912.812.291-72 / Email: borgeslab@unb.br



SUELI CORRÊA MARQUES DE MELLO – Pesquisadora Doutora (EMBRAPA)
(Examinadora externa) CPF: 144.403.851-68/ Email: sueli.mello@embrapa.br

BRASÍLIA/DF, 02 DE MARÇO DE 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

ARAUJO, Alyson Silva de

“BIOCHAR E *Trichoderma harzianum* NO CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina*”.

Orientação: Luiz Eduardo Bassay Blum, Brasília, 2018. 70 páginas.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2018.

1. Bio sólido 2. Controle de fitopatógenos 3. Podridão cinzenta

I. Blum, L. E. B. II. Dr.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARAUJO, A. S. de. Biochar e *Trichoderma harzianum* no controle de *Macrophomina phaseolina*. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 70 páginas. Dissertação.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: ALYSON SILVA DE ARAUJO

Título da Dissertação de Mestrado: Biochar e *Trichoderma harzianum* no controle de *Macrophomina phaseolina*.

Grau: Mestre **Ano:** 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

ALYSON SILVA DE ARAUJO

CPF: 030.249.801-05

QNO 04 Conjunto F casa 26

CEP: 72.250.406 Ceilândia, DF. Brasil

(61) 98187-9790/ e-mail: alyson.sa92@hotmail.com

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio Carlos e Zenaide Pereira, e a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos que têm colocado em minha vida. Aos meus pais – Antonio Carlos e Zenaide Pereira, por todos os ensinamentos, apoio, dedicação e contribuições em todo meu processo estudantil.

A minha família por se manterem ao meu lado em todas as fases da minha vida, em momentos bons e ruins. Principalmente meu irmão Anderson Carlos que sempre esteve ao meu lado me motivando a lutar por todos meus sonhos.

A minha noiva Beatriz Alves, que nos últimos anos tem feito parte da minha vida, contribuindo efetivamente em minhas decisões, me ajudando nos momentos difíceis, me dando força e motivação para continuar lutando para alcançar todos os meus objetivos. Agradeço ao professor Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum, por apoiar essa nova linha de pesquisa, orientando os diferentes ensaios desenvolvidos, sugerindo relevantes ideias para condução do mestrado, como também, por sua prontidão em ajudar em quaisquer momentos.

Agradeço ao professor Dr. Cícero Célio de Figueiredo, tanto por sua dedicação, comprometimento, seriedade e motivação, assim como, sua enorme contribuição como co-orientador em toda etapa de desenvolvimento desse trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Estudo da Matéria Orgânica do Solo, em destaque à Helen Neves, Letícia Pereira, Thamires Dutra, Jhon Kenedy, Thais França, Stênio Souza, Sara Rocha, Thais Coser, Jóisman Fachini e Priscila Reis, que participaram efetivamente na execução deste trabalho.

A toda equipe do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, em especial ao Bernardo Viscardi e José César que colaboraram em diferentes etapas dos experimentos realizados.

A toda equipe da Estação Experimental de Biologia – UnB, em especial ao senhor Fábio, colaborando na condução do experimento em telado.

À professora Nara Oliveira e toda equipe da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV que colaboraram de alguma forma para realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	3
2. HIPÓTESES	5
3. OBJETIVOS	5
3.1. Objetivo geral	5
3.2. Objetivos específicos	5
4. REVISÃO DE LITERATURA	6
4.1. <i>Macrophomina phaseolina</i> : características e ocorrência em culturas agrícolas..	6
4.2. Lodo de esgoto: importância, produção e uso	7
4.3. Biochar de lodo de esgoto: produção e uso agroambiental.....	8
4.4. Biochar no controle de doenças de plantas	10
4.5. <i>Trichoderma harzianum</i> para controle de fitopatógenos	12
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
5.1. Obtenção e caracterização do Biochar.....	14
5.2. <i>Experimento 1</i> - Avaliação <i>in vitro</i> do Biochar no crescimento de <i>M. phaseolina</i>	16
5.3. <i>Experimento 2</i> – Avaliação de patogenicidade dos isolados de <i>M. phaseolina</i> ...	17
5.4. <i>Experimento 3</i> - Reação de <i>M. phaseolina</i> a concentrações do Biochar 500 °C .	18
5.5. <i>Experimento 4</i> – Pareamento de culturas (<i>M. phaseolina</i> x <i>T. harzianum</i>)	18
5.6. <i>Experimento 5</i> – Uso do biochar em plantas de soja e feijão, cultivadas em vaso	20
5.7. <i>Análise estatística</i>	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6.1. <i>Experimento 1</i>	22

6.2.	<i>Experimento 2</i>	23
6.3.	<i>Experimento 3</i>	27
6.4.	<i>Experimento 4</i>	30
6.5.	<i>Experimento 5</i>	34
7.	CONCLUSÕES	49
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** LE in natura (A), forno tubular elétrico (B), BCH 300 (C) e BCH 500 (D).. 15
- Figura 2.** Primeiro dia após semeadura (A) e sexagésimo dia após semeadura (B)..... 18
- Figura 3.** *M. phaseolina* x *T. harzianum* em BDA (A) e *M. phaseolina* x *T. harzianum* em BDA + BCH (B). 19
- Figura 4.** Montagem do experimento (A) e tratamentos com aplicação de BCH (B)... 20
- Figura 5.** Vigésimo segundo dia após semeadura (A) e formação de flores e vagens em plantas de feijão (B)..... 21
- Figura 6.** Crescimento micelial *in vitro* dos isolados 424 e 428 de *Macrophomina phaseolina* na presença de biochars obtidos a 300 (300) e 500 °C (500). Letras iguais indicam ausência de diferença significativa (Teste de Duncan, $p < 0,05$). 22
- Figura 7.** Porcentagem de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) germinadas e de plantas sobreviventes, inoculadas com isolados (423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 e 430) de *Macrophomina phaseolina*. (0) = testemunha não inoculada. Letras iguais, minúsculas (germinação) e maiúsculas (sobrevivência), indicam ausência de diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)]. 24
- Figura 8.** Massa fresca (g) e massa seca (g) das plantas de feijão comum inoculadas com isolados de *Macrophomina phaseolina*. (0) = testemunha não inoculada. Letras iguais, maiúsculas (Massa fresca) e minúsculas (Massa seca), indicam ausência de diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)]. 25
- Figura 9.** Porcentagem de sementes de soja (*G. max*) germinadas e de plantas sobreviventes quando inoculadas com isolados de *Macrophomina phaseolina*. (0) = testemunha não inoculada. Letras iguais, maiúsculas (Germinação) e minúsculas (Sobrevivência), indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)]. 26
- Figura 10.** Massa fresca (g) e massa seca (g) das plantas de soja inoculadas com diferentes isolados de *Macrophomina phaseolina*. (0) = testemunha não inoculada. Letras iguais, maiúsculas (Massa fresca) e minúsculas (Massa seca), indicam ausência de diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)]. 27
- Figura 11.** Pareamento de culturas [*M. phaseolina* (424) x *T. harzianum* (linhagem 1306)] em meio de cultura sem biochar e com biochar [0,5%]. Avaliação da *M. phaseolina* em horas após montagem do experimento. (424 - isolado 424; BC - biochar

500 °C; TH - <i>T. harzianum</i>). Letras iguais indicam que não há diferença significativa para cada período [Teste Duncan (p<0,05)].	30
Figura 12. Pareamento de culturas [<i>M. phaseolina</i> (425) x <i>T. harzianum</i> (linhagem 1306)] em meio de cultura sem biochar e com biochar [0,5%]. Avaliação da <i>M. phaseolina</i> em horas após montagem do experimento. (425 - isolado 425; BC – biochar 500 °C; TH – <i>T. harzianum</i>). Letras iguais indicam que não há diferença significativa para cada período [Teste de Duncan (p<0,05)].	32
Figura 13. Pareamento de culturas [<i>M. phaseolina</i> (428) x <i>T. harzianum</i> (linhagem 1306)] em meio de cultura sem biochar e com biochar [0,5%]. Avaliação da <i>M. phaseolina</i> em horas após montagem do experimento. (428 – isolado 428; BC – biochar 500 °C; TH – <i>T. harzianum</i>). Letras iguais indicam que não há diferença significativa para cada período [Teste de Duncan (p<0,05)].	33
Figura 14. <i>T. harzianum</i> x <i>M. phaseolina</i> em meio de cultura com BCH (A) e <i>T. harzianum</i> x <i>M. phaseolina</i> em meio de cultura sem BCH (B).	34
Figura 15. Porcentagem de sementes de feijão (<i>P. vulgaris</i>) germinadas quando submetidas a diferentes tratamentos, inoculadas ou não com três isolados de <i>M. phaseolina</i> . Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan (p<0,05)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - <i>T. harzianum</i>).	43
Figura 16. Porcentagem de plantas de feijão (<i>P. vulgaris</i>) sobreviventes quando submetidas a diferentes tratamentos, inoculadas ou não com três isolados de <i>M. phaseolina</i> . Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan (p<0,05)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - <i>T. harzianum</i>).	44
Figura 17. Número de vagens de feijão (<i>P. vulgaris</i>) por vaso, a partir de diferentes tratamentos, sendo as plantas inoculadas ou não com três isolados de <i>M. phaseolina</i> . Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan (p<0,05)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - <i>T. harzianum</i>).	45
Figura 18. Massa fresca (g) de feijão (<i>P. vulgaris</i>) por vaso, a partir de diferentes tratamentos, sendo as plantas inoculadas ou não com três isolados de <i>M. phaseolina</i> . Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan (p<0,05)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - <i>T. harzianum</i>).	46
Figura 19. Massa seca (g) de feijão (<i>P. vulgaris</i>) por vaso, a partir de diferentes tratamentos, sendo as plantas inoculadas ou não com três isolados de <i>M. phaseolina</i> . Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan (p<0,05)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - <i>T. harzianum</i>).	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Umidade, sólidos voláteis e cinzas do lodo de esgoto.....	14
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do biochar produzido sob diferentes temperaturas de pirólise.	16
Tabela 3. Crescimento micelial (cm) de <i>Macrophomina phaseolina</i> (424) em diferentes concentrações de biochar (500 °C), em horas após montagem do experimento.	28
Tabela 4. Crescimento micelial (cm) de <i>Macrophomina phaseolina</i> (425) em diferentes concentrações de biochar (500 °C), em horas após montagem do experimento.	29
Tabela 5. Crescimento micelial (cm) de <i>Macrophomina phaseolina</i> (428) em diferentes concentrações de biochar 500 °C, em horas após montagem do experimento.	29
Tabela 6. Porcentagem de sementes de soja germinadas e de plantas sobreviventes na presença de <i>M. phaseolina</i> (424), biochar e <i>T. harzianum</i>	35
Tabela 7. Porcentagem de sementes de soja germinadas e de plantas sobreviventes na presença de <i>M. phaseolina</i> (425), biochar e <i>T. harzianum</i>	36
Tabela 8. Porcentagem de sementes de soja germinadas e de plantas sobreviventes na presença de <i>M. phaseolina</i> (428), biochar e <i>T. harzianum</i>	37
Tabela 9. Número de vagens de soja por vaso, a partir de diferentes tratamentos, contabilizado 100 dias após semeadura.....	38
Tabela 10. Número de vagens de soja por vaso, a partir de diferentes tratamentos, contabilizado 100 dias após semeadura.....	39
Tabela 11. Número de vagens de soja por vaso, a partir de diferentes tratamentos, contabilizado 100 dias após semeadura.....	39
Tabela 12. Massa fresca e massa seca (g) de plantas de soja por vaso, quando submetidas a diferentes tratamentos.	41
Tabela 13. Massa fresca e massa seca (g) de plantas de soja por vaso, quando submetidas a diferentes tratamentos.	41
Tabela 14. Massa fresca e massa seca (g) de plantas de soja por vaso, quando submetidas a diferentes tratamentos.	42

RESUMO GERAL

Macrophomina phaseolina é um importante patógeno habitante do solo, associado ao “damping-off” e podridões de raízes e caules em mais de 700 espécies de plantas. O uso de biochar (BCH) de lodo de esgoto, aplicado ao solo, tem despertado interesse em diferentes estudos para o controle de doenças em plantas, proporcionando uma inibição ou mesmo suprimindo fitopatógenos. O controle biológico é evidenciado por ser uma alternativa eficaz para o manejo de diferentes fitopatógenos. *Trichoderma* é um dos mais estudados e utilizados agentes de biocontrole de doenças vegetais em todo o mundo. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação ao solo de BCH, *Trichoderma harzianum* e da associação BCH + *T. harzianum* sobre *M. phaseolina* em aspectos agronômicos das culturas de soja, milho, feijão e algodão inoculadas ou não com o fitopatógeno. Foi avaliado o efeito direto de concentrações (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0%) de BCH sobre o crescimento micelial de isolados de *M. phaseolina*. Foi observado ainda a capacidade de biocontrole por meio do uso do pareamento de cultura (*T. harzianum* x *M. phaseolina*) com ou sem biochar. Além disso, foi avaliado o uso de BCH, do *T. harzianum*, e da associação BCH + *T. harzianum* em plantas de feijão e soja para controle de *M. phaseolina* em experimento conduzido em casa de vegetação. Biochar de lodo de esgoto, pirolisado a 500 °C e utilizado em baixa concentração (0,5%), possui efeito direto no controle *in vitro* de diferentes isolados de *M. phaseolina*. No entanto, concentrações mais elevadas do BCH estimulou o crescimento do fungo. *Trichoderma harzianum* (linhagem 1306) inibiu o crescimento micelial de *M. phaseolina*, em meio de cultura com ou sem biochar. *Macrophomina phaseolina* afeta negativamente: (a) a germinação e sobrevivência de plantas de soja e; (b) a germinação, sobrevivência e número de vagens de plantas de feijão comum. O isolado 428 de *M. phaseolina* reduziu todos os índices agronômicos (germinação, sobrevivência, número de vagens, massa fresca e seca) de plantas de feijão. O uso de BCH aumentou o número de vagens em plantas de soja, inoculadas ou não com *M. phaseolina*. A associação *T. harzianum* + BCH de lodo de esgoto aumentou o número de vagens, massa fresca e seca de plantas de feijão, inoculadas ou não com *M. phaseolina*.

Palavras-chave: bioossólido, controle de fitopatógenos, podridão cinzenta.

ABSTRACT

Macrophomina phaseolina is an important soil pathogen, associated with “damping-off” and root and stem rot in more than 700 plant species. The use of biochar (BCH) of sewage sludge applied to the soil, has aroused interest in studies for the control of diseases in plants, providing an inhibition of plant pathogens. Biological control is evidenced as an effective alternative for the management of different phytopathogens. *Trichoderma* is one of the most studied and used biocontrol agents of plant diseases worldwide. The objective of this work was to evaluate the effects of BCH, *Trichoderma harzianum* and BCH + *T. harzianum* on *M. phaseolina* and on agronomic aspects of soybeans, maize, beans and cotton inoculated or not with *M. phaseolina*. The direct effect of concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0%) of BCH on the mycelial growth of *M. phaseolina* isolates was evaluated. It was also observed the biocontrol capacity using culture pairing (*T. harzianum* x *M. phaseolina*) with or without biochar. In addition, the use of BCH, *T. harzianum*, and the association BCH + *T. harzianum* in bean and soybean plants were evaluated for *M. phaseolina* control in a greenhouse experiment. Biochar of sewage sludge, pyrolyzed at 500 °C and used in low concentration (0.5%), has direct effect on the in vitro control of isolates of *M. phaseolina*. However, higher concentrations of BCH stimulated fungal growth. *Trichoderma harzianum* (strain 1306) inhibited the mycelial growth of *M. phaseolina*, in culture medium with or without biochar. *Macrophomina phaseolina* negatively affects: (a) the germination and survival of soybean plants, and; (b) the germination, survival and number of pods of common bean plants. Isolate 428 from *M. phaseolina* reduced all agronomic characteristics (germination, survival, number of pods, fresh and dry mass) of bean plants. The use of BCH increased the number of pods in soybean plants, inoculated or not with *M. phaseolina*. The association of *T. harzianum* + BCH of sewage sludge increased the number of pods, fresh and dry mass of bean plants, whether or not inoculated with *M. phaseolina*.

Keywords: biosolids, control of phytopathogens, gray rot.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Macrophomina phaseolina é um fungo Ascomycota da família Botryosphaeriaceae (MYCOBANK, 2016). Trata-se de um importante patógeno habitante do solo, destacando-se por ser polífago, cosmopolita, de alta variabilidade patogênica e capacidade de sobrevivência no solo sob condições adversas. Seu crescimento é favorecido por temperaturas elevadas e baixa umidade do solo, sendo eficientemente disseminado por sementes infectadas (GOMES et al., 2008).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo (MMA, 2016). As vendas anuais de agrotóxicos no Brasil entre os anos de 2000 e 2012 apresentaram um crescimento de 194,1%. Em 2014, foram comercializadas 508.556,84 toneladas de ingredientes ativos (IBAMA, 2014). Entretanto, os problemas causados ao ambiente pelos produtos químicos têm estimulado o estudo de técnicas e o desenvolvimento de métodos alternativos e produtos biológicos para o controle de doenças de plantas, considerados de menor potencial ofensivo ao meio ambiente (BROETTO et al., 2014).

Entre as alternativas, a utilização de resíduos orgânicos pode influenciar na supressividade do solo contra patógenos através do estímulo da atividade da biota, pelo aumento e favorecimento de populações de agentes de biocontrole, diminuição do potencial de inóculo dos fitopatógenos, como também, através da ação de compostos provenientes da decomposição da matéria orgânica (BETTIOL e MORANDI, 2009).

A utilização de diferentes tipos de materiais orgânicos aplicados ao solo para o controle de fitopatógenos vem sendo amplamente avaliada. Nessa linha de pesquisa, a possibilidade do biochar (BCH), quando adicionado ao solo, provocar uma inibição ou mesmo suprimir o desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos e, conseqüentemente, reduzir a severidade e a incidência das doenças em plantas, tem despertado a atenção em diferentes estudos (ELMER, 2011; JAISWAL et al., 2014).

O BCH é um produto sólido, rico em carbono, obtido pelo aquecimento de biomassa sob condições controladas de oxigenação, em processo conhecido como pirólise (SOHI, 2012), produzindo também um material líquido, o bio-óleo, e gases como H₂, CO, CO₂, CH₄, C₂H₄ e C₂H₆ (VIEIRA, 2012). O BCH pode ser obtido a partir de várias matérias primas, como biomassa lenhosa retirada da compostagem, resíduos de madeira provenientes de operações de colheita florestal comercial, e resíduos urbanos como o lodo de esgoto. Esta diversidade de matéria-prima utilizada sob diferentes condições resulta em produtos com propriedades variadas (HARTLEY et al., 2016; YUAN et al., 2015).

A matéria-prima e a temperatura de pirólise adotadas na produção do BCH são fatores que influenciam nas características finais do produto. Jaiswal et al. (2014) observaram que BCHs produzidos com matérias-primas distintas e em diferentes temperaturas apresentavam variações no controle de determinadas doenças, como no caso do ‘damping-off’ (*Rhizoctonia solani*). Outro fator também discutido é que concentrações mais elevadas do BCH se tornam ineficazes, ou mesmo favorecem a doença, demonstrando uma interação significativa entre matéria-prima e concentração do BCH para controle de ‘damping-off’. Desse modo, BCHs obtidos de diferentes matérias-primas possuem distintas concentrações ótimas para o controle de doenças.

Pesquisas envolvendo a aplicação de BCH ao solo têm demonstrado alterações na ocorrência de microrganismos e os consequentes efeitos sobre o crescimento das plantas. Por exemplo, Graber et al. (2010) observaram que em solos que receberam BCH houve um aumento na população de *Trichoderma* spp. em relação ao solo controle (sem BCH).

O controle biológico tem sido amplamente estudado como alternativa eficaz para o manejo de diferentes fitopatógenos. Os benefícios viabilizados por tais estratégias de controle estão associados ao fato de ser um método seguro, que não polui e não causa desequilíbrio ambiental e, principalmente, promove sistemas mais sustentáveis, permitindo plantios subsequentes com menores problemas fitopatológicos (SCUDELER e VENEGAS, 2012). Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* estão entre os mais estudados e utilizados como agentes de biocontrole de doenças vegetais em todo o mundo. Segundo Khalili et al. (2016), o uso de isolados de *Trichoderma harzianum* em estudo de pareamento com *M. phaseolina* tem evidenciado grande capacidade de inibição ao fitopatógeno, por mecanismos diversos, como hiperparasitismo e produção de compostos voláteis por parte dos isolados desse fungo.

Este estudo está fundamentado na importância dos métodos de controle biológico e na ausência de informações sobre efeito do BCH associado ou não ao *Trichoderma* no controle de *M. phaseolina*, em culturas de grande interesse econômico para o Cerrado.

2. HIPÓTESES

- I.** O biochar de lodo de esgoto inibe o crescimento de *M. phaseolina*.
- II.** A aplicação de biochar de lodo de esgoto ao solo favorece o controle de *M. phaseolina*.
- III.** O biochar de lodo de esgoto potencializa o crescimento de *T. harzianum*.
- IV.** A associação biochar + *T. harzianum* melhora o desenvolvimento de plantas de feijão, soja e controla o fungo *M. phaseolina*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da aplicação ao solo de biochar de lodo de esgoto e da associação biochar + *T. harzianum* sobre *M. phaseolina* sob os aspectos agrônômicos (germinação, sobrevivência, número de vagens, massa fresca e seca) das culturas de soja, milho, feijão e algodão.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o crescimento micelial de isolados de *M. phaseolina* em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) sintético quando enriquecido com biochar.
2. Avaliar a patogenicidade de oito diferentes isolados de *M. phaseolina* em plantas de soja, milho, feijão e algodão.
3. Determinar a temperatura de pirólise do biochar que apresenta maior efetividade de inibição no crescimento micelial de *M. phaseolina*.
4. Quantificar a concentração ótima de aplicação de biochar de lodo de esgoto para o controle de *M. phaseolina*.
5. Avaliar o efeito antagonista de *T. harzianum* sobre *M. phaseolina*.
6. Observar o crescimento de *T. harzianum* quando em contato com biochar.
7. Avaliar o efeito da associação biochar + *T. harzianum* no desenvolvimento de plantas de soja, milho, feijão e algodão.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. *Macrophomina phaseolina*: características e ocorrência em culturas agrícolas

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. pertence ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae (MYCOBANK, 2016). O fungo possui micélio uninucleado, embora as células das extremidades do micélio, região de crescimento, sejam usualmente multinucleadas (KNOX-DAVIES, 1967). Na forma imperfeita, produz picnídios de cor marrom-escuros, solitários ou agregados, com 100-200 µm de diâmetro, abrindo-se por ostíolo apical (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970). Os picnídios podem apresentar variações em tamanho de acordo com o substrato ao qual o fungo se desenvolve (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Nem todos os isolados de *M. phaseolina* produzem picnídios (EMBRAPA, 2014). De acordo com Sutton (1980), em meio de cultura apenas os microesclerócios são produzidos. Entretanto, Machado (1987) observou que entre 12 isolados estudados, metade produziu picnídios, quando cultivados em meio de BDA.

Os conídios são hialinos, com formato variando de elipsoide a ovoide, medindo 14-30µm x 5-10µm (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970). O fungo produz microesclerócios, que consistem em estruturas multicelulares, duras e resistentes a condições adversas, e, são uma das formas de sobrevivência do fungo, bem como a principal fonte de inóculo do patógeno (EMBRAPA, 2014). Estes são encontrados em grandes quantidades sob a epiderme das raízes ou na camada externa do córtex e na região do colo da planta. Os microesclerócios são negros e lisos, e medem em torno de 100µm (50-300µm) (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970), produzidos a partir do micélio.

Com a decomposição dos tecidos das plantas, os microesclerócios são liberados no solo, e em contato com a região do colo ou da raiz das hospedeiras, germinam e as infectam. O patógeno além de ser um habitante do solo, pode ser disseminado pelas sementes de uma área para outra. A presença do fungo na semente resulta em de “damping-off” de pré-emergência, reduzindo o stand de plantas (MENEZES et al., 2004).

A viabilidade dos microesclerócios em campo é reduzida a partir de condições de alta umidade do solo, baixa relação C/N, baixa densidade do solo e concentração de oxigênio menor que 16% (DHINGRA; SINCLAIR, 1975; GANGOPADHYAY et al., 1982). Dhingra e Sinclair (1978) observaram também em seus estudos que a longevidade dos microesclerócios em condições adversas pode chegar a três anos.

O fungo pode infectar várias espécies vegetais (GUPTA et al, 2012), sendo feijão, caupi, milho, amendoim, girassol, soja, sorgo e crotalária, as espécies suscetíveis mais

comuns no Brasil. Esse fitopatógeno está associado ao “damping-off” e podridões de raízes e caules em mais de 700 vegetais cultivados ou não (SMML, 2016), sendo favorecido por clima quente e seco ou de estresse de calor (RADWAN et al., 2014).

A ocorrência de *M. phaseolina* foi relatada pela primeira vez no Brasil em feijão (BITANCOURT, 1935). Na cultura da soja, essa doença teve sua importância negligenciada por diversos anos, por aparecer normalmente nos estádios finais de desenvolvimento da cultura. Lehman et al. (1976) ressaltaram em seu estudo com soja, na safra de 1973/1974, que em 104 lavouras nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, 5% das plantas apresentavam infecção radicular por *M. phaseolina*.

Wrather e Koenning (2010) ratificaram em seu trabalho que a podridão-carvão em soja nos EUA causou perdas médias de produção em cerca de 27 milhões de bushels (~12.247.000 sacas) por ano, de 1996 a 2009. Na zona do Sahel da África Ocidental (incluindo Burkina Faso, Níger e Senegal), a podridão-carvão provoca uma perda média de rendimento de 10%, o que equivale a 30.000 toneladas de feijão-caupi, valor estimado em US\$ 146 milhões para o Níger e Senegal (NDIAYE, 2007). No entanto, quando as condições são favoráveis para o crescimento e desenvolvimento de *M. phaseolina*, infecções podem resultar em perdas totais de colheitas (JIMENEZ et al., 1983).

4.2. Lodo de esgoto: importância, produção e uso

A Organização das Nações Unidas (ONU) em 2010 estabeleceu que o acesso à água potável e ao sistema de saneamento básico é um direito essencial ao ser humano. Entretanto, o panorama mundial mostra que cerca de 2,4 bilhões de pessoas ainda estão vivendo sem saneamento adequado, ou seja, no ano de 2015 apenas 68% da população mundial tinha acesso a um sistema de saneamento apropriado (UNICEF e WHO, 2015).

O Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) divulgou que 48,6% da população brasileira tem acesso à coleta de esgoto, sendo este lançado em fossa rudimentar, rio, lago, mar, ou outro escoadouro. De acordo com o SNIS (2016), 40% dos esgotos do país são tratados, e observando a média das 100 maiores cidades brasileiras em tratamento de esgotos verifica-se apenas 50,26%. A região centro-oeste é a com melhor desempenho, com 46,37% do esgoto tratado, entretanto a média de esgoto tratado não atinge nem metade da população.

No Distrito Federal o sistema de coleta e tratamento de lodo de esgoto (LE) é de responsabilidade da Companhia de Saneamento Ambiental do DF (CAESB), cujo sistema de esgotamento opera com 5.169 km de redes e 15 estações de tratamento.

Aproximadamente 340 toneladas de LE são produzidas por dia nas estações de tratamento do DF (CAESB, 2016). Um destino adequado para esse produto representa interesse de toda a sociedade. As Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) têm a finalidade de promover um tratamento adequado dos resíduos líquidos domésticos e industriais, utilizando processos físicos, químicos ou biológicos, em conformidade com os padrões exigidos pela legislação ambiental, para que possam retornar a natureza sem ocasionar problemas ambientais e à saúde humana (CAESB, 2016).

O tratamento do esgoto promovido nas ETEs é dividido em quatro etapas: tratamento preliminar (pré-tratamento), tratamento primário, secundário e terciário. No tratamento preliminar se usam grades, peneiras ou caixas de areia para a retenção de resíduos maiores. O tratamento primário se caracteriza pela sedimentação dos sólidos em suspensão, formando o lodo primário, que será removido para dar continuidade ao tratamento. O secundário utiliza processo biológico, onde os microrganismos se alimentando da matéria orgânica (MO), converte-a em gás carbônico e água. E em caráter terciário, são retirados elementos específicos, como fósforo e nitrogênio, que em excesso prejudicam a qualidade da água resultante do processo de tratamento de esgoto. O uso de digestores no tratamento do lodo promove estabilização da MO e favorece a etapa posterior de desidratação ou desaguamento. Após a etapa de desidratação, o produto final do tratamento é chamado de biossólido, o qual deve ser encaminhado para destinação final. O alto teor de MO no LE e a presença de macro e micronutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, promovem a melhoria de propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (CÉZAR et al., 2012). Observando tais características do LE, seu uso em substituição ao adubo mineral pode favorecer o desenvolvimento de plantas, além da maior rentabilidade econômica quando se usa uma dose ótima (QUINTANA, 2006).

Além dos benefícios em áreas agrícolas, o LE também tem sido usado na recuperação de áreas degradadas, sendo uma das melhores alternativas para destinação final de tal material, que possui baixo custo, reutilização de nutrientes e menor dependência de fertilizantes químicos.

4.3. Biochar de lodo de esgoto: produção e uso agroambiental

Apesar do reconhecido papel do LE na fertilização de solos, a ocorrência de microrganismos patogênicos, somada à presença de metais potencialmente tóxicos restringem o uso do LE in natura a poucos destinos, sendo tal uso controlado por legislação específica, como a Resolução N° 375 de 2006 do Conselho Nacional do Meio

Ambiente (CONAMA, 2006). Quando usado de forma indiscriminada pode causar acúmulo de metais pesados nos solos, que podem ser absorvidos pelas plantas em quantidade suficiente para afetar negativamente o seu desenvolvimento e/ou a saúde dos consumidores (CHANG et al., 1997; YUAN et al., 2015). Uma forma de solucionar o problema da presença de patógenos é o tratamento térmico do LE. O tratamento térmico por pirólise promove a eliminação de patógenos e componentes orgânicos perigosos (CABALLERO et al., 1997), tendo como produto principal o biochar (BCH).

O BCH é um produto sólido, rico em carbono, obtido pelo aquecimento de biomassa sob condições controladas de oxigenação, isto é, por pirólise (SOHI, 2012), produzindo também um material líquido, o bio-óleo, e gases (H_2 , CO , CO_2 , CH_4 , C_2H_4 e C_2H_6) (VIEIRA, 2012). Diversas matérias primas podem ser utilizadas na produção de BCH, como biomassa lenhosa retirada da compostagem, resíduos de madeira provenientes da colheita florestal comercial, além de resíduos urbanos como o lodo de esgoto. Esta diversidade de matéria-prima utilizada sob diferentes condições resulta em produtos com propriedades variadas (HARTLEY et al., 2016; YUAN et al., 2015).

Segundo Downie (2009) a adição de BCH ao solo promove mudanças nas propriedades físicas do solo, alterando atributos como: agregação, porosidade e consistência, diâmetro dos poros, distribuição granulométrica, densidade, em função de sua maior área superficial específica. Com isso, as plantas podem apresentar maior desenvolvimento devido a maior disponibilidade de água na rizosfera. Pesquisas envolvendo BCH e seus benefícios quando aplicado ao solo são crescentes. Além das propriedades físicas, o BCH se destaca por apresentar um potencial de retenção de metais pesados em solos contaminados, contudo esta característica é dependente da matéria-prima utilizada e da temperatura de pirólise para sua produção (UCHIMIYA et al., 2011).

O BCH foi objeto de diversos estudos devido sua capacidade de gerar benefícios agroambientais, tais como: redução da perda de nutrientes por lixiviação (YUAN et al., 2016), adição de nutrientes disponíveis para as plantas (FARIA et al., 2017) e calagem do solo (DEENIK e COONEY, 2016). A interferência do BCH sobre propriedades químicas do solo tem garantido respostas fisiológicas nas plantas, sendo explicado pelo fato de o BCH aumentar os teores disponíveis de P, K, Ca, Mg e C, como também a eficiência no uso dos nutrientes (PETTER, 2010).

Clough et al. (2013) destacam a interação entre o BCH e o ciclo do N no solo. De acordo com estes autores, a aplicação de fertilizantes nitrogenados em combinação com

o BCH foi proposta para melhorar a sincronia temporal entre a demanda das culturas por N e a disponibilidade de N oriundo do solo, aumentando a eficiência de seu uso e redução dos impactos ao meio ambiente causados pelo excesso de adubação nitrogenada.

O BCH tem se destacado ainda por seu potencial no sequestro de carbono (KOOKANA et al., 2011), como também seu efeito na redução das emissões de gases de efeito estufa do solo, especialmente do óxido nitroso (SINGH et al., 2010; CAYUELA et al., 2013), fato verificado em BCHs oriundos de diferentes matérias-primas. Além dos benefícios já citados, pesquisas envolvendo o uso do BCH na área de fitopatologia vem crescendo nos últimos anos, sendo realizados estudos para avaliar sua capacidade no controle de doenças de plantas, principalmente as relacionadas com patógenos de solo. A efetividade no controle de tais doenças pelo BCH tem associado tal característica ao tipo de matéria-prima utilizada para sua produção, a temperatura de pirólise e concentração/quantidade de BCH utilizado no experimento (JAISWAL et al., 2015).

4.4. Biochar no controle de doenças de plantas

O acompanhamento da safra de grãos brasileira revelou estimativas de incremento de 1,1% na área de plantio para 2017/18, atingindo 61,5 milhões de hectares e produção de 227,95 milhões de toneladas (CONAB, 2018). A soja permanece como uma das principais culturas produzidas no país, alcançando 110,4 milhões de toneladas.

O cenário de doenças na cultura da soja no Brasil é alterado a cada ano, refletindo em aumento de severidade por algumas doenças, tanto de parte aérea, como nos caules e raízes. Doenças causadas por fungos de solo são de difícil controle aliado a uma quantidade restrita de cultivares de soja com resistência a essas doenças (ITO, 2013), entre as quais, destacam-se: mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*); morte por *Fusarium* (*Fusarium* spp.); podridão cinzenta do caule (*M. phaseolina*); podridão parda da haste (*Phialophora gregata*); Rizoctoniose, tombamento de plântulas e morte em reboleiras (*R. solani*); tombamento e murcha de *Sclerotium* (*Sclerotium rolfsii*).

O feijão é responsável por uma produção de 3,3 milhões de toneladas. O feijoeiro comum é afetado por inúmeras doenças que diminuem a produtividade da cultura (MAPA, 2016). Entre estas destacam-se o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), a mela (*Thanatephorus cucumeris*), a podridão-radicular-de-*Rhizoctonia* (*R. solani*), a podridão-radicular-seca (*Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*), a murcha-de-fusário (*F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*) e a podridão-cinzenta-do-caule (*M. phaseolina*).

As vendas anuais de agrotóxicos no Brasil entre 2000 e 2012 apresentaram um crescimento de 194,09%. No ano de 2014, as vendas de agrotóxicos e afins no Brasil já representava 508.556,84 toneladas de ingredientes ativos (IBAMA, 2014). Entretanto, os problemas causados ao ambiente pelos produtos químicos têm estimulado o estudo de novas tecnologias e o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças de plantas, considerados menos danosos ao meio ambiente (BROETTO et al., 2014).

A possibilidade do BCH, quando adicionado ao solo, provocar uma inibição ou mesmo suprimir fitopatógenos e, conseqüentemente, reduzir a severidade, ou até mesmo evitar o acometimento de doenças em plantas, tem despertado a atenção em diferentes estudos (COPLEY et al., 2015; JAISWAL et al., 2017; ROGOVSKA et al., 2017).

A primeira evidência que correlaciona a aplicação do BCH ao solo e uma possível capacidade de induzir ou de mediar a indução de resistência sistêmica em resposta a doenças causadas por patógenos foliares, foi descrita no experimento em casa de vegetação com as culturas de pimenta e de tomate (ELAD et al., 2010). Neste trabalho, os autores verificaram que as doenças causadas por *Botrytis cinerea* (mofo cinzento) e *Oidiopsis sicula* (oídio) foram reduzidas em parcelas com biochar de madeira de citrus.

Em um estudo realizado por George et al. (2016), foi relatado que BCHs produzidos a partir de diferentes matérias primas (madeira de *Pinus sylvestris*, casca de *P. sylvestris*, pellets produzidos a partir de madeiras de coníferas e cascas de trigo-vermelho) quando aplicados ao solo, com exceção do BCH de madeira de *P. sylvestris*, possuíam um efeito negativo sobre as taxas de infecção das raízes pelo nematoide *Pratylenchus penetrans*, especialmente o BCH de casca de trigo-vermelho. Pelo menos, dois dos BCHs aplicados (de casca de trigo-vermelho e o de casca de pinheiro) provavelmente induziram resposta de defesa na planta, quer por SAR (resistência sistêmica adquirida) ou ISR (resistência sistêmica induzida), em cenoura contra infecções por *P. penetrans*.

Mehari et al. (2015) avaliando o tomate / *Botrytis cinerea* verificaram que a indução de resistência mediada por BCH e a iniciação da expressão do gene relacionado com a defesa da planta era dependente do ácido jasmônico e correlacionado com a iniciação sistêmica de toda planta da rápida oxidação de resposta dependente de jasmonato. Estas características são específicas de ISR, normalmente envolvendo microrganismos benéficos da rizosfera. Conseqüentemente, o estudo demonstrou que o BCH favoreceu a colonização das raízes por organismos benéficos exercendo um papel essencial na indução de resistência em tomateiro contra a podridão cinzenta.

A matéria-prima e a temperatura de pirólise adotada no procedimento de produção do BCH são vistas como fatores que influenciam nas características/propriedades do produto. Jaiswal et al. (2014) avaliando BCHs preparados a partir de duas matérias-primas (madeira de eucalipto e resíduos de casa de vegetação), e produzidos a 350 e 600 °C, verificaram que, em geral, concentrações relativamente baixas melhoram o desempenho de crescimento de plantas, como também suprimem o “damping-off” causado por *R. solani*. Ainda neste trabalho, os autores verificaram que em concentrações mais elevadas o BCH é ineficaz, ou mesmo pode favorecer a incidência e gravidade da doença, em comparação com o controle, sendo a redução da doença afetada pelo tipo de matéria-prima. Houve uma interação significativa entre matéria-prima e concentração para a incidência de “damping-off” e outros parâmetros de doença, indicando que cada matéria-prima possui uma concentração ótima para controle de doenças.

Akhter et al. (2015) observaram que a resposta de crescimento de plantas de tomate e a supressão de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* com o uso do BCH é dependente do tipo de matéria-prima. Com base em estudos *in vitro*, esses autores verificaram sobre o crescimento e desenvolvimento de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, que alterações do solo com materiais orgânicos como os compostos e BCHs têm se mostrado capazes de alterar exsudatos radiculares de tomate, e essas alterações podem ter um papel essencial na determinação da resposta da planta ao estresse da doença. A aplicação de adubo e biochars no solo influencia a qualidade e composição dos exsudatos das raízes no que diz respeito aos seus efeitos sobre os fungos que vivem no solo.

4.5. *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos

O controle biológico tem se destacado por ser uma alternativa eficaz para o manejo de diferentes fitopatógenos. Os benefícios dessa estratégia de controle de doenças estão associados ao fato de ser um método seguro, não poluir e não causar desequilíbrio ambiental e, principalmente, viabilizar sistemas mais sustentáveis, permitindo plantios subsequentes com menores problemas fitopatológicos (SCUDELER e VENEGAS, 2012).

Uma das linhas de pesquisas que vêm sendo desenvolvidas através da adição de BCH ao solo está correlacionada às alterações na microfauna e os consequentes efeitos sobre o crescimento das plantas. Graber et al. (2010) observaram que em solos que receberam BCH houve um aumento de até duas unidades logarítmicas de *Trichoderma* spp. em relação ao solo controle (sem BCH).

Trichoderma está entre os mais estudados e utilizados como agentes de biocontrole de doenças vegetais em todo o mundo. Esses microrganismos de vida livre e altamente interativos no solo, nas superfícies radiculares e no interior dos tecidos vegetais (RAJENDIRAN et al., 2010) apresentam atividade antagônica a diferentes fungos fitopatogênicos. A atividade de biocontrole pode ocorrer indiretamente, competindo por espaço e nutrientes, modificando as condições ambientais, produzindo antibióticos, inativando as enzimas do patógeno ou, diretamente, mediante o parasitismo (BENÍTEZ et al., 2004), que envolve eventos sequenciais complexos, incluindo reconhecimento, penetração e subsequente morte do hospedeiro (MUKHERJEE et al., 2012).

Estudos demonstram que a eficácia do biocontrole por *Trichoderma* varia de acordo com o isolado adotado. Sain e Pandey (2016) descreveram que todos os isolados de *T. harzianum* utilizados no trabalho tinham um efeito antagonista sobre determinados agentes patogênicos ao tomateiro, como: *Pythium aphanidermatum*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *R. solani*, *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*, *Phytophthora infestans* e *Septoria lycopersici*. Os autores verificaram também que a aplicação de formulação em talco dos isolados de *T. harzianum* (10% de WP), como tratamento de sementes/aplicação ao solo e aplicação foliar, era eficaz para o tratamento das doenças selecionadas.

Khaledi e Taheri (2016) observaram em um experimento *in vitro* que isolados de *Trichoderma* spp. se destacaram por inibir o crescimento micelial de *M. phaseolina*, com capacidade inibitória podendo variar de 20,2 a 58,7% de acordo com isolado estudado, alcançando melhores resultados os de *T. harzianum*. Os resultados desse estudo indicam que os isolados de *T. harzianum* aparentemente produzem compostos voláteis e não voláteis que suprimem o crescimento do fitopatógeno.

Khalili et al. (2016) verificaram que diferentes isolados de *T. harzianum* quando pareado com *M. phaseolina* promovem inibição do fitopatógeno em até 72%, além de demonstrar um excepcional hiperparasitismo de tais colônias. Outro fator importante destacado no trabalho faz referência a produção de compostos voláteis por parte dos isolados de *T. harzianum*, que geram uma supressão do crescimento da *M. phaseolina*, a uma taxa que varia de 43,30 a 63,36% de acordo com o isolado estudado.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção e caracterização do Biochar

O BCH foi produzido a partir da biomassa de LE proveniente da estação de tratamento de esgoto da companhia de saneamento ambiental do Distrito Federal (CAESB), localizada na cidade do Gama, a 34 km do centro de Brasília, DF. Esta ETE utiliza o sistema de tratamento em nível terciário, no qual o LE é tratado em reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA), reator biológico e clarificador. O LE utilizado estava acondicionado em pátio de secagem e suas características estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Umidade, sólidos voláteis e cinzas do lodo de esgoto.

Parâmetro	Unidade	Valor
Umidade (65 °C)	g g ⁻¹	0,17
Sólidos voláteis	g g ⁻¹	0,45
Cinzas	g g ⁻¹	0,54

O BCH foi produzido em forno tubular elétrico (Linn Elektro Therm) a 300 e 500 °C (Figura 1), com taxa de aumento de temperatura igual a 11°C min⁻¹ e tempo de residência de 30 min. Essa etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Preservação da Qualidade da Madeira, situado na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília.

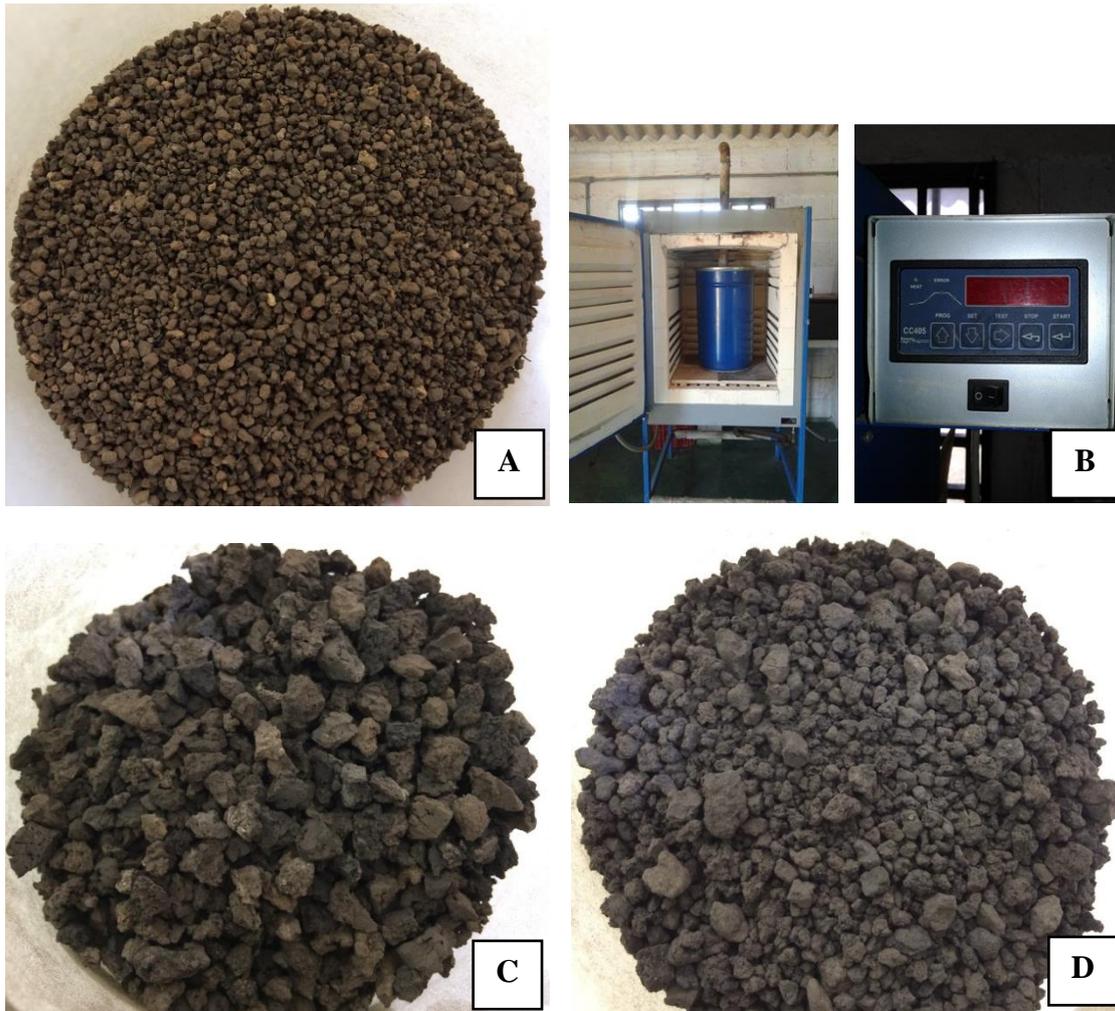


Figura 1. LE *in natura* (A), forno tubular elétrico (B), BCH 300 (C) e BCH 500 (D).

A caracterização físico-química do BCH é descrita na Tabela 2. As amostras de LE foram alocadas em um recipiente de metal adaptado ao espaço interno do forno que conta com um sistema de saída de gases e bio-óleo, e um mecanismo que evita o fluxo de oxigênio. O controle de temperatura durante a pirólise foi realizado com o uso de um termopar tipo K de penetração, modelo MTK-15, acoplado a um termômetro digital KT-160A.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do biochar produzido sob diferentes temperaturas de pirólise.

Propriedades	BC 300	BC 500
ASE (m ² g ⁻¹)	20,17	52,470
VP (ml g ⁻¹)	0,027	0,053
pH	5,8	6,5
CE (mS cm ⁻¹)	1,7	2,3
C (%)	23,4	19,0
N (%)	3,3	2,3
H (%)	3,6	1,7
C/N	7,0	8,1
H/C	0,2	0,1
Nitrato (mg kg ⁻¹)	17,513	5,838
Amônio (mg kg ⁻¹)	431,975	169,288

ASE: área superficial específica; VP: volume de poros; CE: condutividade elétrica; C: carbono total; N: nitrogênio total; H: hidrogênio; BC300: biochar a 300°C; BC500: biochar a 500°C.

5.2. Experimento 1 - Avaliação *in vitro* do Biochar no crescimento de *M. phaseolina*

O bioensaio foi desenvolvido no Departamento de Fitopatologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas – UnB. Inicialmente, foi realizado o preparo do meio de cultura a partir de BDA (Batata-Dextrose-Ágar) sintético. O meio de cultura foi formulado adotando-se 19,5 g de BDA sintético (50% da quantidade especificada pelo fabricante) em 1 litro de água destilada, sendo complementado com 20 g de Ágar.

Os BCHs foram macerados em almofarizes e, posteriormente passados em peneira com malha de 500 micrômetros. Após tal procedimento, o BCH foi adicionado ao erlenmeyer contendo o preparo do meio de cultura ainda líquido, adotando-se uma concentração de 2 g de BCH em 100 mL de BDA, e a partir disso, autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Com o resfriamento do meio à 50 °C, acrescentou-se o Rosa de Bengala e em seguida, verteu-se em placas de Petri (20 mL de meio de cultura / placa).

A repicagem dos fungos foi realizada a partir de colônias com 39 dias, utilizando disco de 5 mm de diâmetro por placa, com objetivo de avaliar o crescimento micelial de dois isolados (424 e 428) de *M. phaseolina*. Os isolados foram selecionados ao final do ciclo de soja, na Estação Experimental da Fazenda Esmeralda, localizada no município de Ipameri, Goiás. O experimento contou com seis repetições, e foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2 (três meios de cultura e dois isolados do patógeno). Dessa forma, foram estabelecidos seis tratamentos da interação de cada isolado de *M. phaseolina* com diferentes meios de cultura: BDA; BDA + BCH 300 e BDA + BCH 500.

As placas com os referidos tratamentos foram acondicionadas em incubadora Eletrolab (modelo EL202) à temperatura média de 30 °C durante as 72 horas iniciais após repicagem dos fungos, sendo posteriormente alocadas em uma sala de armazenamento dentro do laboratório, em temperatura ambiente. As medições do diâmetro das colônias foram realizadas 72, 144 e 216 horas após montagem do experimento.

Um novo teste envolvendo os isolados e tratamentos supracitados foi repetido, utilizando colônias com 63 dias para repicagem do fitopatógeno, entretanto, as placas com os ensaios foram alocadas apenas na sala de armazenamento dentro do laboratório, em temperatura ambiente. O experimento contou com quatro repetições e avaliações diárias do diâmetro das colônias após 72 horas da montagem do mesmo.

5.3. Experimento 2 – Avaliação de patogenicidade dos isolados de *M. phaseolina*

O teste de patogenicidade dos isolados de *M. phaseolina* foi realizado em cultivares de milho, soja, feijão e algodão. O ensaio foi conduzido na Estação Experimental de Biologia da UnB. O experimento avaliou os isolados 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 e 430 de *M. phaseolina* quanto a patogenicidade dos mesmos a cultivares de milho, soja, feijão e algodão. Os isolados foram selecionados ao final do ciclo de soja, na Estação Experimental da Fazenda Esmeralda, localizada no município de Ipameri, Goiás.

No estudo foram utilizadas sementes de milho convencional (cv. 30F53H); sementes de soja convencional (cv. P98C81); sementes de feijão (*P. vulgaris*, cv. BRS Estilo); e sementes de algodão (cv. DP1536B2RF). As cultivares escolhidas são amplamente utilizadas no centro-oeste, apresentando alto rendimento, contudo não há descrição de resistência à *M. phaseolina*.

A inoculação das cultivares com os isolados do fungo *M. phaseolina* abordou dois diferentes métodos e períodos. A primeira inoculação realizada aos cinco dias anteriores à semeadura das cultivares, por meio da infestação do solo (50 microesclerócios/g de solo). Os microesclerócios foram obtidos de placas de Petri contendo os isolados crescidos em meio de cultura BDA, elaborando-se uma suspensão por meio da adição de água esterilizada e agitação do conteúdo. O segundo método de inoculação foi realizado via imersão de sementes em suspensão de microesclerócios (73 microesclerócios/mL), por 10 minutos. Posteriormente, semeadas em vasos, sendo o milho e o algodão conduzidos em vasos de 4 L e, a soja e o feijão em vasos de 2,5 L. Adotaram-se 5 sementes por vaso, em solo previamente autoclavado.

O experimento (Figura 2) foi realizado em delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, e avaliações que iniciaram no décimo dia após semeadura das cultivares, adotando-se um regime de observações de 48 em 48 horas. As avaliações das plantas constaram o número de sementes germinadas, número de plantas sobreviventes e, massa fresca e massa seca proveniente da planta (parte aérea + raiz).



Figura 2. Primeiro dia após semeadura (A) e sexagésimo dia após semeadura (B).

5.4. Experimento 3 - Reação de *M. phaseolina* a concentrações do Biochar 500 °C

O bioensaio foi desenvolvido no Departamento de Fitopatologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas – UnB. O meio de cultura de BDA foi formulado a uma concentração de 50%, ou seja, 19,5 g de BDA sintético em 1 L de água destilada e complementado com 20 g de Ágar, seguindo os mesmos padrões do experimento 1.

O BCH (500 °C) foi macerado em almofariz e, posteriormente passado em peneira com malha de 500 µm. Foram testadas diferentes concentrações do BCH, sendo o tratamento com 0 g de BCH / 100 mL de BDA definido como testemunha. As concentrações estudadas foram: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 (g de BCH / 100 mL de BDA). Os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri (20 mL / placa). Cada tratamento possuía quatro repetições. Os isolados da *M. phaseolina* (424, 425 e 428) foram repicados com perfurador, com um disco (5mm) por placa. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

As avaliações iniciaram 24 horas após a montagem do experimento, sendo realizadas medições diárias do crescimento micelial (mm), por um período de quatro dias.

5.5. Experimento 4 – Pareamento de culturas (*M. phaseolina* x *T. harzianum*)

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Fitopatologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas – UnB. O meio de cultura de BDA foi formulado a uma

concentração de 50%, ou seja, 19,5 g de BDA sintético em 1 litro de água destilada e complementado com 20 g de Ágar, seguindo os mesmos padrões do experimento 1.

O BCH (500 °C) foi macerado em almofariz e, posteriormente passado em peneira com malha de 500 micrometros. Adotou-se a concentração de 0,5% para esse ensaio com base nos resultados do experimento 3, ou seja, por apresentar melhor resposta de inibição ao crescimento micelial dos isolados de *M. phaseolina* testados.

O fungo *T. harzianum* (Tricodermil®) linhagem 1306 foi desenvolvido em meio de cultura e repicado para placas aonde foram realizados os pareamentos. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias de *T. harzianum* e de *M. phaseolina*, ambos com três dias de crescimento em BDA.

Os tratamentos deste experimento foram: *M. phaseolina* em BDA (controle); *T. harzianum* em BDA (controle); *M. phaseolina* em BDA + BCH; *T. harzianum* em BDA + BCH; *M. phaseolina* x *T. harzianum* em BDA; *M. phaseolina* x *T. harzianum* em BDA + BCH. Foram avaliados os isolados 424, 425 e 428 de *M. phaseolina*.

As avaliações iniciaram-se 24 horas após a montagem do experimento, sendo realizadas medições diárias do crescimento micelial, por um período de quatro dias. As medições foram executas com o uso de régua milimétrica. O experimento contou com seis repetições, em delineamento inteiramente casualizado (Figura 3).

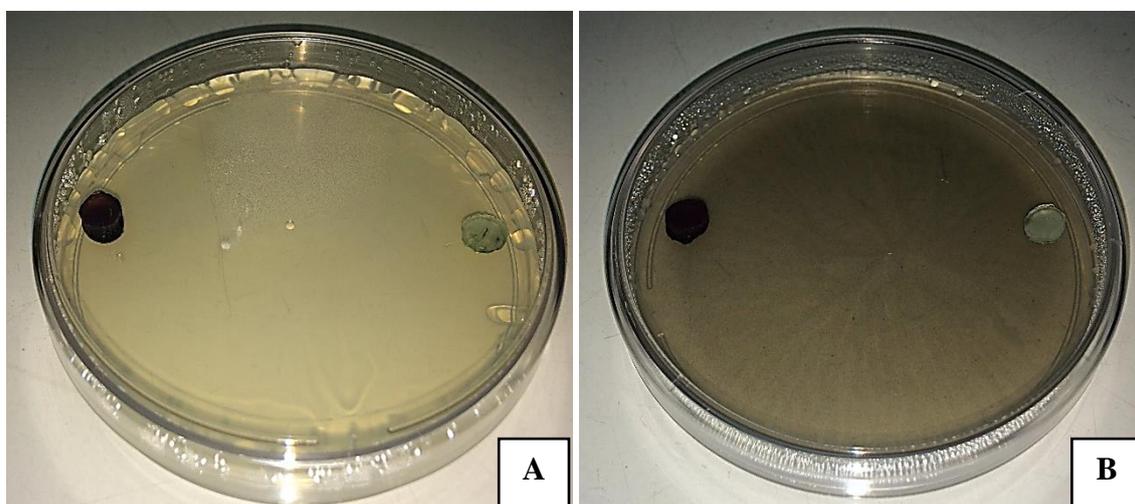


Figura 3. *M. phaseolina* x *T. harzianum* em BDA (A) e *M. phaseolina* x *T. harzianum* em BDA + BCH (B).

Nesse ensaio foram avaliadas características de crescimento das colônias de acordo com a escala proposta por Bell et al. (1982), sendo: 1) o antagonista cresce por toda a placa de Petri; 2) o antagonista cresce sobre 2/3 da placa; 3) o antagonista e patógeno crescem até metade da placa; 4) o patógeno cresce sobre 2/3 da placa; e, 5) o

patógeno cresce por toda a placa de Petri. No experimento se avaliou o comportamento dos isolados 424, 425 e 428 de *M. phaseolina* a baixas concentrações de BCH (0% e 0,5%), a capacidade de biocontrole que *T. harzianum* (1306), exerceu sobre o patógeno, e, o efeito do BCH sobre o microrganismo de controle biológico e seu efeito sinérgico.

5.6. Experimento 5 – Uso do biochar em plantas de soja e feijão, cultivadas em vaso

O estudo foi conduzido na Estação Experimental de Biologia da UnB, e foi avaliado o desenvolvimento de cultivares de soja e feijão sob condições de vaso em telado, a partir do uso de BCH de LE produzido a 500 °C, e passado em peneira com malha de 8 mm (Figura 4). O experimento objetivou avaliar o controle de *M. phaseolina* em decorrência do uso do BCH e da associação BCH + *T. harzianum* quando aplicados ao solo, e os ganhos agrônômicos associados a esses tratamentos.



Figura 4. Montagem do experimento (A) e tratamentos com aplicação de BCH (B).

Para o ensaio foram utilizadas sementes de soja convencional, cultivar P98C81; e sementes de feijão (*P. vulgaris*), cultivar BRS Estilo. A escolha das cultivares está de acordo com o que foi estabelecido no experimento 2. A semeadura das espécies vegetais ocorreu em vasos de 4 L com solo autoclavado, colocando-se 5 sementes por vaso.

A inoculação do patógeno ocorreu seguindo o método descrito no experimento 2. A primeira inoculação sendo realizada cinco dias anteriores à semeadura das cultivares, por meio da infestação do solo (50 microesclerócios / g de solo). Já a segunda inoculação via imersão de sementes em suspensão de microesclerócios (73 microesclerócios / mL) e uma exposição das sementes ao patógeno por 60 minutos. Os tratamentos utilizados foram: 1) espécie vegetal (controle); 2) espécie vegetal (EV) + *M. phaseolina*; 3) EV + BCH; 4) EV + BCH + *M. phaseolina*; 5) EV + *T. harzianum*; 6) EV + *T. harzianum* + *M. phaseolina*; 7) EV + *T. harzianum* + BCH; 8) EV + *T. harzianum* + BCH + *M. phaseolina*.

Trichoderma harzianum foi aplicado ao solo em dois momentos, oito dias anteriores à semeadura das espécies vegetais e no momento do plantio, estabelecendo uma aplicação de 40 mL por vaso da suspensão de conídios de *T. harzianum* (1×10^6 conídios mL^{-1}) sendo utilizada água destilada-esterilizada para tal atividade.

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com 4 repetições. As avaliações iniciaram ao oitavo dia após semeadura das cultivares, adotando-se um regime de observações de 48 em 48 horas (Figura 5). As avaliações das plantas constaram o número de sementes germinadas (NSG), o número de plantas sobreviventes (NPS), número de vagens, massa fresca e massa seca por vaso.

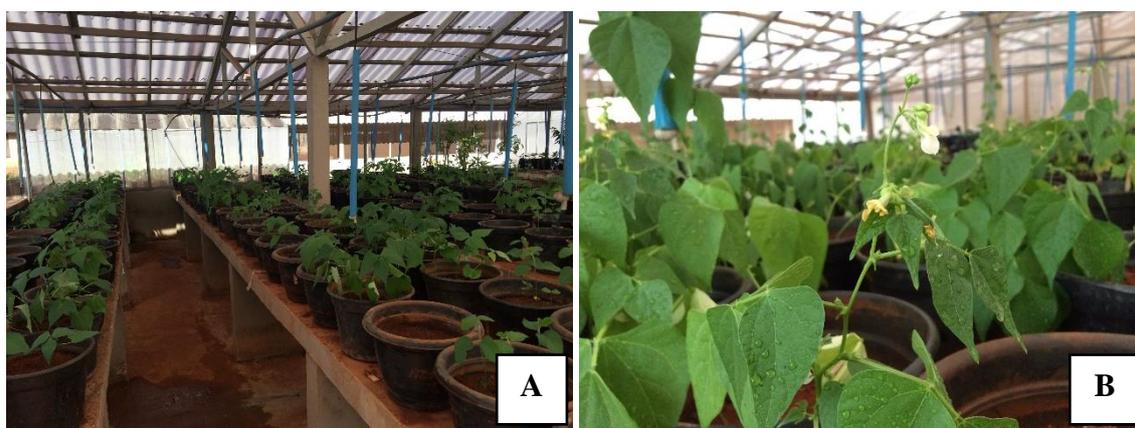


Figura 5. Vigésimo segundo dia após semeadura (A) e formação de flores e vagens em plantas de feijão (B).

O NSG foi estabelecido 13 dias após semeadura para ambas espécies de plantas, caracterizado pelo número de plântulas emergentes por vaso. O NPS por vaso ao fim do experimento foi contabilizado no 90º dia após semeadura para a cultura do feijão e, 100º dia para a soja. Já, o número de vagens foi anotado juntamente com o número de plantas sobreviventes ao fim do experimento. Essa variável foi determinada por vaso, considerando vagens plenamente formadas por cultura estudada em diferentes tratamentos. As plantas de soja e feijão coletas do ensaio em casa de vegetação foram submetidas a avaliação de massa fresca, considerando parte aérea e raiz. Posteriormente, tais plantas foram destinadas a secagem em estufa de circulação forçada, a 60 °C, por 48 horas. Após 48 horas, verificou-se que a massa (g) das plantas das duas espécies havia estabilizado, e conseqüentemente, foi realizada uma nova avaliação, representando a massa seca proveniente de parte aérea mais raiz.

5.7. Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o programa IBM SPSS Statistics, versão 23.0 (IBM, 2015). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), com diferença significativa avaliada pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$). Os gráficos foram desenvolvidos através do programa SigmaPlot, versão 10.0 (SYSTAT SOFTWARE, 2006).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Experimento 1

Os resultados obtidos avaliando o crescimento micelial de isolados de *M. phaseolina* (424 e 428), sob dois meios de cultura (sem biochar e, com biochar a 2%), evidenciaram que os fungos apresentavam maior velocidade de crescimento em comparação aos tratamentos em que meios com apenas BDA (Figura 6).

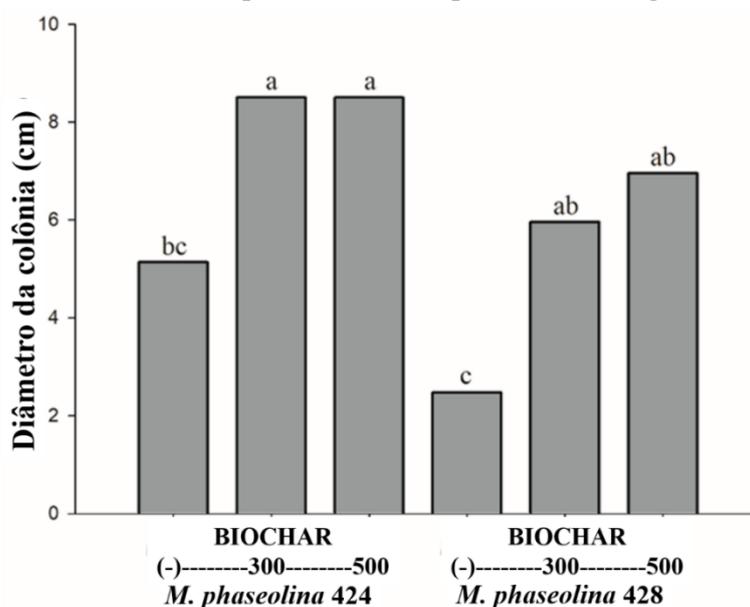


Figura 6. Crescimento micelial *in vitro* dos isolados 424 e 428 de *Macrophomina phaseolina* na presença de biochars obtidos a 300 (300) e 500 °C (500). Letras iguais indicam ausência de diferença significativa (Teste de Duncan, $p < 0,05$).

A medição do crescimento micelial dos isolados de *M. phaseolina* apontou para resultados semelhantes em velocidade de crescimento do isolado 424 em comparação com o 428, quando os mesmos foram submetidos ao crescimento em meios de cultura iguais. Definindo o tipo de BCH como parâmetro de avaliação para cada isolado, ficou

evidenciado que BCHs produzidos a 300 °C e 500 °C na concentração de 2%, apesar de estimularem o crescimento da *M. phaseolina*, não apresentaram distinção entre si.

You et al. (2011) observaram que o aumento de salinidade no meio de cultura BDA, proporcionado pela adição de NaCl + CaSO₄ ou CaSO₄, estimulou o desenvolvimento de dois isolados de *M. phaseolina*. Os autores também verificaram que o aumento da salinidade do solo estimula a infecção. Figueiredo et al. (2017) descreveram o processo de pirólise como responsável pela diminuição da condutividade elétrica (CE) observada em BCHs em comparação com o LE *in natura*. Entretanto, BCHs produzidos a 500 °C apresentam valores superiores de CE em relação aos produzidos em menores temperaturas. O possível aumento na CE do meio de cultura BDA após adição de biochar de lodo de esgoto pode estar relacionado ao estímulo do crescimento micelial dos isolados 424 e 428 de *M. phaseolina* observado no experimento.

6.2. Experimento 2

Os indicadores agronômicos avaliados como a germinação, sobrevivência de plântulas, massa fresca e massa seca, para as culturas do milho e do algodão, não foram afetados pela maioria dos isolados quando comparados as testemunhas (não inoculadas = 0). Por isso, os resultados para essas culturas não foram apresentados no presente trabalho. Somente o isolado 428 de *M. phaseolina* reduziu a sobrevivência do feijão (Figura 7). Contrário ao que se esperava, alguns isolados (423, 426, 428, 429 e 430) promoveram maior porcentagem de germinação, comparados ao controle ($p < 0,05$).

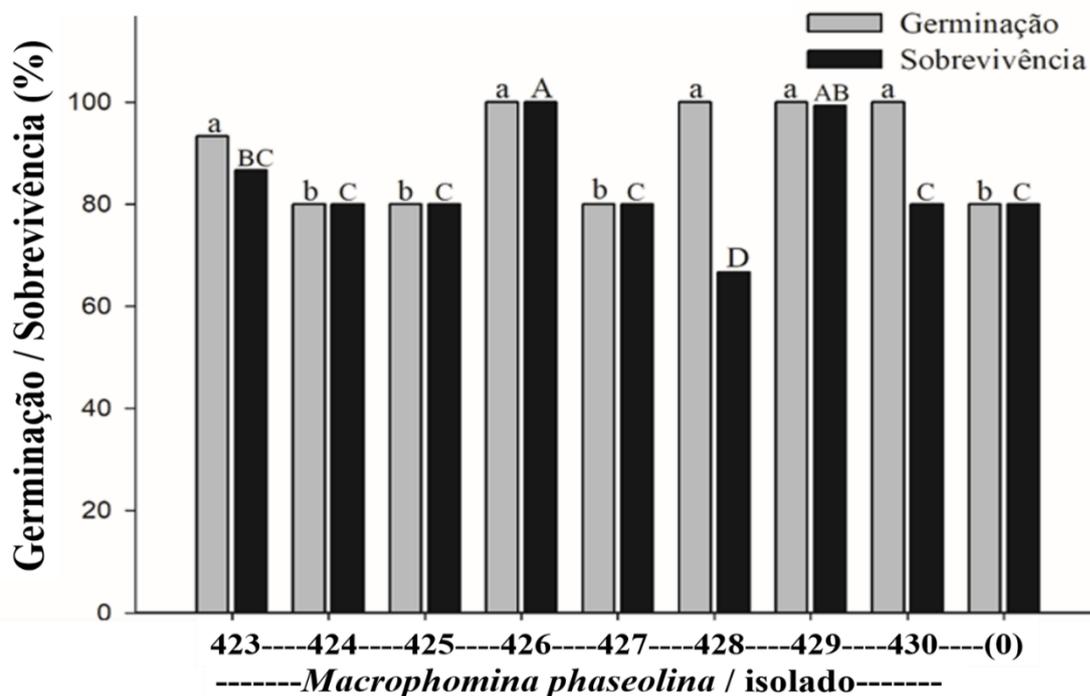


Figura 7. Porcentagem de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) germinadas e de plantas sobreviventes, inoculadas com isolados (423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 e 430) de *Macrophomina phaseolina*. (0) = testemunha não inoculada. Letras iguais, minúsculas (germinação) e maiúsculas (sobrevivência), indicam ausência de diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

Marcenaro e Valkonen (2016) avaliando a patogenicidade de isolados de fungos da cultura do feijão comum na Nicarágua, detectaram *M. phaseolina* em três das quatro localidades estudadas. Os testes realizados pelos autores com feijões de lima (*Phaseolus lunatus*) demonstraram que dos 14 isolados identificados, 10 foram patogênicos à cultura.

À exceção dos isolados 424 e 428, os demais reduziram a massa fresca em plantas (Figura 8). Já, os isolados 425, 426 e 427 reduziram a massa seca em plantas.

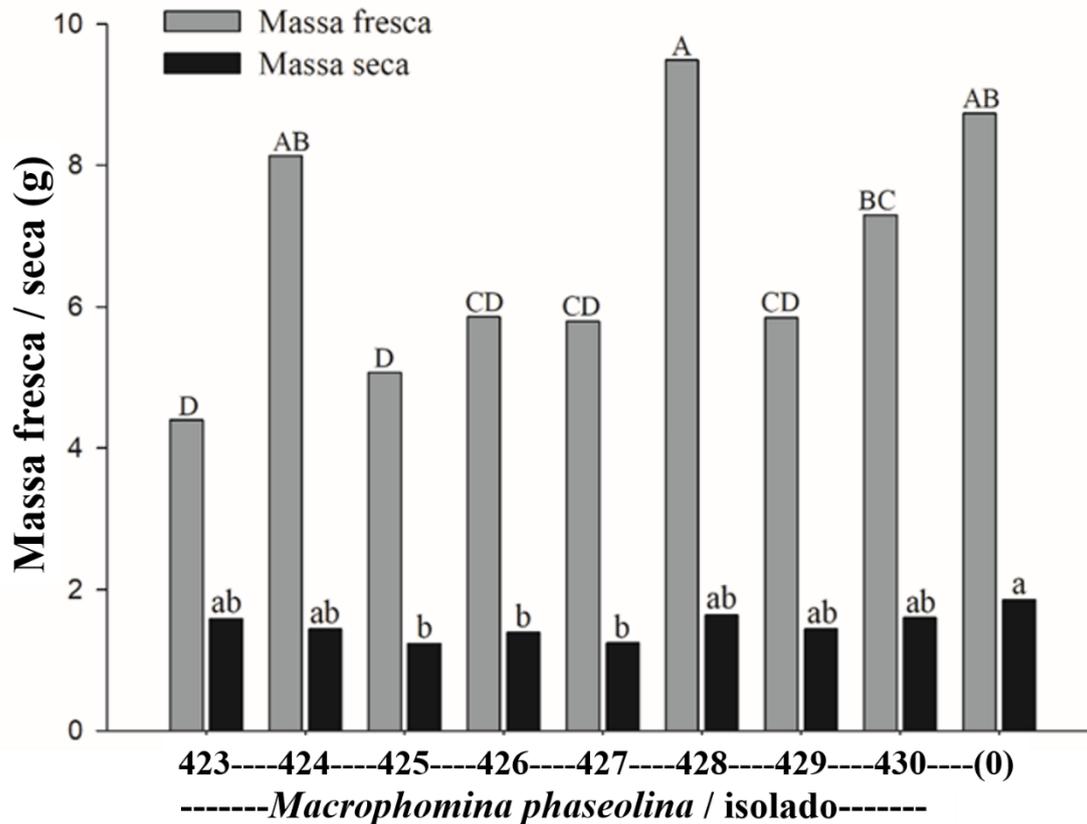


Figura 8. Massa fresca (g) e massa seca (g) das plantas de feijão comum inoculadas com isolados de *Macrophomina phaseolina*. (0) = testemunha não inoculada. Letras iguais, maiúsculas (Massa fresca) e minúsculas (Massa seca), indicam ausência de diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

A inoculação de plantas de soja com os isolados 423, 425 e 429 de *M. phaseolina* foi responsável por reduzir a germinação em tais plantas, fato não ocorrente para os demais isolados (Figura 9). Utilizando a testemunha como parâmetro de comparação para porcentagem de sobrevivência de plantas de soja fica explícito que os isolados 424, 426, 427, 428 e 430 são responsáveis pelas maiores reduções observadas no experimento.

Khazada et al. (2012) demonstraram que a inoculação de quiabo com *M. phaseolina* afetou o crescimento, a germinação e mortalidade em comparação com as plantas não inoculadas. Os resultados obtidos pelos autores ressaltam que o efeito deletério ocasionado pelo patógeno pode ser observado em diferentes métodos de inoculação (Na semente ou infestação do solo). Entretanto, a infestação do solo com microesclerócios resultou em menor germinação, aliada a uma maior mortalidade e menor crescimento de planta quando comparados com a inoculação via semente.

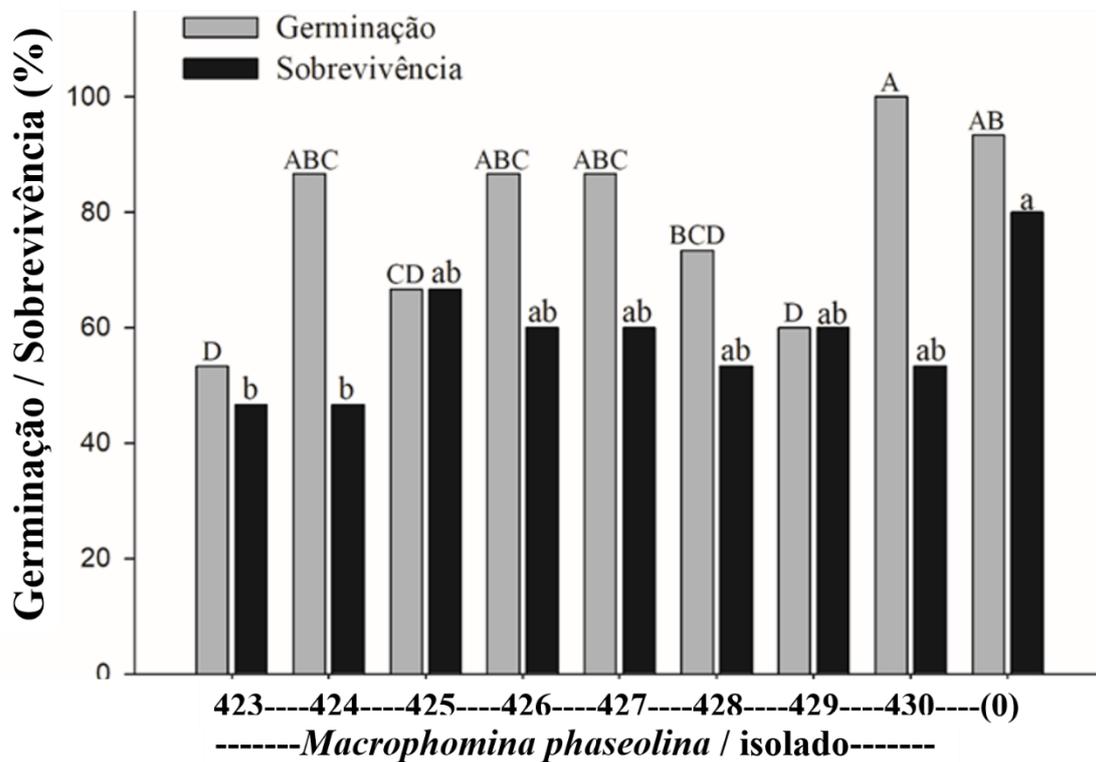


Figura 9. Porcentagem de sementes de soja (*G. max*) germinadas e de plantas sobreviventes quando inoculadas com isolados de *Macrophomina phaseolina*. (0) = testemunha não inoculada. Letras iguais, maiúsculas (Germinação) e minúsculas (Sobrevivência), indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

Os isolados 424 e 430 foram responsáveis pelas maiores reduções de plantas provenientes da germinação (Figura 9). Os isolados 425 e 429 não expressaram efeito de mortalidade em plantas quando avaliadas ao fim do experimento. Os isolados 423, 426 e 430 ocasionaram redução de massa fresca em plantas de soja (Figura 10), contrário do que ocorre para os demais inóculos. Os mesmos isolados apresentaram menores valores de massa seca em relação a testemunha (sem inóculo), evidenciando o efeito deletério que tais fitopatógenos exercem sobre a desenvolvimento da cultura.

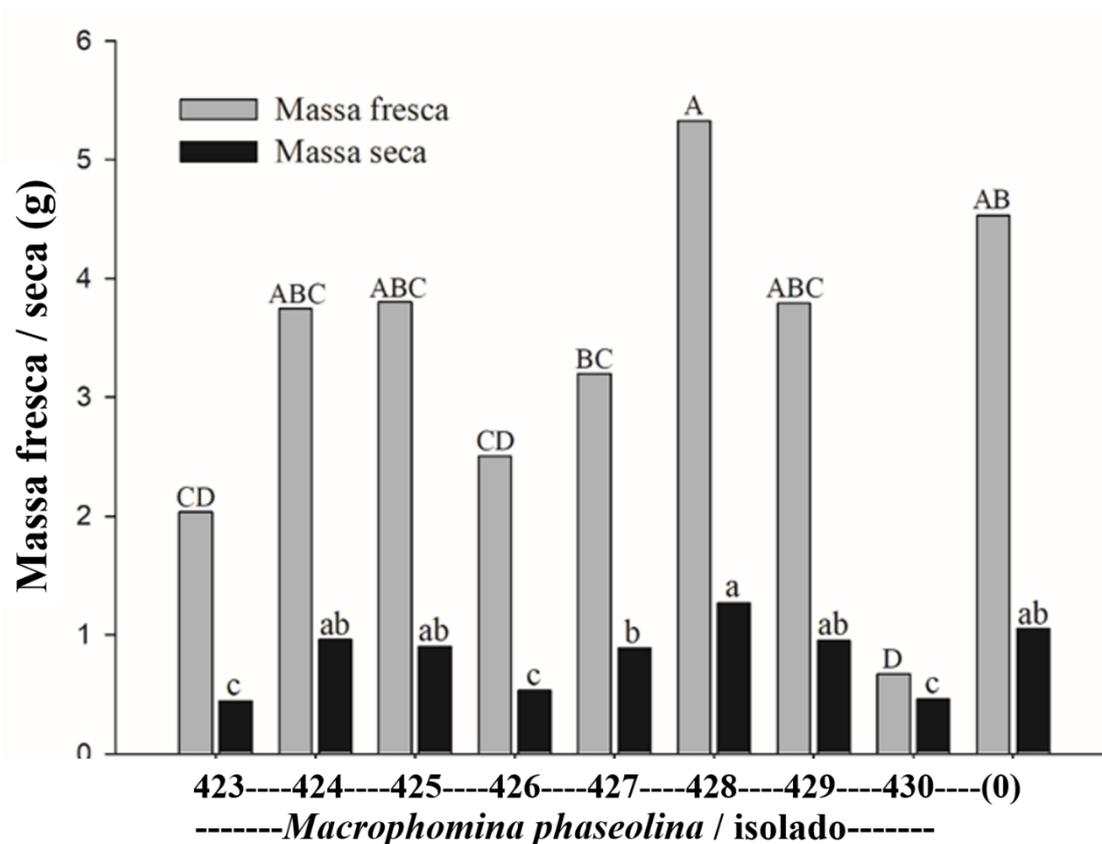


Figura 10. Massa fresca (g) e massa seca (g) das plantas de soja inoculadas com diferentes isolados de *Macrophomina phaseolina*. (0) = testemunha não inoculada. Letras iguais, maiúsculas (Massa fresca) e minúsculas (Massa seca), indicam ausência de diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

A inoculação de fava (*Vicia faba*) com *M. phaseolina* ocasionou atrofia da parte aérea e raiz em 22 e 18%, respectivamente, além de murcha progressiva, morte prematura, perda de vigor e podridão radicular (KUMARI et al., 2017).

6.3. Experimento 3

A mensuração do crescimento micelial do isolado 424 do fungo *M. phaseolina* estabeleceu que o menor crescimento do fitopatógeno ocorreu na concentração de 0% (testemunha) e 0,5% de biochar (Tabela 3). O bioensaio *in vitro* demonstrou que concentrações mais elevadas de biochar 500 °C aplicadas ao meio de cultura para crescimento do fitopatógeno foram responsáveis pelo maior crescimento do mesmo. Ou seja, a exposição do isolado 424 de *M. phaseolina* a elevadas concentrações de biochar de LE produzido a 500 °C tem se destacado por estimular o crescimento do fungo em condições *in vitro* quando comparado com menores concentrações.

O isolado 424 submetido ao crescimento em meio de cultura com biochar, na concentração 0,5%, não diferiu do observado na testemunha, ou seja, o contato com biochar de LE não estimulou o crescimento micelial do fungo. Copley et al. (2015) observaram que o biochar de casca de madeira produzido a 700 °C, quando incorporado em diferentes concentrações (1, 3 e 5%) ao meio de cultura, aumenta significativamente a extensão linear e a taxa de crescimento de *Rhizoctonia solani* em comparação com meio de cultura sem adição de biochar, resultados obtidos 12 horas após montagem do experimento. Tais autores atribuíram o aumento da taxa de crescimento das hifas de *R. solani* e de mudanças em seu perfil metabólico a vários compostos orgânicos presentes no extrato de biochar de casca de madeira que poderiam ser metabolizados pelo fitopatógeno.

Tabela 3. Crescimento micelial (cm) de *Macrophomina phaseolina* (424) em diferentes concentrações de biochar (500 °C), em horas após montagem do experimento.

Biochar [%]	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	168 horas
[0]	0,65 a	1,83 b	3,13 d	3,36 e	5,92 c
[0,5]	0,50 b	1,28 c	2,68 e	3,14 e	6,17 c
[1,0]	0,65 a	2,53 a	5,70 b	7,00 b	8,50 a
[2,0]	0,50 b	2,29 a	4,03 c	4,55 d	7,08 b
[5,0]	0,55 b	2,47 a	4,35 c	5,46 c	8,50 a
[10,0]	0,50 b	2,34 a	6,83 a	8,50 a	8,50 a

[0] = testemunha; [0,5] = meio de cultura com 0,5% de biochar 500 °C; [1,0] = meio de cultura com 1,0% de biochar 500 °C; [2,0] = meio de cultura com 2,0% de biochar 500 °C; [5,0] = meio de cultura com 5,0% de biochar 500 °C; [10,0] = meio de cultura com 10,0% de biochar 500 °C. Letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

O crescimento dos isolados 425 e 428 de *M. phaseolina* avaliados neste experimento está apresentado nas tabelas 4 e 5, respectivamente. A avaliação de crescimento dos isolados 425 e 428 de *M. phaseolina* apontou para uma funcionalidade de controle direto do fitopatógeno desempenhado pelo biochar de LE produzido a 500 °C, adotando-se como concentração ótima para tal finalidade a de 0,5%. Tal concentração promoveu uma inibição de crescimento micelial dos isolados, reduzindo sua velocidade de crescimento em meio de cultura, quando comparados com a testemunha.

Tabela 4. Crescimento micelial (cm) de *Macrophomina phaseolina* (425) em diferentes concentrações de biochar (500 °C), em horas após montagem do experimento.

Biochar [%]	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	168 horas
[0]	0,50 b	1,87 b	2,45 bc	3,32 c	6,50 b
[0,5]	0,50 b	0,90 c	1,55 c	1,95 c	4,25 c
[1,0]	0,67 a	2,12 ab	3,57 b	5,35 b	8,50 a
[2,0]	0,57 b	1,84 b	3,83 b	7,38 a	7,83 a
[5,0]	0,50 b	1,82 b	5,60 a	7,79 a	8,17 a
[10,0]	0,50 b	2,38 a	5,67 a	8,50 a	8,50 a

[0] = testemunha; [0,5] = meio de cultura com 0,5% de biochar 500 °C; [1,0] = meio de cultura com 1,0% de biochar 500 °C; [2,0] = meio de cultura com 2,0% de biochar 500 °C; [5,0] = meio de cultura com 5,0% de biochar 500 °C; [10,0] = meio de cultura com 10,0% de biochar 500 °C. Letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan (p<0,05)].

Jaiswal et al. (2017) observaram em ensaios in vitro que biochars produzidos a partir de madeira de eucalipto (600 °C) e de restos de cultura de pimenta (350 °C), quando adicionados em diferentes concentrações (0; 0,5; 1; e 3%) ao meio de cultura, não ocasionaram inibição ao crescimento micelial do fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* em comparação com o controle não modificado (sem biochar), indicando que para o patossistema testado o efeito direto do biochar não pôde ser considerado como um mecanismo de supressão de doença.

Tabela 5. Crescimento micelial (cm) de *Macrophomina phaseolina* (428) em diferentes concentrações de biochar 500 °C, em horas após montagem do experimento.

Biochar [%]	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	168 horas
[0]	0,50 a	0,97 a	1,43 b	1,52 b	4,75 c
[0,5]	0,50 a	0,93 a	1,13 b	1,87 b	3,15 d
[1,0]	0,50 a	0,93 a	1,43 b	1,62 b	3,17 d
[2,0]	0,50 a	0,90 a	3,17 a	6,00 a	8,33 a
[5,0]	0,50 a	0,90 a	1,58 b	2,30 b	6,22 b
[10,0]	0,50 a	0,90 a	1,20 b	1,72 b	8,08 a

[0] = testemunha; [0,5] = meio de cultura com 0,5% de biochar 500 °C; [1,0] = meio de cultura com 1,0% de biochar 500 °C; [2,0] = meio de cultura com 2,0% de biochar 500 °C; [5,0] = meio de cultura com 5,0% de biochar 500 °C; [10,0] = meio de cultura com 10,0% de biochar 500 °C. Letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan (p<0,05)].

Os três isolados de *M. phaseolina* avaliados neste bioensaio apresentaram respostas similares quando submetidos ao crescimento em meio de cultura com diferentes concentrações de biochar de LE. Foi demonstrado que baixas concentrações de biochar (0,5%) no meio de cultura promove uma inibição deste fitopatógeno, fato contrário ocorre quando se adotam elevadas concentrações, que geram um aumento de velocidade de crescimento micelial do fungo, ou seja, estimula seu desenvolvimento quando o mesmo é submetido a tais condições *in vitro*.

6.4. Experimento 4

A avaliação periódica do crescimento micelial do isolado 424, submetido aos tratamentos supracitados, ratificou a capacidade de controle direto promovida pelo biochar produzido a 500 °C e utilizado em baixas concentrações no meio de cultura (Figura 11), demonstrando que o maior crescimento do fungo está associado ao tratamento que possui apenas o meio de cultura BDA.

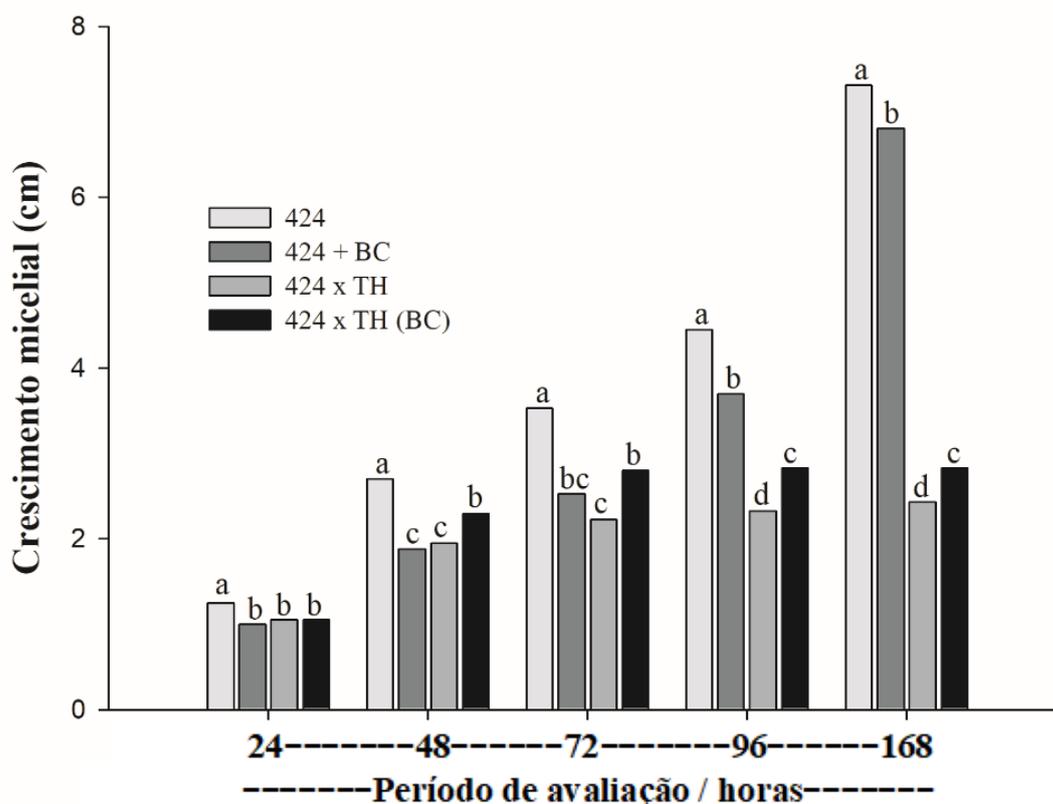


Figura 11. Pareamento de culturas [*M. phaseolina* (424) x *T. harzianum* (linhagem 1306)] em meio de cultura sem biochar e com biochar [0,5%]. Avaliação da *M. phaseolina* em horas após montagem do experimento. (424 - isolado 424; BC - biochar 500 °C; TH - *T. harzianum*). Letras iguais indicam que não há diferença significativa para cada período [Teste Duncan ($p < 0,05$)].

A capacidade e a efetividade associadas ao uso do *T. harzianum*, linhagem 1306 para controle do isolado 424 ficam evidenciadas a partir da quarta avaliação (96 e 168 horas), que demonstrou uma paralisação do crescimento micelial do fungo *M. phaseolina*, o que não ocorre quando o mesmo não está em contato com tal microrganismo de controle biológico.

Ramezani (2008) demonstrou a eficiência de biocontrole *in vitro* exercida por quatro diferentes espécies de *Trichoderma* sobre o fungo *M. phaseolina*, ocasionando uma inibição do crescimento do fitopatógeno. O experimento evidenciou o *T. harzianum* por proporcionar a maior atividade antagonista em relação aos demais agentes de biocontrole, o que favoreceu a uma zona de inibição de 18,20%. É citado no trabalho que o efeito inibitório gerado por esses fungos contra *M. phaseolina* é provavelmente devido a competição e/ou antibiose.

O pareamento do *T. harzianum*, linhagem 1306, com o isolado 425 de *M. phaseolina* (Figura 12) resultou em evidente inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. Nesse ensaio, observa-se a grande capacidade do *T. harzianum* como agente de controle biológico, sendo realçado que sua efetividade de controle independe do meio de cultura utilizado, ou seja, a utilização de biochar 500 °C juntamente com BDA não interferiu em sua capacidade de controle.

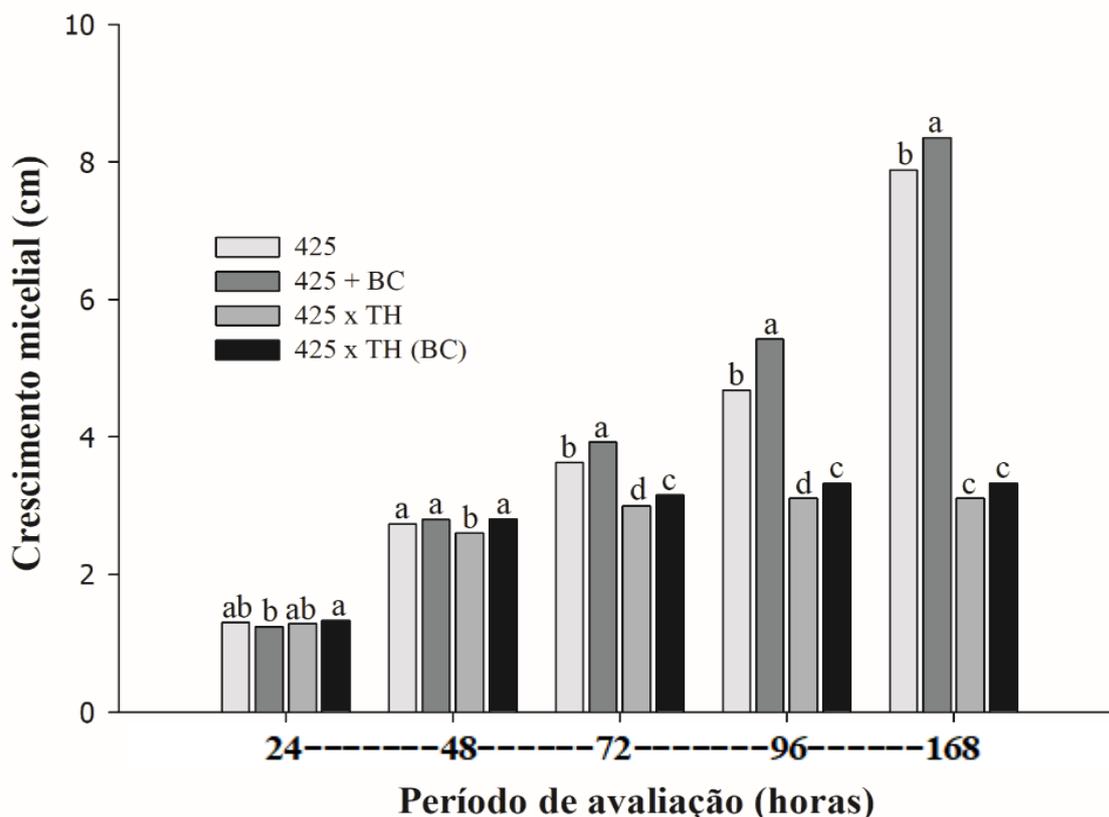


Figura 12. Pareamento de culturas [*M. phaseolina* (425) x *T. harzianum* (linhagem 1306)] em meio de cultura sem biochar e com biochar [0,5%]. Avaliação da *M. phaseolina* em horas após montagem do experimento. (425 - isolado 425; BC – biochar 500 °C; TH – *T. harzianum*). Letras iguais indicam que não há diferença significativa para cada período [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

Em um estudo mais recente, Mendoza et al. (2015) observaram que o mecanismo de controle biológico existente do *Trichoderma* sobre o fungo *M. phaseolina* se baseou em três atividades antagônicas: através da competição, da antibiose e por meio do hiperparasitismo. A competição caracterizou-se por ambas as espécies de *Trichoderma* interromperem o crescimento do fungo *M. phaseolina* no local de contato, formando uma barreira que evitou o desenvolvimento do fitopatógeno. E o hiperparasitismo revelou a formação de apressórios e enrolamento das hifas de *Trichoderma* em hifas fitopatogênicas de *M. phaseolina*.

O pareamento do *T. harzianum* (linhagem 1306) com os isolados de 424, 425 e 428 de *M. phaseolina* em meios de cultura BDA com e sem biochar demonstraram resultados semelhantes ao do trabalho desenvolvido por Mendonza et al. (2015), onde foi evidenciada uma barreira no local de contato dos microrganismos, interrompendo o desenvolvimento do fitopatógeno. Posteriormente, o *T. harzianum* ficou evidenciado por

colonizar as hifas dos diferentes isolados de *M. phaseolina*, como também, o restante da placa com meio de cultura.

Os resultados obtidos a partir do bioensaio com o isolado 428 reafirmaram a capacidade do biochar 500 °C em controlar o crescimento micelial do fitopatógeno, efeito semelhante ao que ocorreu com o isolado 424. A diferença verificada do isolado 428 (Figura 8) com o 424 (Figura 6) foi um efeito mais tardio, realçado a partir de 72 horas após montagem do experimento.

O pareamento do isolado 428 do fungo *M. phaseolina* com o *T. harzianum*, linhagem 1306 ratificou o efeito do agente de controle biológico sobre o fitopatógeno, mesmo resultado obtido com os isolados 424 e 425. A observação do experimento referente ao isolado 428 (Figura 13) demonstrou um efeito sinérgico entre o *T. harzianum* e a aplicação do biochar ao meio de cultura, promovendo redução do crescimento micelial do fungo *M. phaseolina*, tendo como referência as avaliações com 48, 72 e 96 horas após montagem do experimento.

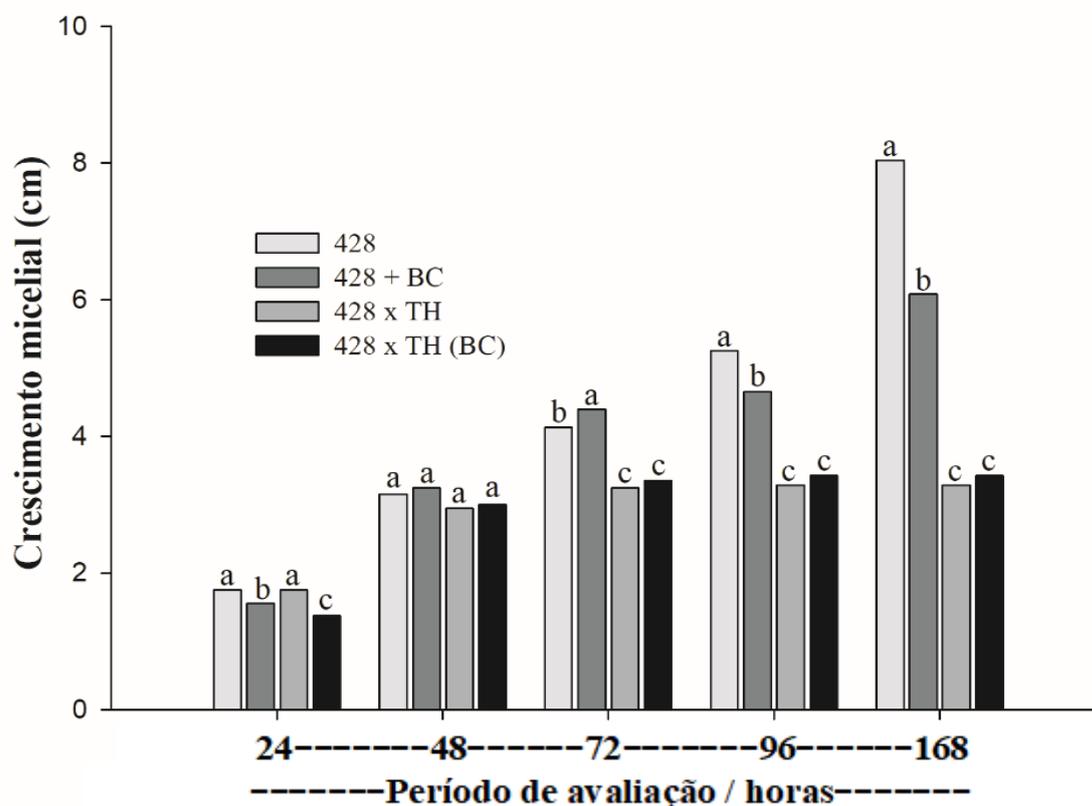


Figura 13. Pareamento de culturas [*M. phaseolina* (428) x *T. harzianum* (linhagem 1306)] em meio de cultura sem biochar e com biochar [0,5%]. Avaliação da *M. phaseolina* em horas após montagem do experimento. (428 – isolado 428; BC – biochar 500 °C; TH – *T. harzianum*). Letras iguais indicam que não há diferença significativa para cada período [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

Khaledi e Taheri (2016) avaliando o controle *in vitro* de *M. phaseolina* por meio de onze isolados de *Trichoderma* (cinco isolados de *T. harzianum* e seis de *T. viride*) observaram a inibição do fitopatógeno a partir de todos os agentes de controle biológico utilizados no estudo. Dois isolados de *T. harzianum* se destacaram dos demais microrganismos por promover o maior controle do fungo *M. phaseolina*, apresentando inibição de 57,3 e 58,7%.

Os resultados obtidos neste trabalho e associados à escala de Bell et al. (1982) demonstram que o antagonista cresce por toda a placa de Petri, consequentemente, ratifica a eficiência do *T. harzianum* (linhagem 1306) no controle de *M. phaseolina*, na presença ou não de BCH de lodo de esgoto (Figura 14).

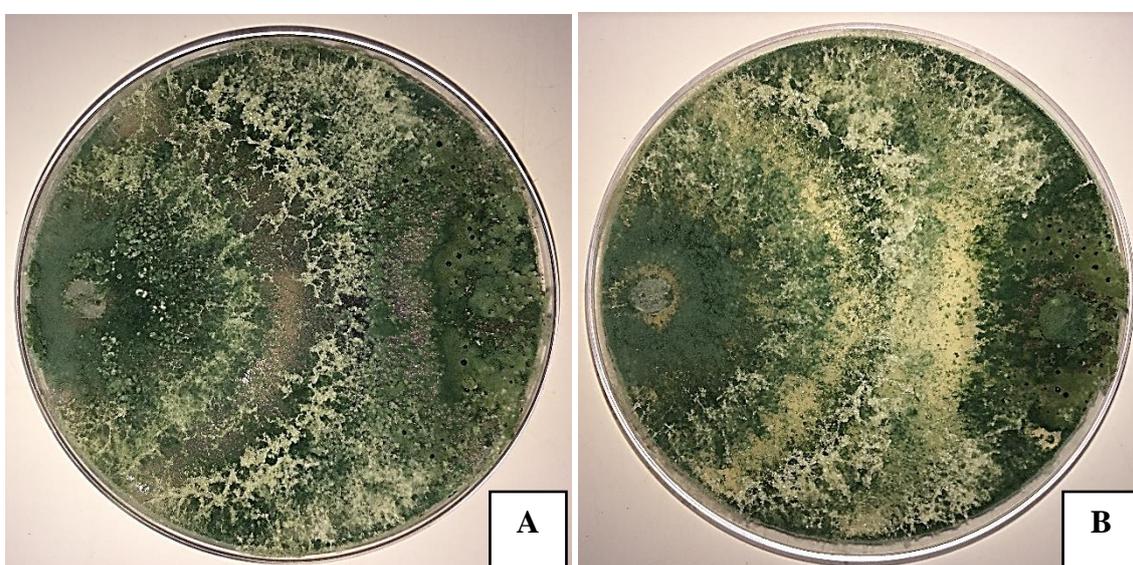


Figura 14. *T. harzianum* x *M. phaseolina* em meio de cultura com BCH (A) e *T. harzianum* x *M. phaseolina* em meio de cultura sem BCH (B).

6.5. Experimento 5

De maneira geral, observou-se o efeito deletério que o fungo *M. phaseolina* ocasionou nas culturas de soja e feijão por meio dos três isolados de fungo testados.

A aplicação de biochar de LE ao solo, de *T. harzianum* ou da associação do biochar + *T. harzianum* não influenciaram na germinação de sementes de soja na ausência do fitopatógeno (Tabelas 6, 7, 8). Resultados semelhantes foram observados em sobrevivência de plantas, onde diferentes tratamentos não se diferiram.

Tabela 6. Porcentagem de sementes de soja germinadas e de plantas sobreviventes na presença de *M. phaseolina* (424), biochar e *T. harzianum*.

TRATAMENTOS		GERMINAÇÃO (%)	SOBREVIVÊNCIA (%)
SEM INÓCULO	TESTEMUNHA	66,67 ab	66,67 ab
	P + BC	73,33 a	53,33 abc
	P + TH	73,33 a	66,67 ab
	P + BC + TH	80,00 a	80,00 a
COM INÓCULO (424)	TESTEMUNHA	40,00 bc	26,67 c
	P + BC	40,00 bc	40,00 bc
	P + TH	40,00 bc	33,33 bc
	P + BC + TH	33,33 c	33,33 bc

Legendas: P – Planta de soja; BC – Biochar 500 °C; TH – *Trichoderma harzianum*; 424 – Isolado 424 de *Macrophomina phaseolina*. Médias seguidas por letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa na coluna [Teste de Duncan (p<0,05)].

A inoculação da soja com o isolado 424 (Tabela 6) não diferiu da testemunha sem inóculo em germinação de sementes. O uso de biochar e *T. harzianum* não apresentou efeito no controle dos diferentes isolados de *M. phaseolina* avaliados no experimento, conseqüentemente, observa-se redução de germinação em tais plantas.

A avaliação da sobrevivência das plantas de soja inoculadas com o isolado 424 (Tabela 6) demonstrou que não houve diferença entre diferentes tratamentos. Com a testemunha (planta + isolado 424) obteve-se uma redução de 13,33% em relação à germinação. Entretanto, quando utilizado o *T. harzianum* essa diferença é reduzida para 6,67%, e na utilização do biochar observa-se que não há morte de plantas com base na porcentagem de sementes germinadas.

O isolado 425 proporcionou uma redução de 40% em germinação de sementes quando comparada com a testemunha sem inóculo (Tabela 7), valor também superior ao observado com o isolado 424 (redução de 26,67%). Os resultados de germinação obtidos a partir da aplicação de *T. harzianum* ao solo não apresentaram diferença significativa com a testemunha com inóculo, contudo elevaram a porcentagem de germinação de sementes de soja em 20%.

A aplicação de biochar ao solo associado ao isolado 425 proporcionou um aumento de germinação de aproximadamente 33% em relação à testemunha inoculada, valor semelhante ao encontrado nos tratamentos sem o fitopatógeno.

Tabela 7. Porcentagem de sementes de soja germinadas e de plantas sobreviventes na presença de *M. phaseolina* (425), biochar e *T. harzianum*.

TRATAMENTOS		GERMINAÇÃO (%)	SOBREVIVÊNCIA (%)
SEM INÓCULO	TESTEMUNHA	66,67 ab	66,67 ab
	P + BC	73,33 ab	53,33 abc
	P + TH	73,33 ab	66,67 ab
	P + BC + TH	80,00 a	80,00 a
COM INÓCULO (425)	TESTEMUNHA	26,67 c	26,67 c
	P + BC	60,00 ab	53,33 abc
	P + TH	46,67 bc	40,00 bc
	P + BC + TH	26,67 c	26,67 c

Legendas: P – Planta de soja; BC – Biochar 500 °C; TH – *Trichoderma harzianum*; 425 – Isolado 425 de *Macrophomina phaseolina*. Médias seguidas por letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan (p<0,05)].

A porcentagem de sobrevivência de plantas não diferiu em relação aos diferentes tratamentos utilizados para o controle do isolado 425 de *M. phaseolina*, ratificando que o uso de biochar, de *T. harzianum* ou da associação do biochar + *T. harzianum* não se mostrou eficaz para controle de tal fitopatógeno na cultura da soja, quando esta variável é evidenciada.

A utilização de biochar ou de *T. harzianum* para controle do isolado 428 de *M. phaseolina* não apresentou efeito satisfatório em germinação quando comparados com as plantas sem inóculo (Tabela 8). As plantas de soja inoculadas com o isolado 428 provenientes dos tratamentos com biochar ou *T. harzianum* não expressaram diferença significativa em germinação, entretanto a aplicação de biochar proporcionou um valor superior ao do agente de controle biológico.

Diferentes tratamentos não influenciaram na sobrevivência das plantas de soja inoculadas com o isolado 428. Plantas inoculadas com tal fitopatógeno e em contato com o biochar apresentam uma redução de 13,33% em comparação com as não inoculadas, diferente do que ocorre quando se observa o tratamento com apenas *T. harzianum*, em que a diferença entre as plantas não inoculadas e as inoculadas é de 33,34%.

A associação biochar + *T. harzianum* não apresentou efeito sinérgico na cultura da soja quando a mesma foi inoculada com diferentes isolados de *M. phaseolina*, resultado divergente ao que ocorre na ausência do fitopatógeno, que se destacou por

apresentar as melhores porcentagens de germinação e de plantas sobreviventes em comparação com os demais tratamentos.

Tabela 8. Porcentagem de sementes de soja germinadas e de plantas sobreviventes na presença de *M. phaseolina* (428), biochar e *T. harzianum*.

TRATAMENTOS		GERMINAÇÃO (%)	SOBREVIVÊNCIA (%)
SEM INÓCULO	TESTEMUNHA	66,67 ab	66,67 ab
	P + BC	73,33 a	53,33 bc
	P + TH	73,33 a	66,67 ab
	P + BC + TH	80,00 a	80,00 a
COM INÓCULO (428)	TESTEMUNHA	53,33 bc	53,33 bc
	P + BC	40,00 cd	40,00 c
	P + TH	33,33 d	33,33 cd
	P + BC + TH	13,33 e	13,33 d

Legendas: P – Planta de soja; BC – Biochar 500 °C; TH – *Trichoderma harzianum*; 428 – Isolado 428 de *Macrophomina phaseolina*. Médias seguidas por letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

O número de vagens de soja por vaso provenientes de diferentes tratamentos demonstrou um aumento substancial em comparação com a testemunha quando houve aplicação de biochar ao solo (Tabelas 9, 10 e 11). A aplicação do *T. harzianum* também se caracterizou por proporcionar um resultado satisfatório em comparação com a testemunha e, similar ao ocorrido com a aplicação do biochar.

A aplicação de biochar ao solo em conjunto com *T. harzianum*, apesar de não possuir diferença significativa entre tratamentos com apenas biochar ou apenas *T. harzianum*, foi o responsável pelo melhor resultado em se tratando de número de vagens de soja por vaso. Esse resultado ratifica a possível capacidade sinérgica observada na associação biochar + *T. harzianum* na cultura da soja.

O resultado da inoculação da soja com o isolado 424 de *M. phaseolina* (Tabela 9) expôs ao fato de que o fitopatógeno em contato com a planta proporcionou a não formação de vagens, resultado também ocorrido quando adotado apenas a aplicação de *T. harzianum* como medida de controle do fungo. Entretanto, a aplicação de biochar ao solo em plantas inoculadas promoveu uma formação de vagens semelhante ao observado em plantas não inoculadas com o fitopatógeno.

Haddad et al. (2017) observaram em um dos ensaios em casa de vegetação que a presença de isolados de *Trichoderma* spp. no substrato aumentou a germinação de sementes de soja na presença de *Sclerotinia sclerotiorum*. Determinados isolados de *Trichoderma* spp. também se destacaram por proporcionar aumento de massa seca de parte aérea em plantas de soja em contato com o fitopatógeno.

Tabela 9. Número de vagens de soja por vaso, a partir de diferentes tratamentos, contabilizado 100 dias após semeadura.

TRATAMENTOS		NÚMERO DE VAGENS
SEM INÓCULO	TESTEMUNHA	1,00 cd
	P + BC	11,00 ab
	P + TH	9,00 ab
	P + BC + TH	12,33 a
COM INÓCULO (424)	TESTEMUNHA	0,00 d
	P + BC	7,00 abc
	P + TH	0,00 d
	P + BC + TH	4,67 bcd

Legendas: P – Planta de soja; BC – Biochar 500 °C; TH – *Trichoderma harzianum*; 424 – Isolado 424 de *Macrophomina phaseolina*. Letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

A inoculação da soja com o isolado 425 não influenciou na formação de vagens nas plantas do experimento quando comparada com a testemunha sem o fitopatógeno (Tabela 10). O uso do biochar proporcionou um aumento no número de vagens em plantas inoculadas com o fungo, valor superior ao observado quando utilizado o *T. harzianum* como agente de controle.

O uso de biochars de milho produzidos por pirólise lenta (500 e 600 °C) foi eficaz na redução da gravidade dos sintomas de podridão radicular ocasionada por *Fusarium virguliforme* na cultura da soja (ROGOVSKA et al., 2017). Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que o uso de outros tipos de biochars (madeira, mistura de madeiras, palha de milho), apesar de não apresentar resultados tão eficientes no controle da síndrome da morte súbita da soja, não aumentou a severidade dos sintomas da doença.

Tabela 10. Número de vagens de soja por vaso, a partir de diferentes tratamentos, contabilizado 100 dias após semeadura.

TRATAMENTOS		NÚMERO DE VAGENS
SEM INÓCULO	TESTEMUNHA	1,00 c
	P + BC	11,00 a
	P + TH	9,00 abc
	P + BC + TH	12,33 a
COM INÓCULO (425)	TESTEMUNHA	4,67 bcd
	P + BC	9,67 ab
	P +TH	4,33 cd
	P + BC + TH	4,00 cd

Legendas: P – Planta de soja; BC – Biochar 500 °C; TH – *Trichoderma harzianum*; 425 – Isolado 425 de *Macrophomina phaseolina*. Letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

As plantas inoculadas com o isolado 428 mantiveram a formação de vagens semelhantes ao observado na testemunha sem inoculação (Tabela 11). Com exceção das plantas inoculadas com o fitopatógeno na presença do biochar, onde verifica-se um aumento no número de vagens por vaso, alcançando valores semelhantes aos dos melhores resultados de plantas não inoculadas.

Tabela 11. Número de vagens de soja por vaso, a partir de diferentes tratamentos, contabilizado 100 dias após semeadura.

TRATAMENTOS		NÚMERO DE VAGENS
SEM INÓCULO	TESTEMUNHA	1,00 b
	P + BC	11,00 a
	P + TH	9,00 a
	P + BC + TH	12,33 a
COM INÓCULO (428)	TESTEMUNHA	4,00 b
	P + BC	9,33 a
	P +TH	3,00 b
	P + BC + TH	3,00 b

Legendas: P – Planta de soja; BC – Biochar 500 °C; TH – *Trichoderma harzianum*; 428 – Isolado 428 de *Macrophomina phaseolina*. Letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

Aplicação de biochar de lodo de esgoto ao solo aumentou a absorção de nutrientes em plantas de milho, como também, proporcionou melhorias na fertilidade do solo (FARIA et al., 2017). Os autores descreveram tais efeitos do uso do biochar como responsáveis pelo maior rendimento da cultura.

Os tratamentos baseados no uso de biochar de lodo de esgoto, *T. harzianum* e da associação biochar + *T. harzianum* não diferiram estatisticamente em massa fresca e massa seca na ausência do fitopatógeno (Tabelas 12, 13 e 14), ou seja, resultados semelhantes foram observados em diferentes tratamentos quando plantas de soja não foram inoculadas com *M. phaseolina*. A aplicação de biochar ao solo, proveniente de diferentes matérias-primas (milho e madeira) e em diferentes concentrações (1, 2 e 3%), não afetou a biomassa de plantas de soja (parte aérea e raiz) desenvolvidas em casa de vegetação e avaliadas com 30 dias após plantio (EGAMBERDIEVA et al., 2016).

Scheifele et al. (2017), no entanto, verificaram em seu experimento que a aplicação de biochar de milho ou de madeira em determinados tipos de solo aumentou a concentração e o conteúdo de nutrientes em plantas de soja em comparação com o respectivo controle sem biochar. Os autores observaram influência positiva entre aplicação de biochar e a formação de nódulos responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio, como também, aumento de massa seca em plantas de soja conduzidas em determinados solos com aplicação de biochar de restos de cultura de milho.

Os resultados obtidos de massa fresca em plantas de soja inoculadas com o isolado 424 (Tabela 12) não diferiram dos encontrados na ausência do patógeno, com exceção da associação biochar + *T. harzianum*. Observa-se que diferentes tratamentos não influenciaram nos valores de massa seca em plantas de soja inoculadas com o patógeno, ou seja, o uso de biochar e/ou *T. harzianum* não se mostrou eficaz para controle do isolado 424 de *M. phaseolina* em soja, quando avaliada a massa seca de tais plantas.

Tabela 12. Massa fresca e massa seca (g) de plantas de soja por vaso, quando submetidas a diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS		MASSA FRESCA (g)	MASSA SECA (g)
SEM INÓCULO	TESTEMUNHA	13,30 abc	3,90 ab
	P + BC	16,12 ab	4,34 ab
	P + TH	14,22 abc	4,95 a
	P + BC + TH	17,66 a	4,74 a
COM INÓCULO (424)	TESTEMUNHA	10,61 bcd	2,48 bc
	P + BC	8,34 cd	2,11 bc
	P + TH	9,29 bcd	2,39 bc
	P + BC + TH	3,87 d	1,86 c

Legendas: P – Planta de soja; BC – Biochar 500 °C; TH – *Trichoderma harzianum*; 424 – Isolado 424 de *Macrophomina phaseolina*. Letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

Os resultados obtidos a partir do isolado 425 (Tabela 13) demonstram que sua inoculação em plantas de soja não acarretou em perda de massa fresca e seca, onde os resultados obtidos por diferentes tratamentos, na ausência ou presença do patógeno, não expressaram diferença significativa.

Tabela 13. Massa fresca e massa seca (g) de plantas de soja por vaso, quando submetidas a diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS		MASSA FRESCA (g)	MASSA SECA (g)
SEM INÓCULO	TESTEMUNHA	13,30 ab	3,90 ab
	P + BC	16,12 a	4,34 a
	P + TH	14,22 a	4,95 a
	P + BC + TH	17,66 a	4,74 a
COM INÓCULO (425)	TESTEMUNHA	11,72 ab	3,25 ab
	P + BC	9,58 ab	2,42 ab
	P + TH	8,00 ab	2,03 ab
	P + BC + TH	3,65 b	0,99 b

Legendas: P – Planta de soja; BC – Biochar 500 °C; TH – *Trichoderma harzianum*; 425 – Isolado 425 de *Macrophomina phaseolina*. Letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

Os resultados obtidos da inoculação da soja com o isolado 428 (Tabela 14) demonstram que a massa fresca de tais plantas não foi influenciada pelo contato com o fitopatógeno, independentemente dos distintos tratamentos em que foram submetidas. Diferença significativa em massa fresca somente é evidenciada quando tratamentos na presença do isolado 428 são comparados ao com a associação biochar + *T. harzianum* em plantas não inoculadas. Semelhante comportamento é observado em massa seca, demonstrando que valores inferiores são significativos quando tratamentos com o inóculo são comparados aos com o uso do *T. harzianum* e da associação biochar + *T. harzianum* na ausência do fitopatógeno.

Tabela 14. Massa fresca e massa seca (g) de plantas de soja por vaso, quando submetidas a diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS		MASSA FRESCA (g)	MASSA SECA (g)
SEM INÓCULO	TESTEMUNHA	13,30 abc	3,90 ab
	P + BC	16,12 ab	4,34 ab
	P + TH	14,22 abc	4,95 a
	P + BC + TH	17,66 a	4,74 a
COM INÓCULO (428)	TESTEMUNHA	10,61 bcd	2,48 bc
	P + BC	8,34 cd	2,11 bc
	P + TH	9,29 bcd	2,25 bc
	P + BC + TH	3,87 d	0,95 c

Legendas: P – Planta de soja; BC – Biochar 500 °C; TH – *Trichoderma harzianum*; 428 – Isolado 428 de *Macrophomina phaseolina*. Letras iguais indicam que não há diferença significativa na coluna [Teste de Duncan ($p < 0,05$)].

Os resultados obtidos a partir da avaliação de germinação do feijão comum, cultivar BRS Estilo, tendo como parâmetro a testemunha com e sem inóculo, demonstraram uma redução significativa no percentual de plantas geradas quando as mesmas foram inoculadas com diferentes isolados (424, 425 e 430) de *M. phaseolina*.

Os resultados de germinação de sementes demonstraram não existir diferença no número de plântulas de feijão emergidas quando comparados diferentes tratamentos na ausência do fitopatógeno (Figura 15). Os tratamentos com *T. harzianum*, biochar ou a associação de ambos se mostraram eficazes para o controle do isolado 428, garantindo

um aumento significativo no percentual de germinação quando comparados com a testemunha inoculada.

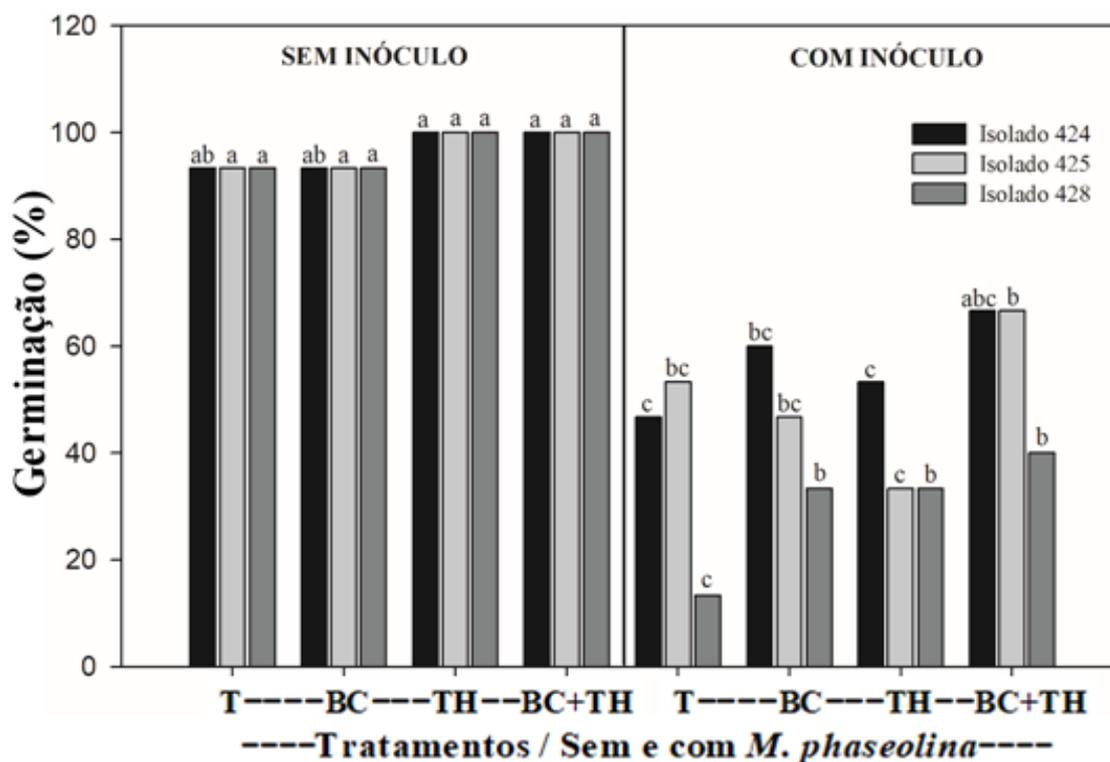


Figura 15. Porcentagem de sementes de feijão (*P. vulgaris*) germinadas quando submetidas a diferentes tratamentos, inoculadas ou não com três isolados de *M. phaseolina*. Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - *T. harzianum*).

Pierre et al. (2016) descreveram que o tratamento de sementes de feijão com diferentes espécies de *Trichoderma* afetou a porcentagem e velocidade de germinação das mesmas. O uso de *T. harzianum* proporcionou um índice de 94,16% de emergência de plântulas de feijão, resultado superior ao 66,66% registrado pelo controle (sementes não inoculadas com o microrganismo).

A aplicação individual de biochar ao solo para controle do isolado 424, em se tratando de sobrevivência (Figura 16), resultou em redução de 20% no percentual de plantas ao fim do experimento em comparação com o observado no seu início após a germinação.

Os tratamentos que foram inoculados com o isolado 425 demonstraram que tanto a testemunha como os métodos de controle utilizados no bioensaio apresentaram uma redução de aproximadamente 6,70% na última avaliação em relação a porcentagem de plantas observada após a germinação. Esse resultado demonstrou que tanto o biochar

quanto o *T. harzianum* não apresentaram eficácia no controle desse determinado fitopatógeno.

Os mecanismos de controle utilizados no experimento, em se tratando de sobrevivência de plantas, não apresentaram resultados satisfatórios para o isolado 428 de *M. phaseolina*, tendo o tratamento com *T. harzianum* se destacado por promover uma redução de 13,33% no percentual de plantas observado ao início do experimento (Figura 16).

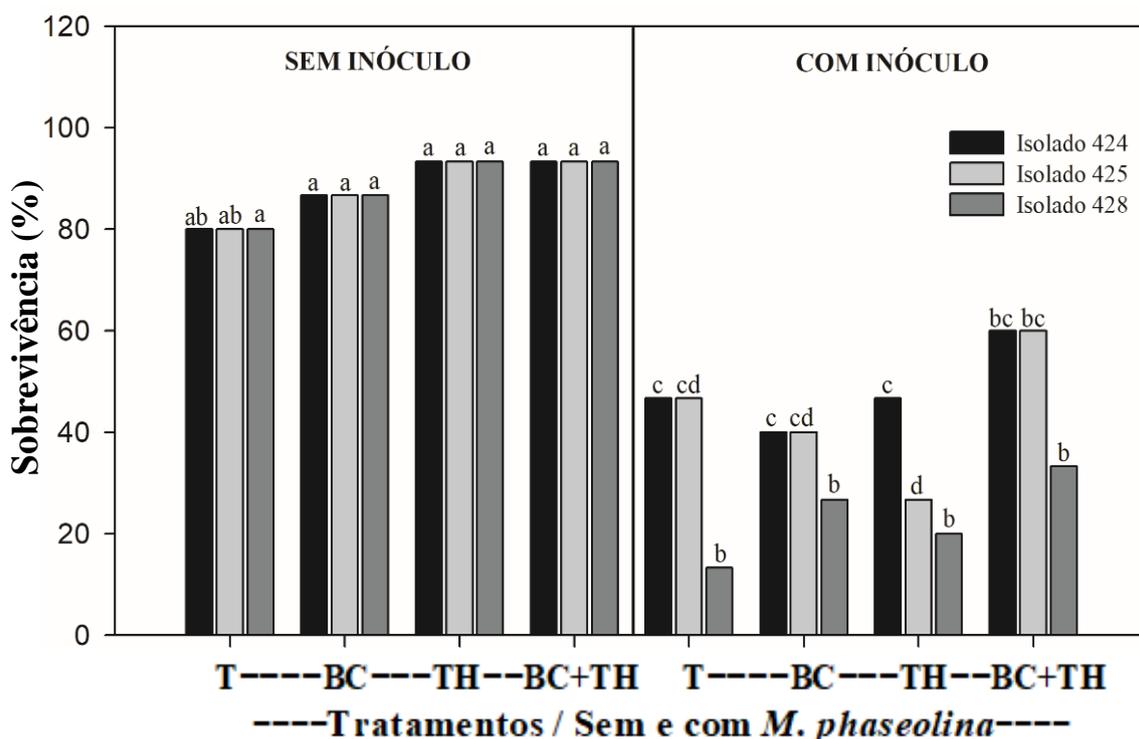


Figura 16. Porcentagem de plantas de feijão (*P. vulgaris*) sobreviventes quando submetidas a diferentes tratamentos, inoculadas ou não com três isolados de *M. phaseolina*. Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - *T. harzianum*).

O efeito benéfico da associação biochar + *T. harzianum* é amplamente expresso na avaliação que quantificou o número de vagens obtidas por vaso de plantas de feijão (Figura 17). Na ausência do patógeno, a aplicação de biochar ao solo em conjunto com *T. harzianum* elevou o número de vagens em relação a testemunha ($p < 0,05$). A aplicação de *T. harzianum* ao solo em experimento de vaso promoveu um aumento de 6% no comprimento de parte aérea e de 24% no de raiz em plantas de fava (*Vicia faba* L.) inoculadas com *M. phaseolina* em relação ao controle (KUMARI et al., 2017). O uso de *T. harzianum* para controle de *M. phaseolina* proporcionou um acréscimo de 50 e 44%

nos resultados de massa fresca e massa seca de parte aérea, respectivamente, como também, de 40 e 46% nos valores observados para raiz. Tal agente de controle biológico foi descrito por aumentar o número de vagens por planta e de nódulos em raízes.

Os tratamentos utilizados para controle do isolado 424 de *M. phaseolina* apresentaram resultados superiores ao observado com a testemunha inoculada, comprovando a eficácia dos tratamentos e como consequência, a maior produção de vagens. Para o isolado 425, os tratamentos não diferiram da testemunha inoculada, entretanto quando avaliado os resultados obtidos decorrentes da aplicação de biochar para controle do patógeno, a resposta em produção de vagens se assemelhou ao tratamento com *T. harzianum* sem inoculação.

A produção de vagens de feijão oriundas do experimento com o isolado 428 enfatizou o efeito sinérgico alcançado pela associação biochar + *T. harzianum* (Figura 17). Essa combinação possibilitou maior produção de vagens do que o tratamento controle ($p < 0,05$). Silva et al. (2017) observaram que a incorporação de diferentes tipos de biochars ao solo, produzidos a partir de casca de arroz (430 °C), serragem (385 °C) ou silagem de sorgo (385 °C), melhorou as propriedades químicas do solo, como também, refletiu em um aumento de rendimento (maior massa seca) e acumulação de nutrientes nos grãos de plantas de feijão.

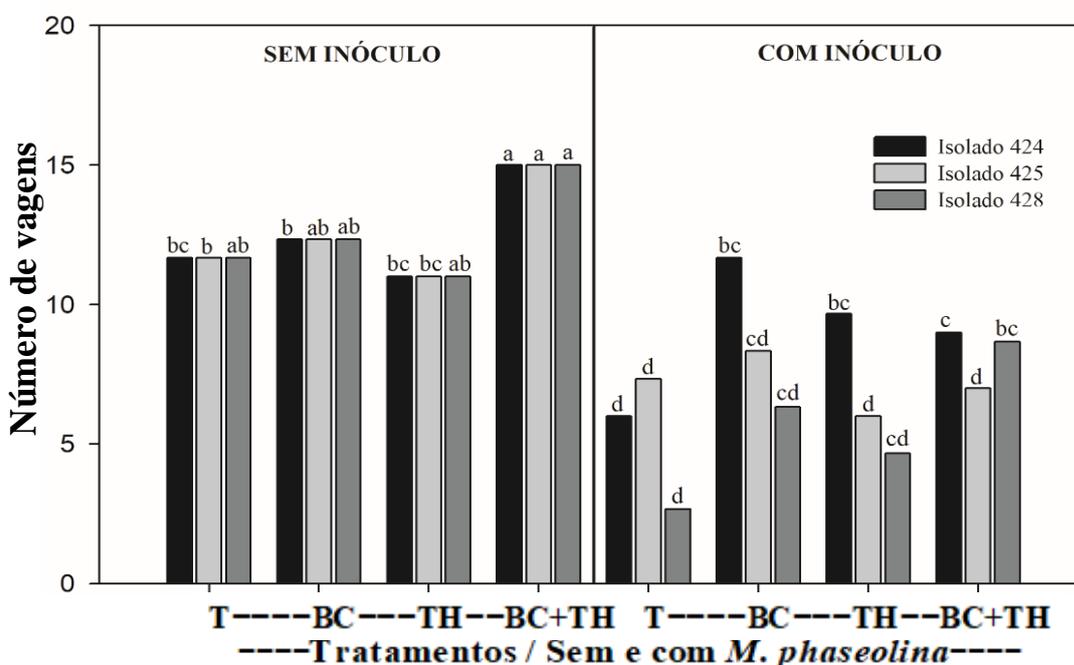


Figura 17. Número de vagens de feijão (*P. vulgaris*) por vaso, a partir de diferentes tratamentos, sendo as plantas inoculadas ou não com três isolados de *M. phaseolina*. Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - *T. harzianum*).

A massa fresca e massa seca avaliadas nesse bioensaio ratificou os benefícios alcançados a partir da aplicação do biochar ao solo, como também, a importância que microrganismos benéficos como o *T. harzianum* exercem sobre o desenvolvimento de uma planta, no caso o feijão. A aplicação em conjunto de tais tratamentos promoveu um aumento de massa fresca em torno de três vezes ao alcançado pela testemunha na ausência do patógeno (Figura 18).

Biochar de lodo de esgoto aplicado ao solo demonstrou efeito estimulante ao crescimento e produção de biomassa de plantas de feijão (IBRAHIM et al., 2017). O uso de biochar representou um aumento de 21% em biomassa de parte aérea e de 27% nos frutos. Os autores citam que este aumento em biomassa possa ser atribuído à melhora na fertilidade do solo proveniente da adição do biochar de lodo de esgoto.

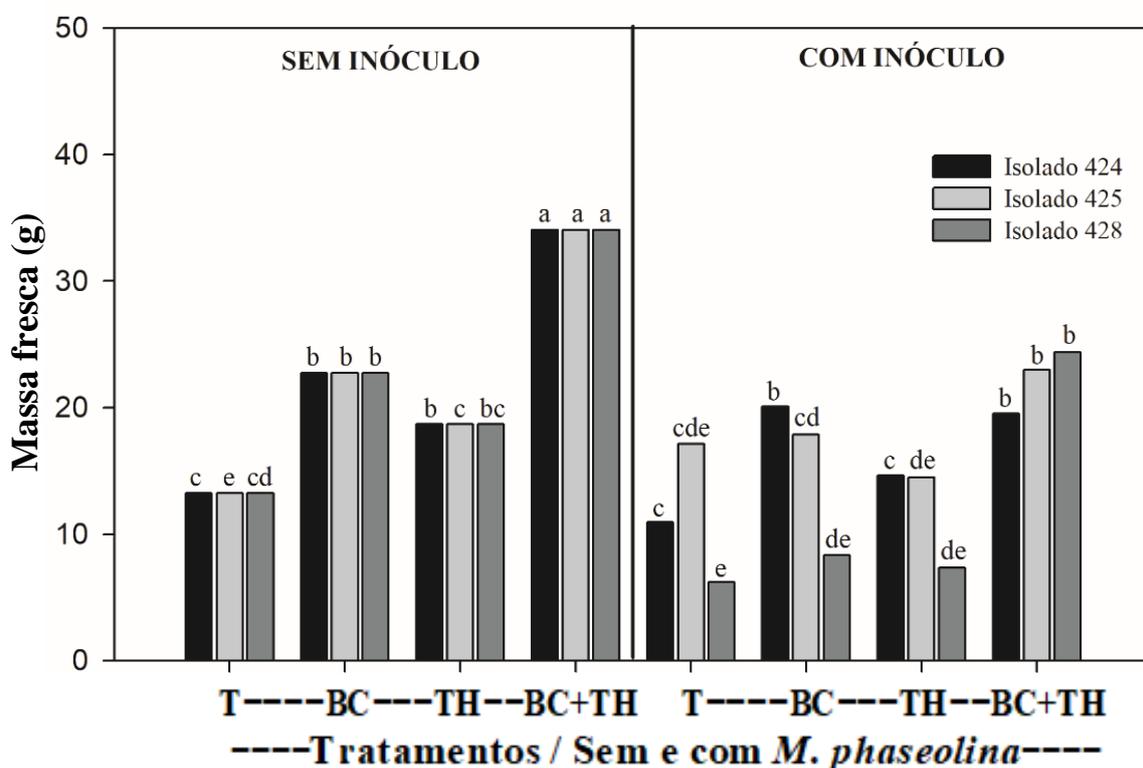


Figura 18. Massa fresca (g) de feijão (*P. vulgaris*) por vaso, a partir de diferentes tratamentos, sendo as plantas inoculadas ou não com três isolados de *M. phaseolina*. Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - *T. harzianum*).

Na presença dos isolados (424, 425 e 428) de *M. phaseolina*, verificam-se que as respostas geradas pela planta em massa fresca são significativamente superiores à testemunha quando dois métodos de controle são utilizados, biochar e agente de controle biológico.

Graber et al. (2014) enfatizaram a possível influência do biochar no complexo sistema rizosférico, evidenciado pela interação com raiz/solo/patógeno em virtude de uma série de propriedades físicas e químicas, como: conteúdo de nutrientes, capacidade de retenção de água, atividade redox, capacidade de adsorção, pH e conteúdo de compostos tóxicos e hormonais. Os autores destacaram que essas propriedades do biochar podem afetar as diretrizes do triângulo da doença (ambiente, hospedeira e patógeno) de forma direta e/ou indireta (através da microbiota da rizosfera), e conseqüentemente, influenciar o desenvolvimento das plantas, como também, o progresso da doença.

Os resultados de massa seca (Figura 19) seguem o mesmo comportamento que os de massa fresca, ratificando que a aplicação de biochar em conjunto com *T. harzianum* proporciona o maior efeito em aumento de massa quando tal tratamento é comparado a testemunha inoculada com diferentes isolados de *M. phaseolina* ($p < 0,05$).

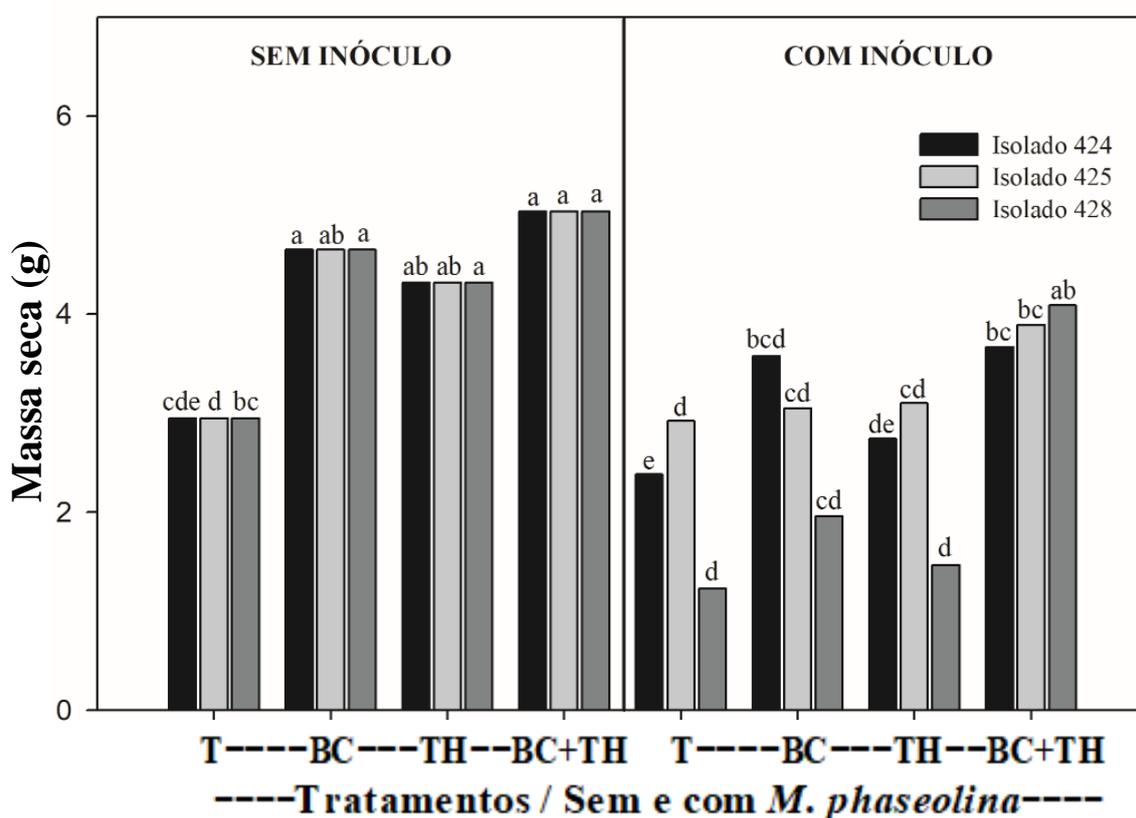


Figura 19. Massa seca (g) de feijão (*P. vulgaris*) por vaso, a partir de diferentes tratamentos, sendo as plantas inoculadas ou não com três isolados de *M. phaseolina*. Para um dado isolado letras iguais indicam que não há diferença significativa [Teste de Duncan ($p < 0,05$)]. (T – testemunha, BC – biochar, TH - *T. harzianum*).

O uso de biochar de lodo de esgoto em experimento de vaso refletiu em aumento do conteúdo de nutrientes do solo, com exceção do potássio (K), elevando os valores de indicadores de fertilidade representados pela soma de bases, capacidade efetiva de troca cátions, capacidade de troca cátions e saturação por bases (SOUSA e FIGUEIREDO, 2016). Melhoria da fertilidade do solo resultou em aumento do desenvolvimento das plantas de rabanete, com efeito positivo em número de folhas, altura da planta e peso seco de parte aérea.

A aplicação de biochar de madeira de eucalipto (600 °C) ao solo resultou em uma diminuição de até 61% da murcha de fusário em tomateiro, como também, plantas conduzidas em solo sem biochar apresentaram sintomas de murcha um dia antes das conduzidas com biochar (JAISWAL et al., 2017). Os autores destacaram que a aplicação de biochar ao solo estimulou a diversidade microbiana rizosférica relacionada aos gêneros conhecidos por promoção de crescimento de plantas, supressão de doenças, possíveis papéis ecológicos (decomposição de compostos orgânicos) e fixação biológica de nitrogênio.

A inoculação com os três isolados de *M. phaseolina* causou danos à cultura do feijão, refletindo em baixa produção de massa fresca e seca pelas plantas. Entretanto, a associação biochar + *T. harzianum*, para controle dos isolados estudados nesse trabalho, revela maior efetividade contra o isolado 428 em comparação com os demais isolados, proporcionando maior diferença em massa (g) em relação à testemunha inoculada.

O tratamento de sementes com determinado isolado de *T. harzianum* acarretou um aumento no crescimento de plantas de feijão, proporcionando maior área foliar, área de raiz e maior número de raízes secundárias (PEREIRA et al., 2014). Os autores descreveram que além da promoção de crescimento favorecida pelo *T. harzianum*, as plantas tratadas com tal agente de controle biológico apresentaram padrão de expressão para genes de resposta de defesa que codificaram quitinase, β -1-3-glucanase, lipoxigenase e peroxidase.

Mudanças na estrutura de comunidades microbianas e microfauna do solo proporcionadas pela aplicação de materiais orgânicos são descritas como possíveis responsáveis pela supressão de fungos fitopatogênicos e redução da incidência de doença em plantas de ginseng (*Panax ginseng*) (EO et al., 2017). Os autores descrevem um aumento de nematoides fungívoros, como também, maior quantidade e atividade bacteriana no solo após adição de material orgânico, definindo bactérias como grupo candidato a supressores de patógenos fúngicos de podridão radicular.

7. CONCLUSÕES

- I. Biochar de lodo de esgoto, produzido a 500 °C e utilizado em baixa concentração (0,5%), possui efeito direto no controle *in vitro* de diferentes isolados de *M. phaseolina*.
- II. *Trichoderma harzianum* (linhagem 1306) é eficiente no controle *in vitro* de *M. phaseolina*, em meio de cultura com ou sem biochar.
- III. *M. phaseolina* afeta negativamente a germinação e sobrevivência de plantas de soja e germinação, sobrevivência e número de vagens de plantas de feijão comum.
- IV. O isolado 428 de *M. phaseolina* reduziu todos os índices agronômicos (germinação, sobrevivência, número de vagens, massa fresca e seca) de plantas de feijão.
- V. O uso de BCH aumentou o número de vagens em plantas de soja, inoculadas ou não com *M. phaseolina*.
- VI. A associação *T. harzianum* + BCH de lodo de esgoto aumentou o número de vagens, massa fresca e massa seca de plantas de feijão, inoculadas ou não com *M. phaseolina*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTER, A.; HAGE-AHMED, K.; SOJA, G.; STEINKELLNER, S. Compost and biochar alter mycorrhization, tomato root exudation, and development of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, article 529, p. 1-13. 2015.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAN, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n.4, p. 379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260. 2004.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. In: BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. **Jaguariúna: Embrapa Meio-Ambiente**, v.1, cap.12, p. 187-208. 2009.
- BITANCOURT, A. A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, v. 1, n. 2, p. 41. 1935.

BROETTO L.; COLTRO-RONCATO, S.; MEINERZ, C. C.; DILDEY, O. D. F.; PAZDIORA, P. C.; GONÇALVES, E. D. V.; MORAES, A. J. DE; HENKEMEIER, N. P.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 4, p. 310-317. 2014.

CABALLERO, J. A.; FRONT, R.; MARCILLA, A.; CONESA, J.A. Characterization of sewage sludges by primary and secondary pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 4041, p. 433–450. 1997.

CAESB. **Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal**. Disponível em: < www.caesb.df.gov.br/esgoto/sistemas-de-esgotamento.html>. Acesso em: 14 nov. 2016.

CAYUELA, M. L.; SANCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; HANLEY, K.; ENDERS, A.; LEHMANN, J. Biochar and denitrification in soils: when, how much and why does biochar reduce N₂O emissions? **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-7. 2013.

CÉZAR, R.; SILVA, M.; COLONESE, J.; BIDONE, E.; EGLER, S.; CASTILHOS, Z.; POLIVANOV, H. Influence of the properties of tropical soils in the toxicity and bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended lands. **Environmental Earth Science**, Berlin, v. 66, p. 2281-2292. 2012.

CHANG, A.C.; HYUN, H.; PAGE, A.L. Cadmium uptake for swiss chard grown on composted sewage sludge treated field plots: plateau or time bomb? **Journal of Environmental Quality**, Standford, v. 26, p. 11-19. 1997.

CLOUGH, T.; CONDRON, L.; KAMMANN, C.; MÜLLER, C. A review of biochar and soil nitrogen dynamics. **Agronomy**, v. 3, p. 275–293. 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Safra 2017/18 - Quarto levantamento**, Brasília, v. 5, n. 4, p. 1-132. 2018.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução Conama 375/06. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>. Acesso em: 20 out. 2016.

COPLEY, T. R.; ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. Maple Bark Biochar Affects *Rhizoctonia solani* Metabolism and Increases Damping-Off Severity. **Phytopathology**, v. 105, n. 10. 2015.

DEENIK, J. L.; COONEY, M. J. The Potential Benefits and Limitations of Corn Cob and Sewage Sludge Biochars in an Infertile Oxisol. **Sustainability**, v. 8, n. 131, p. 1-18. 2016.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. **Viçosa: UFV**, 166 p. 1978.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: effects of soil moisture, carbon:nitrogen ratios, carbon sources, and nitrogen concentrations. **Phytopathology**, v. 65, p. 236-240. 1975.

DOWNIE, A.; CROSKY, A.; MUNROE, P. Physical Properties of Biochar. In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S (ed). **Biochar for Environmental Management: Science and Technology**. Ed. Londres: Earthscan, v. 1, p. 13-32. 2009.

EGAMBERDIEVA, D.; WIRTH, S.; BEHRENDT, U.; ABD_ALLAH, E. F.; BERG, G. Biochar treatment resulted in a combined effect on soybean growth promotion and a shift in plant growth promoting Rhizobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 209, p. 1-11. 2016.

ELAD, Y.; DAVID, D. R.; MELLER HAREL, Y.; BORENSHTEIN, M.; BEN KALIFA, H.; SILBER A, GRABER, E. R. Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. **Phytopathology**, v. 100, p. 913–921. 2010.

ELMER, W. H.; PIGNATELLO, J. J. Effect of biochar amendments on mycorrhizal associations and Fusarium crown and root rot of asparagus in replant soils. **Plant Disease**, v. 95, p. 960-966. 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Macrophomina phaseolina* em soja. **Embrapa Soja**, Londrina, PR. 55p. 2014.

EO, J.; PARK, K.-C.; KIM, M.-H.; KWON, S.-I.; SONG, Y.-J. Effects of rice husk and rice husk biochar on root rot disease of ginseng (*Panax ginseng*) and on soil organisms. **Biological Agriculture & Horticulture**, p. 1-13. 2017.

FARIA, W. M.; FIGUEIREDO, C. C. DE; COSER, T. R.; VALE, A. T.; SCHNEIDER, B. G. Is sewage sludge biochar capable of replacing inorganic fertilizers for corn production? Evidence from a two-year field experiment. **Archives of Agronomy and Soil Science**, p. 1-15. 2017.

FIGUEIREDO, C.; LOPES, H.; COSER, T.; VALE, A.; BUSATO, J.; AGUIAR, N.; NOVOTNY, E.; CANELLAS, L. Influence of pyrolysis temperature on chemical and physical properties of biochar from sewage sludge. **Archives of Agronomy and Soil Science**, p. 1-9. 2017.

GANGOPADHYAY, S.; WYLLIE, T.D.; TEAGUE, W.R. Effect of bulk density and moisture content of soil on the survival of *Macrophomina phaseolina*. **Plant and Soil**, v. 68, p. 241-247. 1982.

GEORGE, C.; KOHLER, J.; RILLIG, M. C. Biochars reduce infection rates of the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans* and associated biomass loss in carrot. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 95, p. 11-18. 2016.

GOMES, D. P.; SILVA, G. C.; KRONKA, A. Z.; TORRES, S. B.; SOUZA, J. R. de. Qualidade fisiológica e incidência de fungos em sementes de feijão-caupi produzidas do Estado do Ceará. Universidade Federal Rural do Semiárido, **Revista Caatinga**, vol. 21, n. 2, p. 165-171. 2008.

GRABER, E. R.; FRENKEL, O.; JAISWAL, A. K.; ELAD, Y. How may biochar influence severity of diseases caused by soilborne pathogens? **Carbon Management**, v. 5, n. 2, p. 169-183. 2014.

GRABER, E. R.; HAREL, Y. M.; KOLTON, M.; CYTRYN, E.; SILBER, A.; DAVID, D. R.; TSECHANSKY, L.; BORENSHTEIN, M.; ELAD, Y. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. **Plant and Soil**, v. 337, p. 481–496. 2010.

GUPTA, G.K.; SHARMA, S.K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to Charcoal rot of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 167–180. 2012.

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

HARTLEY, W.; RIBY, P.; WATERSON, J. Effects of three different biochars on aggregate stability, organic carbon mobility and micronutrient bioavailability. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 1-9. 2016.

HOLLIDAY, P.; PUNITHALINGAN, E. *Macrophomina phaseolina*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, n. 275, 2p. 1970.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil: Histórico de Comercialização 2000 - 2014**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em: 4 nov. 2016.

IBM CORP. Released 2015. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp. 2015.

IBRAHIM, M.; LI, G.; KHAN, S.; CHI, Q.; XU, Y. Biochars mitigate greenhouse gas emissions and bioaccumulation of potentially toxic elements and arsenic speciation in *Phaseolus vulgaris* L. **Environmental Science Pollution Research**, v. 24, n. 24, p. 19524–19534. 2017.

ITO, M. F. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, Edição Especial, p. 83-101. 2013.

JAISWAL, A. K.; ELAD, Y.; GRABER, E. R.; FRENKEL, O. *Rhizoctonia solani* suppression and plant growth promotion in cucumber as affected by biochar pyrolysis temperature, feedstock and concentration. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 69, p. 110-118. 2014.

JAISWAL, A. K.; ELAD, Y.; PAUDE, I.; GRABER, E. R.; CYTRYN, E.; FRENKEL, O. Linking the belowground microbial composition, diversity and activity to soilborne disease suppression and growth promotion of tomato amended with biochar. **Scientific Reports**, v. 7, n. 44382, p. 1-17. 2017.

JAISWAL, A. K.; FRENKEL, O.; ELAD, Y.; LEW, B.; GRABER, E. R. Non-monotonic influence of biochar dose on bean seedling growth and susceptibility to *Rhizoctonia solani*: the “Shifted Rmax-Effect”. **Plant and Soil**, v. 395, p. 125–140. 2015.

JIMENEZ, D. R. M.; BLANCE, L. M. A.; SACKSTON, W. E. Incidence and distribution of charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* in Spain. **Plant Disease**, v. 67, p. 1033–1036. 1983.

KHALILI, E.; JAVED, M. A.; HUYOP, F.; RAYATPANAH, S.; JAMSHIDI, S.; WAHAB, R. A. Evaluation of *Trichoderma* isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, p. 1-10. 2016.

KHALEDI, N.; TAHERI, P. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal of plant protection research**, v. 56, n. 1, p. 21-31. 2016.

KHANZADA, A. M.; LODHI, A. M.; SHAH, N.; MAITLO, S. A. Effect of different inoculation methods and inoculum levels of *Macrophomina phaseolina* on okra. **eSci Journal of Plant Pathology**, v. 1, p. 1-5. 2012.

KNOX-DAVIES, P.S. Mitosis and aneuploidy in the vegetative hyphae of *Macrophomina phaseoli*. **American Journal of Botany**, v. 54, p. 1290-1295. 1967.

KOOKANA, R. S.; SARMAH, A. K.; VAN ZWIETEN, L.; KRULL, E.; SINGH, B. Biochar application to soil: agronomic and environmental benefits and unintended consequences. **Advances in Agronomy**, v. 112, p. 103–143. 2011.

KUMARI, R.; KHAN, M. R.; BAGRI, G. K.; BAGRI, D. K.; BAGDI, D. L. Soil application of different species of *Trichoderma* for the management of charcoal rot of faba bean caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 1483-1486. 2017.

LEHMAN, P. S.; MACHADO, C. C.; TARRAGO, M. T. Frequência e severidade de doenças da soja nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p. 183-193. 1976.

MACHADO, C.C. ***Macrophomina phaseolina*: biological behavior of isolates, spatial pattern of microesclerotia in the soil, and incidence on soybeans**. Thesis (PhD) - University of Illinois, Urbana Champaign. 195p. 1987.

MARCENARO D.; VALKONEN, J. P. T. Seedborne pathogenic fungi in common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. INTA Rojo) in Nicaragua. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1-18. 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Perfil do Feijão no Brasil**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

MEHARI, Z. H.; ELAD, Y.; RAV-DAVID, D.; GRABER, E. R.; MELLER HAREL, Y. Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling. **Plant and Soil**, v. 395, p. 31–44. 2015.

MENDOZA, J. L.; PÉREZ, M. I.; PRIETO, J. M.; VELÁSQUEZ, J. D.; OLIVARES, J. G.; LANGARICA, H. R. Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to northeastern

Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 1093-1101. 2015.

MENEZES, M.; MACHADO, A. L. M.; SILVEIRA, M. do C. V. da; SILVA, R. L. X. da. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* com espécies de *Trichoderma* aplicadas no tratamento de sementes de feijão e no solo. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, PE. v. 1, p. 133-140. 2004.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Segurança química – Agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em: 13 dez. 2016.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. **Microbiology**, Washington, v. 158, p. 35-45. 2012.

MYCOBANK. *Macrophomina phaseolina*. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank>>. Acesso em: 21 nov. 2016.

NDIAYE, M. **Ecology and Management of Charcoal Rot (*Macrophomina phaseolina*) on Cowpea in the Sahel**. PhD thesis, University of Wageningen, Wageningen, the Netherlands. 2007.

PEREIRA, J. L.; QUEIROZ, R. M. L.; CHARNEAU, S. O.; FELIX, C. R.; RICART, C. A. O.; DA SILVA, F. L.; STEINDORFF, A. S.; ULHOA, C. J.; NORONHA, E. F. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic Fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5. 2014.

PETTER, F. A. **Biomassa carbonizada como condicionador de solo: aspectos agronômicos e ambientais do seu uso em solos de cerrado**. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, f. 130. 2010.

PIERRE, E.; LOUISE, N. W.; MARIE, T. K. R.; VALÈRE, T. F. P.; ARC-EN-CE, J. M.; FEKAM, B. F. Integrated assessment of phytostimulation and biocontrol potential of endophytic *Trichoderma* spp against common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root rot Fungi Complex in Centre Region, Cameroon. **International Journal of Pure Applied Bioscience**, v. 4, n. 4, p. 50-68. 2016.

QUINTANA, N. R. **Análise econômica da aplicação de biossólido na agricultura**. (Dissertação de Mestrado), Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, f. 133. 2006.

RADWAN, O.; ROUHANA L. V.; HARTMAN G. L.; KORBAN, S. S. Genetic mechanisms of host-pathogen interactions for charcoal rot in soybean. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 617-629. 2014.

RAMEZANI, H. Biological Control of Root-Rot of Eggplant Caused by *Macrophomina phaseolina*. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 4, n. 2, p. 218-220. 2008.

RAJENDIRAN, R.; JEGADEESHKUMAR, D.; SURESHKUMAR, B. T.; NISHA, T. *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 6, n. 1, p. 31-35. 2010.

ROGOVSKA, N.; LAIRD, D.; LEANDRO, L.; ALLER, D. Biochar effect on severity of soybean root disease caused by *Fusarium virguliforme*. **Plant and Soil**, v. 413, p. 111–126. 2017.

SAIN, S. K.; PANDEY, A. K. Biological spectrum of *Trichoderma harzianum* Rifai isolates to control fungal diseases of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 49, n. 19-20, p. 507-521. 2016.

SCHEIFELE, M.; HOBI, A.; BUEGGER, F.; GATTINGER, A.; SCHULIN, R.; BOLLER, T.; MÄDER, P. Impact of pyrochar and hydrochar on soybean (*Glycine max* L.) root nodulation and biological nitrogen fixation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 180, p. 199–211. 2017.

SCUDELER, F.; VENEGAS, F. *Trichoderma harzianum* associado ou não a fungicidas em tratamento de sementes na cultura do milho (*Zea mays* L.). **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 5, p. 9-19. 2012.

SILVA, I. C. B. DA; BASÍLIO, J. J. N.; FERNANDES, L. A.; COLEN, F.; SAMPAIO, R. A.; FRAZÃO, L. A. Biochar from different residues on soil properties and common bean production. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 5, p. 378-382. 2017.

SINGH, B. P.; HATTON, B. J.; BALWANT, S.; COWIE, A. L.; KATHURIA, A. Influence of biochars on nitrous oxide emission and nitrogen leaching from two contrasting soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 39, p. 1224-1235. 2010.

SMML. **Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host Database**. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungal_databases/fungushost/new_frameFungusHostReport.cfm>. Acesso em: 17 nov. 2016.

SNIS. **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2014**. Brasília, DF. 212p. 2016.

SOHI, S. P. Carbon storage with benefits. **Science**, v. 338, p. 1034-1035, 2012.

SOUSA, A. A. T. C.; FIGUEIREDO, C. C. Sewage sludge biochar: effects on soil fertility and growth of radish. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 32, n. 2, p. 127-138. 2015.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes. Fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 696p. 1980.

SYSTAT SOFTWARE. **SigmaPlot for Windows**. Version 10.0. (SPSS Inc., Point Richmond, CA, USA). 2006.

UCHIMIYA, M.; WARTELLE, L. H.; KLASSON, K. T.; FORTIER, C. A.; LIMA, I. M. Influence of pyrolysis temperature on biochar property and function as a heavy metal sorbent in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2501-2510. 2011.

UNICEF; WHO. World Health Organization. **Progress on sanitation and drinking water – 2015 update and MDG assessment**. 81p. 2015.

VIEIRA, N. D. **Estudo da pirólise de lodo sanitário visando, sua valorização energética**. (Dissertação de mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 95p. 2012.

WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R. Soybean Disease Loss Estimates for the United States, 1996–2009. **Delta Research Center: Agriculture Experiment Station**. University of Missouri, College of Agriculture, Food and Natural Resources, USA. 2010.

YOU, M. P.; COLMER, T. D.; BARBETTI, M. J. Salinity drives host reaction in *Phaseolus vulgaris* (common bean) to *Macrophomina phaseolina*. **Functional Plant Biology**, v. 38, p. 984–992. 2011.

YUAN, H.; LU, T.; HUANG, H.; ZHAO, D.; KOBAYASHI, N.; CHEN, Y. Influence of pyrolysis temperature on physical and chemical properties of biochar made from sewage sludge. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 112, p. 284–289. 2015.

YUAN, H.; LU, T.; WANG, Y.; CHEN, Y.; LEI, T. Sewage sludge biochar: Nutrient composition and its effect on the leaching of soil nutrients. **Geoderma**, v. 267, p. 17–23. 2016.

