

POTENCIAL E EMPREGO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE
Trichoderma harzianum, Rifai, PARA CONTROLE DE PATOGENOS
DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]

MARTIN HOMECHIN

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LUCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1987

Homechin, Martin
H765p Potencial e emprego de isolados brasileiros de
 Trichoderma harziaum, Rifai, para controle de
 patógenos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]
 Piracicaba, 1987.
 183p. ilus.

Tese - ESALQ
Bibliografia

1. Soja - Controle biológico; 2. Tratamento de
sementes - Identificação I- Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CDD 633.34

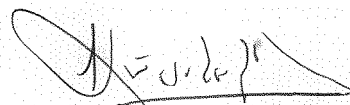
POTENCIAL E EMPREGO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE
Trichoderma harzianum, Rifai, PARA CINTROLE DE PATÓGENOS
DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]

MARTIN HOMECHIN

Aprovada em: 24.06.1987

Comissão Julgadora

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof. Dr. Hashime Tokeshi	ESALQ/USP
Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
Prof. Dr. José Tadashi Yorinori	CNPSO/EMBRAPA
Prof. Dr. Perseu Fernando Santin	CNPDA/EMBRAPA



Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Orientador

Ao meu pai (in memoriam),

minha mãe e irmã

MINHA HOMENAGEM

A minha esposa

Terezinha

e aos meus filhos

Crysthiane e Junior

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Desejo aqui dirigir os meus agradecimentos a todos que de alguma maneira possibilitaram a realização deste trabalho e em especial:

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA (CNPq), pela oportunidade concedida para realização deste curso;

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" ESALQ;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pelos esclarecimentos, sugestões e que, com admirável dedicação, deu-me eficiente orientação;

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia/ESALQ, pelos ensinamentos e esclarecimentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico CNPq, pelo auxílio concedido;

A Prof.ª M. T. Saito, S.ª de Microbiologia de Solo CENA/ESALQ pela valiosa colaboração e esclarecimentos na parte relacionada com bactérias fixadoras de Nitrogênio;

A colega Grisina Oliveira pelos trabalhos referentes à análise estatística;

Ao Eng^o Agr^o Antonio Carlos Maringoni pelas sugestões e colaboração;

Ao Eng^o Agr^o José Tadashi Yorinori, pelas sugestões apresentadas;

Ao Eng^o Agr^o Florestal Celso Garcia Auer pela colaboração e sugestões;

A Eng^a Agr^a Blanca Luz Caarvajal Pinilla pelas sugestões e amizade;

Ao colega Luiz Antonio Oliveira do Departamento de Micologia da Universidade Federal Pernambuco pela colaboração na identificação dos isolados da *Trichoderma*;

Ao Eng^o Agr^o Itamar Soares de Melo do Departamento de Genética da ESALD/USP pelas sugestões e amizade;

Ao Eng^o Agr^o João Vida pelas sugestões e amizade;

Ao Eng^o Agr^o Aloisio Sartorato pelo auxílio no Summary;

Ao Téc. Agrícola Euclides Davidson Romano pela valiosa colaboração na coleta dos isolados de fungos empregados no trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Antonio Vitti, José Rodolfo e Fernanda Yeda Groppo, Pedro da Silva, pela dedicação e colaboração, durante os trabalhos experimentais e amizade;

Aos técnicos do laboratório de genética de
Microorganismos da ESALQ, em especial ao Sr. Antonio Rocha
Campos;

Aos funcionários das Bibliotecas dos
Departamentos de Fitopatologia, Genética e Central da
ESALQ.

SUMARIO

RESUMO	xiii
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Caracterização de fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	4
2.2. Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> com potencial antagônico	6
2.3. Substratos para multiplicação de <i>Trichoderma</i>	10
2.4. Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp aos fungos <i>R. solani</i> , <i>M. phaseolina</i> e <i>S. rolfsii</i>	15
2.5. Quantificação de <i>Trichoderma</i> spp no solo .	19
2.6. Substratos para desenvolvimento	22
2.7. Obtenção de novos biótipos de <i>Trichoderma</i> spp	24
2.8. Influência de <i>Trichoderma</i> spp a <i>Rhizobium</i>	26
2.9. Ação de fungicidas e herbicidas sobre fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	27
2.9.1. Ação de fungicidas	27
2.9.2. Efeitos de herbicidas	29
2.10. Tratamento biológico de sementes	34
3. MATERIAL E METODOS	37
3.1. Materiais	37

3.1.1. Solo e restos vegetais utilizados em isolamentos	37
3.1.2. Isolados de fungos utilizados nos diferentes experimentos	37
3.1.3. Isolados de <i>Trichoderma</i>	39
3.1.4. Meios de cultura e soluções utilizadas	40
3.1.5. Soluções	44
3.1.6. Fungicidas	45
3.1.7. Herbicidas	46
3.1.8. Hospedeiro teste	46
3.1.9. Equipamentos para irradiação de esporos de <i>Trichoderma</i> para obtenção de mutantes	47
3.2. Métodos	47
3.2.1. Amostragem	47
3.2.2. Identificação e conservação de isolados de fungos	49
3.3. Experimentos	50
3.3.1. Comparação entre meios de cultura e diluições de solo para isolamento do fungo <i>Trichoderma</i> sp. a partir de solo	50
3.3.2. Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. com potencial antagônico	51
3.3.3. Teste de antagonismo "in vitro" ...	53

3.3.4. Tratamento de esporos de <i>T. harzia-</i> <i>num</i> (TH32) com luz ultravioleta e radiação gama visando obtenção de novos biótipos	54
3.3.5. Antagonismo de cinco isolados sel- vagens de <i>Trichoderma</i> sp. (TH10, TH 20, TH32, TH35 e TH45) e duas vari- antes morfológicas do isolado TH32 (VMT-1; VMT-2), aos fungos <i>Rhizoc-</i> <i>tonia solani</i> , <i>Macrophomina phaseo-</i> <i>lina</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> , em meio de BDA	59
3.3.6. Antagonismo a <i>R. solani</i> , em semen- tes contaminadas artificialmente ..	61
3.3.7. Substratos para multiplicação de <i>T.</i> <i>harzianum</i> (TH32)	62
3.3.8. Eficiência do tratamento biológico e químico de sementes de soja quan- to a emergência em campo	63
3.3.9. Eficiência do tratamento biológico de sementes, sulco e combinação sulco e sementes, quanto a emergên- cia das plântulas, sobrevivência em plantas e solo	66

3.3.10. Sobrevivência de isolados de <i>T. harzianum</i> em sementes de soja tratadas com suspensão de esporos	69
3.3.11. Sensibilidade "in vitro" de uma linhagem selvagem e duas variantes morfológicas de <i>T. harzianum</i> , aos fungicidas Benomil, Thiabendazole, Carboxin, Thiram e Iprodione + thiram	71
3.3.12. Sensibilidade "in vitro" de isolados selvagens e duas variantes morfológicas de <i>T. harzianum</i> aos herbicidas 2,4-D, metribuzin e trifluralin	73
3.3.13. Influência de sementes tratadas com fungicidas sobre diferentes isolados de <i>T. harzianum</i>	74
3.3.14. Compatibilidade entre <i>Rhizobium japonicum</i> , um isolado selvagem de <i>Trichoderma</i> (TH32), duas variantes morfológicas VMT-1 e VMT-2 e mistura destes com thiram	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1. Comparação da eficiência de meios de cultura para isolamento de <i>Trichoderma harzianum</i> do solo	79

4.2. Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. com potencial antagônico a patógenos	83
4.3. Inibição do crescimento micelial dos fungos <i>R. solani</i> , <i>M. phaseolina</i> e <i>S. rolfsii</i> , por diferentes isolados de <i>T. harzianum</i> ..	88
4.4. Sobrevivência de <i>T. harzianum</i> a luz ultra-violeta e radiação gama e, obtenção de novos biótipos	91
4.4.1. Sobrevivência de <i>T. harzianum</i> a luz ultra-violeta e obtenção de novos biótipos de <i>T. harzianum</i>	91
4.4.2. Sobrevivência de <i>T. harzianum</i> a radiação gama e obtenção de novos biótipos	94
4.5. Influência de diferentes isolados de <i>T. harzianum</i> no tratamento de sementes de soja inoculadas artificialmente com <i>Rhizoctonia solani</i>	98
4.6. Tolerância de diferentes isolados de <i>T. harzianum</i> a fungicidas presentes em sementes de soja tratadas	100
4.7. Efeito do tratamento biológico e químico sobre a sanidade de sementes e emergência de plântulas de soja em condições de campo	103

4.8. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas e esporos de <i>T. harzianum</i> produzidos em substratos naturais, sobre a emergência de plântulas em condições de campo	105
4.9. Comparação da eficiência do tratamento de sementes com esporos de um isolado selvagem e dois mutantes morfológicos de <i>T. harzianum</i> , produzidos em substratos naturais e avaliação em condições de campo ...	107
4.10. Sobrevivência do fungo <i>T. harzianum</i> aplicado sob a forma de esporos em sementes de soja	113
4.11. Efeito de diferentes substratos utilizados para multiplicação; modos de aplicação de <i>T. harzianum</i> (TH32), no desempenho e sobrevivência, em condições de campo	116
4.12. Influência do tratamento químico e biológico de sementes sobre a nodulação, em raízes das plantas de soja por <i>Rhizobium japonicum</i>	128
4.13. Ação do fungicida sobre o crescimento e esporulação de diferentes isolados de <i>T. harzianum</i>	133
4.14. Influência de herbicidas sobre o crescimento e esporulação de diferentes isolados de <i>T. harzianum</i> "in vitro"	140

5. CONCLUSIONES	151
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	154

POTENCIAL E EMPREGO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE
Trichoderma harzianum, Rifai, PARA CONTROLE DE PATÓGENOS
DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]

Aluno: MARTIN HOMECHIN

Orientador: Prof. Dr. JOAO LUCIO DE AZEVEDO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar aspectos que envolvem a utilização de *Trichoderma harzianum*, para controle de patógenos em plantas de soja (*Glycine max*), em condições de laboratório e campo. De 35 isolados de *T. harzianum* obtidos a partir de rizosfera, solo, sementes e partes de plantas de soja e ervas daninhas, pela semeadura em meio de Martin (MARTIN, 1950), modificado para *Trichoderma*, cinco deles foram selecionados de acordo com a capacidade de inibir o desenvolvimento de *Rhizoctonia solani* "in vitro". Os cinco melhores isolados identificados como *T. harzianum*, comportaram-se de maneira diferenciada para antagonismo a *Macrophomina phaseolina*, *R. solani* e *Sclerotium rolfsii*. Das duas técnicas utilizadas para indução de novos biótipos apenas a radiação gama permitiu a obtenção de

dois variantes morfológicos (VMT-1 e VMT-2). Nos testes de antagonismo a *R. solani*, "in vitro" uma das variantes morfológicas foi superior. Os fungicidas benomil, thiabendazole, iprodione + thiran exerceram efeito negativo sobre o crescimento e esporulação dos isolados ensaiados. Em sementes de soja tratadas com captan, thiram, e inoculadas com suspensão de esporos de *T. harzianum*, não ocorreu inibição da germinação dos esporos do antagônico; o mesmo não ocorreu em sementes tratadas com thiabendazole. Os herbicidas trifluralin, 2,4-D, metribuzin, alachlor, sethoxydin exerceram efeito negativo no crescimento e esporulação "in vitro" de *T. harzianum*, de acordo com a concentração. Dos 20 diferentes substratos naturais avaliados quanto à produção e viabilidade de esporos de *T. harzianum* destacaram-se bagacilho + farelo de arroz (1:1), bagacilho, grãos de aveia preta, farelo de arroz, quirera de milho e arroz. Destes, alguns comprovaram eficiência quando utilizados no campo em: a. tratamento de sementes de soja com suspensão de esporos; b. tratamento de sementes mais tratamento de sulco com substrato infestado e c. tratamento de sulco. Dos três sistemas de utilização do antagônico e dos substratos, o melhor resultado foi obtido com o tratamento de sementes com suspensão de esporos produzidos em quirera ou mesmo farelo de milho, bagacilho + farelo de arroz. Em sementes tratadas com

suspensão de esporos e armazenadas em ambiente à temperatura variável de 19 a 30°C, o *T. harzianum* sobreviveu por um período de 240 dias. Em raízes de plantas de soja originárias de sementes inoculadas com *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan e tratadas com suspensão de esporos foi observado um número menor de nódulos.

POTENCIAL AND USE OF BRAZILIAN ISOLATES OF *Trichoderma harzianum*, Rifai TO SOYBEANS [*Glycine max* (L.) Merrill.],
PATHOGENS CONTROL

Author: MARTIN HOMECHIN

Adviser: Prof. Dr. JOAO LUCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

The objectives of the present research was to study different aspects of *Trichoderma harzianum* as seed soil treatments in the control of soybean (*Glycine max*) pathogens under field and laboratory conditions. Among 35 isolates of *T. harzianum* obtained from rhizosphere, soil, seeds, soybean plant parts and weeds by plating in Martin medium (MARTIN, 1950) modified for *Trichoderma*, five were selected based on their capacity to inhibit the growth of *Rhizoctonia solani*. The five isolates behaved differently with respect to the antagonism against *Macrophomina phaseolina*, *R. solani* and *Sclerotium rolfsii*. From the two techniques used to induce mutation (gamma radiation and ultra-violet light treatment) radiation produced two morphological and physiological variants (VMT-1 and VMT-2). In all the tests carried out only one of the two variants was superior in inhibiting growth of *R. solani* "in vitro"

compared to the wild type. Fungicides such as benomyl, thiabendazole and iprodione + thiram tested under varied concentrations affected growth and sporulation of *T. harzianum* isolates differently. Captan, thiram as seed dressing followed by inoculation of *T. harzianum* did not cause any spore death. However, thiabendazole completely inhibited spore germination of *T. harzianum* isolates. The herbicides trifluralin, 2,4-D, metribuzin, alachlor and setoxydin added to the culture media in different concentrations had a negative effect on sporulation of *T. harzianum* which was inhibited at 0.1 ppm. The negative effect dependent upon the concentration of active ingredient of the herbicide.

Among 20 natural substrates evaluated for spore production and viability sugar cane straw ("bagacilho") + rice bran (1:1), sugar cane straw ("bagacilho"), oat grains, rice of bran corn corn of bran and rice flow were the best. Some of these substrates proved their efficiency in the three methods of *T. harzianum* application in the field: soybean seed treatment with spore suspension; seed treatment + furrow seeding with infested substrate, and furrow seeding. Out of the three methods of fungal application seed treated with spore suspension, produced on bran and flow of corn and sugar cane straw ("bagacilho") + rice flow gave the best results. These treatment gave for a better soybean

seed quality that came from the contaminated seed lot with high level of *Aspergillus* spp and higher percentage of seed emergence, seed survival and root health evaluated at the end of the crop cycle. In treatment with spori suspension and stored room temperature (19 a 30°C) it was observed that *T. harzianum* isolates, survived for a period of 240 days. The percentage of survival varied with time of storage and isolate used. In plants originated from seeds coated with *R. japonicum* suspension and *T. harzianum* spores there was a decrease in the number of nodules/plant.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é afetada por diversas doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. As causadas pelos fungos são as mais importantes, ocasionando prejuízos em níveis variáveis, como por exemplo, 12% com incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e 16,4% a 21,4% com *Septoria glycines* Hemmi e *Cercospora kikuchii* (Mats. k Tomoy.) Gardner (YORINORI, 1985). A grande maioria dos patógenos são veiculados via sementes e possuem estruturas de sobrevivência no solo, mesmo em ausência do hospedeiro suscetível. Dentre estes, a incidência dos fungos *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Aspergillus* spp, podem representar uma ameaça já no início de implantação da cultura, provocando o apodrecimento das sementes e em consequência, falhas na germinação ou diminuição do estande de plantas, pelo tombamento de plântulas. Atualmente, os meios de controle desses patógenos resumem-se em: a. rotação de culturas

com gramíneas e pousio, que limitam em algumas situações a implantação da cultura; b. tratamento de sementes com fungicidas, que onera o custo de produção da cultura, nem sempre apresenta boa eficiência, além do inconveniente de que sementes uma vez tratadas e não semeadas, não mais podem ser utilizadas para consumo ou indústria; também podem promover alterações prejudiciais à população microbiana do solo, fator pouco estudado em nossas condições.

O conhecimento de novas alternativas para controle desses patógenos, como a aplicação de microrganismos antagônicos via sementes e/ou sulco de semeadura pode constituir uma boa alternativa, principalmente quando o objetivo for o controle integrado. Dentre os microrganismos antagônicos, espécies do gênero *Trichoderma*, têm sido empregadas em experimentos de controle de patógenos em sementes, principalmente em países onde não é permitida a utilização de fungicidas (KELMAN & COOK, 1977).

Dentro desse contexto de idéias é que foram conduzidos os experimentos objetivando: a. identificar um meio de cultura para isolamento e quantificação do fungo *Trichoderma* a partir de solo e tecidos vegetais; b. isolar e caracterizar o fungo *Trichoderma* com potencial antagônico a patógenos como *R.*

solani, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* e *Aspergillus*; c. obter biótipos por meio de luz UV e radiação gama e comparar com a linhagem selvagem; d. testar substratos naturais e de baixo custo para multiplicação de *Trichoderma* sp.; e. identificar método viável e prático de aplicação desse antagonico para controle de patógenos de culturas como a soja; f. verificar a tolerância de isolados selvagens e mutantes de *T. harzianum* a fungicidas e herbicidas e g. verificar a compatibilidade entre o fungo *T. harzianum* e a bactéria *R. japonicum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização de fungos do gênero *Trichoderma*

As espécies de Hiphomicetos do gênero *Trichoderma* Pers. ex. Fr. não são distinguidas facilmente pela simples comparação das culturas e sim, baseadas em caracteres como: tipo de ramificação dos conidióforos e modo de disposição dos filíades. Nesse gênero de fungo são incluídos nove diferentes espécies (RIFAI, 1969). Essas espécies ocorrem em solos de todo o mundo e têm sido identificadas como microparasitas de patógenos de plantas, eficientes contra *A. mellea*, *Pytium* spp, *Phytophthora* spp, *R. solani*, *S. rolfsii*, *Heterobasidium annosum*; *M. phaseolina* (BAKER, 1981; COOK & BAKER, 1983; ELAD et alii, 1980, 1982, 1983; SHOKES, 1977; THIRUMALACHAR & OBRIEN, 1977).

PLOETZ et alii (1985) observaram que dentro da população de espécies de fungos presentes em sistemas de rotação de culturas com soja e centeio em

sistema de plantio direto, as do género *Trichoderma* eram as mais frequentes.

Temperatura, umidade, aeração, pH e teor de matéria orgânica do solo têm influência na sobrevivência do *Trichoderma* em solo natural ou infestado artificialmente (BAKER & COOK, 1974; CHET et alii, 1979; CHU & WU, 1981a; DANIELSON & DAVEY, 1973; MIHUTA-GRIM & ROWE, 1986). *T. viride* é um antagonista ativo, em condições de solo úmido, porém é inibido em presença de umidade elevada com pH acima de 5,4 (ANDERSON, 1962; 1964). CHET & BAKER (1980) observaram antagonismo ativo de *T. harzianum* em valores de pH menores que 6,5; a faixa ótima de pH situa-se entre 4,5 a 5,3.

A ação do *Trichoderma* a patógenos tem sido observada como sendo devida ao micoparasitismo, competição agressiva, crescimento micelial sobre hifas hospedeiras e produção de antibióticos (BAKER, 1980; CHET et alii, 1981; CHU e WU, 1981; COOK & BAKER, 1983; DENIS & WEBSTER, 1978; LIU & BAKER, 1980). COOK & BAKER (1983) observaram o desenvolvimento de hifas de *Trichoderma* sobre o conteúdo celular da hifa hospedeira extravasado após a perfuração desta pela hifa parasitária. Esse mecanismo é explicado pelo fato de algumas espécies de *Trichoderma*, como por exemplo *T. hamatum* e *T. harzianum* produzirem enzimas como quitinase e B - (1 - 3) -

glucanase, as quais causam exólise da hifa hospedeira, principalmente em hifas de fungos como *Pythium* spp, *R. solani* e *S. sclerotium* (MITCHEL, 1973).

Filtrados de culturas de algumas espécies de *Trichoderma*, têm sido identificados como possuidores de efeito sobre o crescimento micelial de *R. solani*, *Fusarium* sp. e *S. sclerotiorum* (ALLEN & HAENSLER, 1935; STESSSEL et alii, 1953; SYCHEV & SHAPOSHNIK, 1982; WASKMAN & HORNING, 1943).

2.2. Seleção de isolados de *Trichoderma* com potencial antagônico

Um campo importante na pesquisa sobre o controle biológico de patógenos é a seleção de organismos antagônicos, para fins de uso direto, manipulação genética ou utilização de irradiação gama ou luz ultravioleta para indução de novos biótipos (PAPAVIZAS et alii, 1982).

Segundo alguns autores (AYERS & ADAMS, 1979; BAKER & COOK, 1974; HENIS, 1984), as principais características dos antagonista para que sejam eficientes, é que possuam capacidade para competirem por nutrientes, produzirem antibióticos ou atuarem por parasitismo direto e lise. Estas características

coincidem com as afirmações de ELAD *et alii* (1980), de que as espécies de *Trichoderma*, que possuem capacidade para hiperparasitarem fungos patogênicos, podem ser classificadas como antagonistas altamente eficientes.

CHANG & KOMMEDHAL (1968), afirmam que os microorganismos antagônicos são favorecidos pela rizosfera, superfícies de raízes e de sementes. Por outro lado, SUBBA RAO & BAILEY (1961) observaram que espécies de *Trichoderma* se acham associadas à rizosfera e ao rizoplano em variedades com resistência moderada, o que pode explicar parte de sua ação no controle das doenças. Em solos com elevada densidade de propágulos de *Trichoderma* (CHET & BAKER, 1981) afirmam ser este um dos responsáveis pela supressividade desses solos.

ARTIGUES & DAVET (1982) afirmam que a capacidade de isolados de espécies de *Trichoderma*, para destruir determinados patógenos varia em função de sua origem e de soma de atividades desenvolvidas por enzimas como quitinase e glucanase. Por outro lado, CHET & BAKER (1980) afirmam que o mecanismo de antagonismo de *Trichoderma* a *R. solani* é o parasitismo seguido de lise e antibiose.

WASKMAN & HORNING (1943) enfatizam que muitos métodos podem ser empregados para o isolamento e seleção de fungos antagonistas. Inicialmente a natureza

do antagonismo pode ser definida em meio sólido, seja pela liberação de antibiótico no meio, ou por hiperparasitismo, principalmente de hifas.

STESSEL *et alii* (1953) propuzeram que o critério de seleção poderia ser em função de: a. seleção de microorganismos antagonistas do solo utilizando fungos patógenos de plantas; b. inibição de dado número de patógenos; c. produção de antibiótico em meio líquido e d. estabilidade do antibiótico produzido. Afirmam que *Trichoderma* é mais oportunista que parasita obrigado e, requer uma base alimentar para atacar hifas vivas no solo e, para isso, necessita ser dotado de características como: capacidade para competir com a microflora e superar a fungistase do solo; ser produtor de enzimas líticos e reconhecer sítios específicos no micélio hospedeiro.

BELL *et alii* (1982) ensaiaram 77 diferentes isolados de *Trichoderma* para antagonismo a *R. solani* e *S. rolfssii*, pela técnica de culturas pareadas colocando os patógenos 24 horas antes do *Trichoderma*. Avaliaram a eficiência baseado em sistema de notas, sendo: 1 ausência completa de inibição do patógeno e 5 inibição completa. Consideraram como antagonistas aos patógenos os isolados de *Trichoderma* com médias $<$ ou $=$ 2. Levantaram a possibilidade de outros fatores, além do genético e raças, estarem envolvidos.

HADAR et alii (1984), estudando a performance de vários isolados de *Trichoderma* no controle de patógenos do solo, observaram que a capacidade para suprimir o patógeno depende de vários fatores e que, além da presença de grande número de propágulos, é necessário que haja interação com o ambiente. Constataram ainda que os isolados nativos do solo podem ser melhor adaptados que os introduzidos por possuírem capacidade para coexistir com a microflora nativa.

MIHUTA-GRIM & ROWE (1986), para selecionar espécies de *Trichoderma* antagonistas potenciais, utilizaram 225 isolados de diferentes procedências e obtidos de solo orgânico e rizosfera de plantas desenvolvidas em solo mineral e orgânico. A maior recuperação de isolados foi a partir de solos e não da rizosfera. Verificaram que do total, apenas 15% controlaram eficientemente *R. solani*. Lembraram estes pesquisadores, que o sistema de isolamento e avaliação deve ser prático e econômico.

ALLEN & HAENSELER (1935) observaram, em seus experimentos, que testes de laboratório são indicativos do efeito de *Trichoderma*, sobre os patógenos em que forem ensaiados, podendo ser utilizados principalmente em experimentos de seleção dos melhores isolados.

2.3. Substratos para multiplicação de *Trichoderma* spp

O emprego de microrganismo antagonistas tem sido investigado no controle de vários patógenos da soja e dentre eles, *R. solani* (ALLEN & HAENSELER, 1935; CHET & BAKER, 1981; ELLAD et alii, 1980, 1981, 1983; LIU, 1980; WEINDLING, 1934); *S. rolfsii* (ALMEIDA et alii, 1981; ELAD et alii, 1980; HENIS et alii, 1983; WELLS et alii, 1980, 1982, 1983); *M. phaseolina* (GHAFFAR, 1968; NORTON, 1954; SHOKES, 1977; THIRUMALACHAR & OBRIEN, 1967). Dentre os vários microorganismos empregados, fungos do gênero *Trichoderma* são os mais estudados. Isso porque, segundo CHET & BAKER (1980; 1981), esse fungo micoparasita efetivo produz b (1 - 3) glucanase e quitinase, enzimas que possuem capacidade para degradar a parede celular de hifas de patógenos.

ALLEN & HAENSELER (1935), em estudos de laboratório e casa-de-vegetação, utilizando como plantas testes pepino e ervilha de jardim, em solo inoculado, simultaneamente com *R. solani* e *T. viride*, observaram que este último interfere com a atividade normal do patógeno, a exemplo do observado "in vitro". verificaram redução na porcentagem de tombamento plântulas em ambos hospedeiros de *Rhizoctonia*, sendo que na ervilha de jardim, o efeito

foi menos pronunciado. Observaram ainda que filtrados de colônias com cinco dias de idade foram letais ao patógenos quando empregado concentrado ou diluído a 40% e sua eficiência diminuía a partir da autoclavagem a 80°C. WEINDLING (1934), estudando a ação de *Trichoderma lignorum*; *T. koningii* e *T. album*, a *R. solani*, em meio de cultura, verificou que o princípio letal era excretado no meio por hifas jovens e levantou a hipótese dessa ocorrência ser devido a uma simples substância química, podendo esta ser de natureza enzimática ou autolítica, tendo como principal característica a decomposição. Observou que a maior efetividade do princípio letal a *R. solani* é produzido dois dias após a germinação, dos esporos, em condições de solo ácido e estéril.

ELAD et alii (1980), trabalhando em condições de casa-de-vegetação com solo inoculado com *R. solani* e em campo com solo infestado naturalmente, constataram que o tratamento do solo com *T. harzianum* antes do plantio de feijão, tomate e algodão foi um eficiente agente de controle biológico protegendo as plantas contra *R. solani* em qualquer uma das condições. O isolado de *T. harzianum* foi desenvolvido em câmara iluminada durante 14 dias a 30°C, em substrato composto de: 3 partes de farelo de trigo, 1 parte de serragem de madeira e 4 partes de água de torneira (volume/volume);

as dosagens utilizadas nas inoculações do solo foram: 150 g/m² para a cultura do feijão; 30 g/m² para a cultura do algodão e 50 g/m² para a cultura do tomateiro. Observaram ainda aumento no rendimento e que a ação foi devido ao ataque direto de lise das hifas do patógeno. Verificaram também alta atividade antagonística mesmo em presença de doses elevadas PCNB, níveis de pH e baixas temperaturas. Levantaram a possibilidade de que alterações no método de aplicação do antagônico ao solo pode produzir melhores resultados. Além disso, o substrato de multiplicação empregado promoveu o crescimento das plantas, com uma vantagem sobre os pesticidas por não causar fitotoxidade. Por outro lado, LIU & BAKER (1980) afirmam que a supressividade a *R. solani* em monocultura, por *Trichoderma*, deve-se ao aumento da sua população seguido de decréscimo na densidade de inóculo do patógeno, sendo isso válido ainda para monocultura de pepino e rabanete, não acontecendo o mesmo para as culturas de beterraba, alfafa e trigo. Outro efeito importante observado é que *T. harzianum* é mais facilmente isolado de hifas de *R. solani*, incubados em solo supressivo oriundo da monocultura de rabanete, e dificilmente de solo não supressivo, explicando em parte a condição de supressividade de alguns solos a fungos patogênicos. Não observaram entretanto, hifas de *R. solani* colonizadas

internamente por hifas de *Trichoderma*, mas sim com o antagonico aderido às paredes.

CHET & BAKER (1981), a exemplo de outros pesquisadores, observaram que a supressividade de um solo a *R. solani* está em função do pH e da população microbiana predominante, sendo mais pronunciado para fungos. Em experimentos com dois solos observaram números de 10^3 e 10^6 propágulos por grama de solo, respectivamente para solo barro-argiloso (pH 5,1) e orgânico (pH 6,0). Quando inoculados com 10^6 propágulos de *T. hamatum* por grama de solo infestado naturalmente com *R. solani*, o tombamento de plântulas ocorreu somente nos três primeiros plantios no solo barro-argiloso com pH 5,1, reduzindo-se de 70 para 22%. O mesmo não foi observado para o solo orgânico com pH 6,0, dando indicação que a composição física tem influência no antagonismo e no desenvolvimento da supressividade. O solo com baixo pH favoreceu o aumento de *Trichoderma* antagonico e em consequência a supressividade. As espécies predominantes isoladas foram *T. hamatum*; *T. viride* e especialmente *T. hamatum*. O *T. hamatum* ensaiado e testado posteriormente promoveu o controle do "damping-off" por *R. solani*, em plântulas de rabanete e, "in vitro" produziu antibiótico e enzimas como celulose, b-(1-3) glucanase e quitinase, além de enzimas

degradadoras, explicando a sua capacidade para controlar o patógeno.

ELAD et alii (1981), em campo de produção de frutos e mudas de moranguinho, infestado naturalmente com *R. solani*, conseguiram reduções na incidência da doença em índices variáveis de 18 a 46% em função da aplicação de 50 g (peso seco) por m² de substrato farelo de trigo colonizado por *T. harzianum*, antes do plantio. O propágulo de antagonista variou de 10⁷ esporos no momento da aplicação para 10⁴ esporos/g de solo 150 dias após.

CHET & ELAD (1982) não observaram qualquer atividade antagônica de *T. harzianum* e *R. solani*, quando este foi desenvolvido em meio simples, porém quando desenvolvido em tecido celular do patógeno, produziu β (1-3)-glucanase e quitinase e se mostrou altamente eficiente "in vitro".

GARIBALDI (1983), inoculando *T. hamatum* na concentração de 10⁶ conídios/g de solo, antes da semeadura com ervilha e, comparando a testemunha não inoculada, observou que o primeiro se tornou supressivo a *R. solani*, ocorrendo redução na porcentagem de tombamento de plântulas, sendo essa situação mais acentuada em solo acidificado.

MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986), ensaiaram 225 isolados de *Trichoderma* em casa-de-vegetação com o

objetivo de verificar o seu potencial antagonista a *R. solani* e verificaram que destes somente 15% controlaram efetivamente o patógeno em plântulas de rabanete. Observaram que as espécies ocorrentes eram variáveis, sendo que o *T. hamatum* foi o mais abundante em solos orgânicos e *T. harzianum* em solo mineral; e os melhores isolados foram os obtidos de solo orgânico da rizosfera de plantas de rabanete.

2.4 Antagonismo de *Trichoderma* spp aos fungos *R. solani*, *M. phaseolina* e *S. rolfsii*

O emprego de microrganismos antagonistas, tem sido investigado como um método alternativo para controle do fungo *R. solani*. Espécies de fungos do gênero *Trichoderma* tem mostrado alguma eficiência no controle desse patógeno, em casa-de-vegetação em hospedeiros como: algodão, batata, beringela, cebola, feijão, ervilha, morango, rabanete (CHET et alii, 1970; CHET & BAKER, 1981; CHET & ELAD, 1982; HADAR et alii, 1979; HARMAN et alii, 1980, 1981; KUTER et alii, 1983; NELSON & HOITING, 1983; PAPAIVIZAS et alii, 1982; WIJETUNGA et alii, 1984); e em campo, em culturas de cravo e morango (CHET et alii, 1970; ELAD et alii, 1981).

Segundo ELAD et alii (1982), o modo de ação de *T. harzianum* sobre *R. solani* é através da liberação das enzimas líticas extracelulares b (1-3) glucanase e quitinase no meio de crescimento e no solo. Controle satisfatório de *R. solani* em plântulas de algodão, feijão, ervilha, pepino, tem sido conseguido através do tratamento das sementes com suspensão de esporos de *T. harzianum*; *T. hamatum*; *T. koningii*, antes da semeadura (HADAR et alii, 1984; ELAD et alii, 1982; PAPAIVIZAS, 1981).

A supressividade de alguns solos cultivados à *R. solani*, tem sido justificado por alguns pesquisadores como sendo devido a alta população de *Trichoderma* spp, infestando naturalmente ou artificialmente estes solos (BAKER et alii, 1967; CHET & BAKER, 1981; COOK & BAKER, 1983; LIU & BAKER, 1980; OLSEN et alii, 1967).

Hifas do fungo *M. phaseolina* foram parasitados por *T. viride*, em meio de cultura, em solo esterilizado ou não, ocorrendo invasão das colônias além da linha de junção, redução no crescimento e número de hifas, e esporulação do antagônico sobre as colônias (FERREIRA-CERRATO, 1976; GHAFAR, 1968; NORTON, 1954). o modo de ação observado foi a produção de enzimas (NORTON, 1954); e enrolamento de hifas (GHAFAR, 1968).

FERREIRA-CERRATO (1976) concluiu em seus estudos do parasitismo de *T. viride* a *M. phaseolina* "in vitro", que em meio de cultura suplementado com extrato de levedura e glicose o parasitismo foi estimulado.

A interação entre *Trichoderma* spp e *S. rolfsii* é um processo complexo dependente de fatores como estágio de desenvolvimento e idade do esclerócio. O potencial de inóculo, a capacidade de competição com a microflora e nutrientes, produção de enzimas líticos e o reconhecimento de outros enzimas específicos no micélio hospedeiro exercem influência na luta entre o antagonista e o seu hospedeiro (HENIS, 1984).

ARTIGUES & DAVET (1982) verificaram que a capacidade de isolados de *Trichoderma* de diferentes origens, para destruir fungos formadores de esclerócios está correlacionada com a atividade de enzimas como *B*-(1-3) glucanase e quitinase. ELAD et alii (1983) constataram alta atividade de *B*-(1-3) glucanase e quitinase em culturas duplas em agar, onde *T. harzianum* parasitou *S. rolfsii*.

SCHIPPERS & GAMS (1979) estudaram a ação de *Trichoderma* sobre esclerócios e verificaram que estes são mais suscetíveis ao antagônico após a germinação. HENIS et alii (1983) e COOK & BAKER (1983) concluíram em seus estudos que a melhor estratégia para o controle

desse patógeno era a aplicação do antagonista antes da germinação dos esclerócios. A base experimental para este fato foi evidenciado por HENIS et alii (1983), que concluíram que o *Trichoderma* fungo mais oportunista que parasita obrigado e, requer uma base alimentar para atacar hifas vivas no solo.

BELL et alii (1982) estudaram a atividade de 77 isolados de *Trichoderma* a *S. rolfsii* "in vitro" em meio V-8, e observaram que um único isolado do patógeno pode ser antagonizado por um ou mais isolados desse gênero. ALMEIDA & LANDIM (1981), observaram que isolados de *Trichoderma* podem se comportar como hiperparasita ao patógeno, em meio de batata-dextrose-ágar.

Em casa-de-vegetação e campo tem sido observado o antagonismo de *T. harzianum* a *S. rolfsii* em culturas de amendoim, batata, beterraba açucareira, tomate (BACKMAN & RODRIGUEZ-KABANA, 1975; DAVET et alii, 1981; ELAD et alii, 1981; HADAR et alii, 1979; WELLS et alii, 1972).

TROUTMAN et alii (1980) verificaram a presença de *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. viride* associados a esclerócios desenvolvidos naturalmente em solos em cultivo. WEINDLING (1934) reporta um dos trabalhos pioneiros de antagonismo de *T. lignorum* sobre *S. rolfsii* e mostra o potencial desse antagonístico ao patógeno.

2.5. Quantificação de *Trichoderma* spp no solo

Existem dificuldades técnicas para a quantificação de microrganismos do solo, bem como a sua classificação. JOHNSON *et alii* (1959) e GARRET (1963) atentam para o emprego da técnica da diluição em série do solo e da semeadura dessas diluições em ágar e concordam que este é um método bem estudado e padronizado para o levantamento de microrganismos. MONTEGUT (1960) aponta uma série de vantagens sobre os outros métodos, sendo uma o da inoculação direta do solo em placas de Petri.

A estimativa quantitativa de espécies de *Trichoderma* no solo é sempre dificultada devido ao rápido crescimento de outros fungos em meios de ágar convencionais. Porém existe um grande interesse no conhecimento e desenvolvimento de meio seletivo para o seu isolamento. Para esse gênero de fungo, o meio de Martin rose-bengal ágar, tem sido citado como sendo eficiente, por permitir o seu crescimento (JOHNSON & CURL, 1972; MARTIN, 1950; TSAO, 1970).

MOUBASHER (1965), MUGHOGHO (1968) e SMITH & DOWSON (1944) utilizaram meio de extrato de solo - ágar suplementado com rose-bengal para a quantificação de espécies de *Trichoderma*, porém tiveram problemas sérios com o crescimento rápido de outros fungos.

DANIELSON & DAVEY (1973), utilizaram meio de levedura-dextrose-ágar para quantificação e distribuição de várias espécies de *Trichoderma* em solos de florestas e, obtiveram resultados satisfatórios quando comparados com essa mesma avaliação em meio de Martin. Por outro lado, LIU & BAKER (1980), conseguiram boa seletividade, para o isolamento de espécies de *Trichoderma* em diluição de solo a 10^{-4} quando utilizaram o meio de Martin-rose bengal-estreptomicina-ágar, suplementado com 100 ug/ml de PCNB.

Além de meios tradicionais para a quantificação de microorganismos do solo, alguns pesquisadores tem desenvolvido ou adaptado meios tornando-os seletivos, especialmente para espécies de *Trichoderma*.

ELAD et alii (1981) desenvolveram o meio seletivo para isolamento quantitativo de espécies de *Trichoderma* do solo (TSM), utilizando cloranfenicol como agente inibidor de bactérias, PCNB e p-dimetil aminobenzenodiazó sodium sulfonate (Dexon 60% WP) como inibidores e seletivos de fungos. Conseguiram excelentes resultados na recuperação de 15 isolados de *Trichoderma* previamente adicionados ao solo. Não constatarem diferenças na contagem de colônias do fungo, quando empregaram esse meio e diluição 10^{-3} . Ótimos resultados

foram conseguidos, na quantificação da população indígena desse fungo em solos naturais. Afirmam que em solos inoculados artificialmente, o tipo de solo e outros microrganismos não exercem influência na recuperação de *Trichoderma*.

PAPAVIZAS (1981) e PAPAVIZAS & LUMSDEN (1980) desenvolveram um meio seletivo para isolamento direto e estimação da densidade de inóculo de diferentes espécies de *Trichoderma* presentes no solo (TME). Empregaram como base o meio V-8 ao qual adicionaram: sulfato de neomicina, bacitracin; penicilina G, cloroneb, nistatina, clorotetraciclina HCL, propionato de sódio e pentacloronitrobenzeno, como agentes antimicrobianos. Com esse meio, conseguiram uma recuperação superior, em 10 diferentes solos, em comparação ao meio de Martin-rose bengal-estreptomicina-ágar (RBS-PCNB), contendo 100 ug de PCNB por litro de meio. Entretanto PAPAVIZAS (1981) aponta desvantagens do TME como: a. o propionato de sódio presente no meio proporciona o desenvolvimento de fungos da ordem Mucorales que desenvolvem colônias sobre as de *Trichoderma*, dificultando a contagem das mesmas; b. cloroneb a 100 ug i.a./ml de meio pode ser inibidor de isolados de *Gliocladium* de interesse em estudos de antagonismo; e c. o suco V-8 utilizado como meio basal é monopólio, não sendo facilmente adquirido.

2.6. Substratos para desenvolvimento

Um dos grandes problemas na aplicação de antagonistas ao solo é a sua incapacidade de se estabelecer no novo ambiente e se tornarem resistentes a microflora (ALEXANDER, 1971; BOOSALIS & MANKAU, 1970). A adição de substrato colonizado pelo antagonista pode não ser útil se os nutrientes nele contidos estimularem o crescimento do patógeno (COOK & BAKER, 1983). Segundo FAPAVIZAS *et alii* (1982), o *T. harzianum* pode sobreviver em solo sem uma boa base alimentar por mais de 130 dias, mas não se multiplica na rizosfera de plântulas de feijão e ervilha, quando não dispuser de substrato e condições favoráveis para tanto.

Ultimamente tem-se tentado eliminar parte desses problemas citados através da aplicação dos agentes de biocontrole ao solo, após terem sido desenvolvidos em substratos que sirvam como alimento base (BACKMAN & RODRIGUEZ-KABANA, 1975; HADAR *et alii*, 1972). Segundo DAVEY & FAPAVIZAS (1960), a adição de grandes quantidades de resíduos orgânicos ao solo, contendo o antagonista pode ser motivo de sucesso no controle de patógenos por antagonistas.

Diferentes substratos tem sido utilizados na produção de inóculo de antagonistas, principalmente

para espécies de fungo do gênero *Trichoderma*, como farelo de trigo (CHANG et alii, 1986; ELAD et alii, 1980; HADAR et alii, 1980) farelo de trigo + turfa 1:1) (CHANG & KOMMEDAHL, 1968) grãos de centeio (WELLS et alii, 1972); grãos de cevada triturados (MIALL, 1975; WELLS et alii, 1972) haste de algodão segmentada (CHANG et alii, 1986) palhas de gramíneas picadas e umedecidas com solução mineral ácida (DAVET et alii, 1981). Uma das preocupações dos pesquisadores sempre foi com relação ao teor de carbono e fibra em quantidade suficiente para oferecer alguma estrutura no produto final.

Além de produtos simples, recentemente os pesquisadores tem procurado estudar mistura de dois ou mais produtos para a multiplicação de *T. harzianum* e *T. hamatum*, como: farelo de trigo, serragem, água (3:1:4) (ELAD et alii, 1980); farelo de trigo, turfa vegetal, água em partes iguais (CHANG et alii, 1986); farelo de trigo - 200 g, areia - 200 g, água - 200 ml (MIHUTA-GRIMM & ROVE, 1986), tendo conseguido excelentes resultados, para sobrevivência dos antagonicos, bem como para controle de fungos como *R. solani* e *S. rolfsii*, em condições de casa-de-vegetação e de campo.

MALL (1975), utilizando haste de plantas de trigo e serragem de madeira, para multiplicação e inoculação de *T. viride* ao solo, antes da inoculação com

patógenos *R. solani* e *S. rolfsii*, observaram que a haste de trigo foi superior a serragem, tanto para esporo pulverizado ao solo, bem como para aplicação do substrato colonizado. Afirmaram que a diminuição de *R. solani* pode ter ocorrido em função de uma maior frequência de antagonista ao solo. DAVEY & PAPAIVIZAS (1960), observaram uma melhor atividade antagonística por *T. viride* na região do sistema radicular de plantas de amendoim e em consequência uma diminuição na ação de *R. solani*, quando os esporos do antagonista foram desenvolvidos em farelo de trigo.

CHANG et alii (1986), aplicando farelo de trigo, turfa e água em volumes iguais, colonizado por *T. harzianum*, em solo de propagação de crisântemos, conseguiram aumentar o desenvolvimento e o número de botões florais. Quando trataram substrato para semeadura de pimenta, conseguiram maior velocidade na emergência e densidade de plântulas.

2.7 Obtenção de novos biotipos de Trichoderma spp

RIFAI (1969) afirmou, em sua revisão sobre fungos do gênero *Trichoderma*, não conhecer a origem do

aparecimento de mutantes, se ocorre naturalmente e as prováveis causas.

A manipulação genética de *Trichoderma* spp, tem sido empregada, para melhorar o rendimento e a qualidade das enzimas sintetizadas (MONTENECOUR & EVELEIGH, 1977). Através da irradiação de *T. viride* com acelerador linear MENDELS *et alii*, (1971) obtiveram um novo biotipo o qual secretava duas vezes mais celulase que o isolado selvagem.

São escassos os estudos visando a indução de variabilidade genética para a obtenção de novos biotipos de *Trichoderma* spp. para emprêgo no controle biológico de patógenos de plantas. Pela radiação gama, TROUTMAN & MATEJKA (1978), obtiveram biótipos de *T. viride* tolerantes ao benomil, mas não fizeram menção quanto a sua ação a patógenos.

PAPAVIZAS *et alii* (1982), empregaram radiação ultravioleta em *T. harzianum* (WT-6) e obtiveram biotipos diferentes do isolado selvagem, quanto a morfologia, produção de metabolitos fungitóxicos, sobrevivência em solo, tolerância ao benomil, supressão de *R. solani* em algodão, rabanete, *S. rolfsii* em cebola e, *Pythium* em ervilha.

Por meio de repicagens sucessivas em concentrações crescentes de fungicidas em meio de

cultura, ABDELMOITY *et alii* (1982) e PAPAIVIZAS & LEWIS (1983), obtiveram isolados de *T. harzianum* diferentes do isolado selvagem, quanto à tolerância a fungicidas, fisiologia e antagonismo ao *Pythium* e *S. rolfsii*.

Um dos pontos importantes na obtenção de mutantes é o de conseguir biotipos com boa tolerância a fungicidas, para emprego em programas de manejo integrado de patógenos de plantas (PAPAIVIZAS *et alii*, 1982).

2.8. Influência de Trichoderma spp. na nodulação de leguminosas por Rhizobium

A presença de fungos antagonistas no solo tem sido apontada como redutora da nodulação em leguminosas (ROBINSON, 1945), para várias espécies de *Rhizobium* (CHHONKAR e SUBBA-RAO, 1966; SETHI e SUBBARAO, 1968).

Os efeitos antagonísticos são prontamente observados em cultura pura de ambos microrganismos e em condições de campo (HOLLAND & PARKER, 1965; ROBINSON, 1945).

TRINICK & PARKER (1983), procurando identificar os microrganismos presentes em solos com ação ou não sobre a nodulação de *Rhizobium lupini* e *R. meliloti* em ágar, observaram que as bactérias são

predominantes sobre os demais organismos, e os gêneros de fungo mais ativos no antagonismo a *Rhizobium* são *Aspergillus* e *Penicillium*.

Espécies do gênero *Trichoderma*, como *T. hamatum* e *T. viride*, tem sido avaliadas quanto ao seu comportamento frente a *Rhizobium* (SUBBA-RAO, 1984). ANGLE *et alii* (1981) observaram em plantas de soja inoculadas simultaneamente com *R. japonicum* e *T. viride*, que este foi capaz de causar redução no número e peso de nódulos e promover redução na população de *R. japonicum* em solo. Já HARMAN *et alii* (1981) não observaram diferenças no número de nódulos em plantas oriundas de sementes inoculadas ou não com *Rhizobium* e *T. hamatum* e desenvolvidas em solo estéril.

2.9. Ação de fungicidas e herbicidas sobre fungos do gênero Trichoderma

2.9.1. Ação de fungicidas

Os fungicidas podem promover aumento na incidência de doenças em plantas pela interferência e morte de antagonistas ou pela ação nociva sobre a microflora benéfica do ponto de vista do controle de determinados patógenos. Dentro do gênero *Trichoderma* as

espécies selecionadas e/ou adaptadas são mais efetivas no antagonismo a patógenos que as selvagens (ABD-EL MOITY *et alii*, 1982; COOK & BAKER, 1983).

Alguns dos fungicidas utilizados frequentemente em agricultura, como thiram e captan, tem sido citados como interferentes na população microbiana do solo, porém RICHARDSON (1959) observou que o thiram até a concentração de 6,2 ppm não inibiu *T. viride* e, *Penicillium* sobreviveu até a concentração de 50 ppm.

O comportamento de *Trichoderma* spp. em relação a fungicidas tem sido observado como sendo variável. Não são tolerantes aos benzimidazóis (CHANG *et alii*, 1986; DAVET *et alii*, 1981) mas tolerantes ao brometo de metila, captan, iprodione, etheridiazole, metalaxyl, PCNB e thiram (ABD-EL MOITY, 1982; ALLEN *et alii*, 1980; CHANG *et alii*, 1986; DAVET *et alii*, 1981; HADAR *et alii*, 1977, 1984; KRAFT & PAPAVIDAS, 1983; MIRKOVA, 1983; PAPAVIDAS, 1981).

Segundo WENSLEY & HUANG (1970), fungos como *Trichoderma* e *Penicillium*, foram recuperados de solos tratados com 40 a 160 ug de benomil/g de solo. Em laboratório o *T. viride* se desenvolveu em solo contendo 5 ug de benomil/g de solo, apesar de ser inibido em meio de ágar contendo 1 ug desse mesmo fungicida. PEEPLES *et alii* (1976) afirmam que o benomil é adsorvido rapidamente às

partículas do solo, e assim não fica disponível para afetar os fungos.

O emprego de fungicidas associado a *T. harzianum* tem sido sugerido para tratamento de sementes de feijão e ervilha (PAPAVIZAS, 1982), em pulverização foliar e tratamento de solo (ABD-EL MOITY et alii, 1982). A combinação de *T. harzianum* e PCNB na dosagem de 1 a 2 mg/kg de solo, promoveu um controle superior comparada com o PCNB sozinho do tombamento de plântulas de feijão, tomate e berinjela, e da podridão da haste de cravo provocado por *R. solani* em condições de casa-de-vegetação (ELAD et alii, 1981b; HADAR et alii, 1979).

Resultados obtidos por vários autores concordam com as afirmações de que o comportamento de espécies de *Trichoderma* frente aos fungicidas é variável. Também é variável a reação em função do local de aplicação do fungicida uma vez que WENSLEY & HUANG (1970) verificaram que o *T. viride* foi inibido por 1 µg de benomil em meio de cultura, porém se desenvolveu em solo contendo 5 µg do produto/g de solo.

2.9.2. Efeitos de herbicidas

Estudos dos efeitos de herbicidas sobre a microflora do solo, tem demonstrado que eles afetam o

crescimento e a atividade da mesma e, alguns casos atuam como estimuladores (GROSSBARD, 1975; SMITH, 1945). Alguns herbicidas podem influenciar a incidência e a severidade de doenças em plantas (ALTMAN & ROSS, 1967; CHANDLER & SANTELMAN, 1968; PEEPLER et alii, 1976; RICHARDSON, 1959).

Herbicidas podem afetar fungos conhecidos como antagonistas competitivos (WILKINSON & LUCAS, 1969a), bactérias e actinomicetos do solo, alterando a população (TWEEDY & TURNER, 1965), e a produção de antibióticos (KREZEL & LESZCZYNSKA, 1970). Por outro lado, alguns microorganismos podem utilizar o herbicida aplicado ao solo como fonte de nutriente sendo este um fator de aumento da sua população. Quando um dado herbicida for tóxico a população tende a diminuir. A composição do meio pode afetar a toxicidez (GROSSBARD, 1976).

KATAN & ESHEL (1973) e MILIKAN (1965) afirmam que os herbicidas podem atuar reduzindo qualitativa e quantitativamente a produção de enzimas pelos fungos.

Há muita diversidade nos resultados encontrados por diferentes pesquisadores, com o emprego do mesmo herbicida. Alguns resultados mostram um efeito seletivo de herbicidas "in situ", não somente com

referência ao gênero *Trichoderma*, mas também às suas espécies.

ROSLYCKY (1981), estudando a influência do herbicida terbacil sobre a microbiota do solo, em condições controladas, verificou efeito negativo sobre a população fungicida nas concentrações de até 700 ug/g de solo. Em condições "in vitro", não verificou qualquer efeito sobre o crescimento de 111 tipos de microrganismos de importância agrícola, incluindo-se entre estes os fungos. WACHA & TIFFANY (1979), avaliando o número de fungos em três diferentes solos tratados com o herbicida tribunil, durante um período de cinco anos, observaram baixa influência do produto aplicado sobre a população total.

BREAZEALE & CAMPER (1970), citados por DROZDOWICZ (1971), observaram que o número de colônias de fungos em amostras de solo de lotes que receberam repetidas aplicações do herbicida trifluralin, durante um ano, foi menor que no lote controle; e que o herbicida 2,4-D não afetou o número de microrganismos. TANG *et alii* (1970) observaram que em baixas concentrações o trifluralin favoreceu o aumento da população de fungos, bactérias e actinomicetos competidores e com isso ocorreu diminuição da colonização de raízes de plantas por patógenos como, *Pythium* e *R. solani*.

TU & BOLLEN (1968), estudando a influência do herbicida paraquat sobre a atividade microbiana em quatro solos, verificaram aos trinta dias de incubação, um aumento da porcentagem do fungo *Penicillium*. Para atrazina aplicada durante nove anos em solo cultivado com milho COLE (1976), observou que repetidas aplicações do produto, não afetaram a população fungica. ORTUNO et alii (1978), estudando o efeito da simazina sobre a solubilização do fósforo em solos calcários por *Aspergillus niger*, observaram que esse herbicida exerceu um efeito autoregulador, sobre o crescimento do fungo, inibindo-o ou estimulando-o, obedecendo uma equação de regressão.

TEUTEBERG (1968), citado por ALTMAN & CAMPBELL (1977), observou que vários herbicidas, aplicados repetidamente ao solo sem cultivo, decrescem o número de microrganismo, quando comparado ao solo cultivado convencionalmente.

São escassos os estudos objetivando correlacionar a interação de herbicidas e fungos do gênero *Trichoderma*. Dentro desse gênero uma das espécies mais estudadas é o *T. viride*. O seu crescimento foi estimulado por atrazina (RICHARDSON, 1970; RODRIGUEZ-KABANA, 1967, 1968), fluometuron (BOZART et alii, 1969), atrazina e simazina (CURL et alii, 1968). Sua população

foi inibida por triallate, linuron, paraquat. Em condições controladas o paraquat, em doses similares as utilizadas em condições de campo se comportou como seletivo, tendo efeito mais acentuada sobre colônias mais velhas de *T. viride* (WILKINSON & LUCAS, 1969b). Os herbicidas EPTC, trifluralin, aretit, não exerceram qualquer efeito sobre *T. viride* (SEZGIN, 1978), enquanto que o 2,4-D em solução de FRIES, reduziu cerca de 72% do crescimento do *Trichoderma* quando comparado a testemunha (MILIKAN, 1964).

DAVIS et alii (1976), avaliando os efeitos das concentrações de 0, 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} M dos herbicidas prometryn, diuron, fluometuron e MSMA sobre *T. viride*, observaram um aumento na esporulação em nível variável de 20 a 50%.

WACHA & TIFFANY (1979), realizando uma avaliação quali-quantitativa de fungos no solo cultivado com três níveis de atrazina, através de contagem das colônias em placas, verificaram que uma dos gêneros mais frequentes era o *Trichoderma* spp, além de *Fusarium*, *Gliocladium*, *Penicillium* e *Rhizopus*.

DAVET (1981), estudando o efeito do propyzamide sobre a colonização do substrato por *T. harzianum*, em presença de outros fungos do solo, observou

modificações mínimas no desenvolvimento desse organismo em função da presença do herbicida.

2.10. Tratamento biológico de sementes

Segundo BROWN (1974) e COOK & BAKER (1983) um dos métodos de controle biológico mais efetivos e econômicos é a introdução de antagonistas juntamente com o material de plantio, a fim de promover a proteção de raízes contra patógenos e o aumento do desenvolvimento das plântulas. Esses microrganismos podem ser fungos, bactérias e actinomicetos. KOMMEDAHL & WINDELS (1978, afirmaram que o tratamento biológico de sementes com antagonistas é um método econômico e importante, pois pode oferecer proteção em pré e pós-emergência das plântulas, atuando na destruição do inóculo de patógenos presente nas sementes e protegendo contra os existentes no solo. Em determinadas situações pode ocorrer um maior desenvolvimento de plântulas oriundas de sementes tratadas com antagonistas (MERRIMAN *et alii*, 1974).

A aplicação do antagonista via semente é importante no curso de infecção do hospedeiro porque requer pequenas quantidades de inóculo quando comparado a outros sistemas de aplicação (GRAY, 1981; HUBBAR *et alii*, 1983; KOMMEDAHL *et alii* 1981; WELLS *et alii*, 1972). Ele se

multiplica sobre as sementes e só tornando-se esporulado (CHANG & KOMMEDAHL, 1968).

Os gêneros de fungos antagonistas mais empregados e tidos como efetivos no tratamento de sementes de várias culturas são: *Chaetomium*, *Penicillium* spp e *Trichoderma* spp. Considera-se antagonista ideal para tratamento de sementes, aqueles que são agressivos, competidores, colonizadores de rizosfera, com habilidade para atuar como hiperparasita, produtor de antibiótico ou ambos, sobreviver por longos períodos na superfície de sementes tratadas (COOK & BAKER, 1983). A maioria dos produtos químicos empregados no tratamento de sementes, fornecem proteção apenas em pré-germinação e emergência das plântulas e não em pós-emergência contra as podridões em geral.

Espécies de fungos do gênero *Trichoderma*, como *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, aplicados em sementes na forma de esporos, exercem efeitos contra o apodrecimento e ação de patógenos causadores de doenças em plântulas, sendo ainda ativos na colonização de rizosfera de plântulas de algodão, beterraba, citrus, ervilha, grão-de-bico, milho, mostarda, rabanete e soja (HADAR et alii, 1984; HARMAN et alii, 1980; HUBBARD et alii, 1982; KAISER, 1984;

KOMMEDHAL *et alii*, 1981; LIU & VAUGHAN, 1965; PAPAVIDAS, 1982).

WINDELS (1981) observou que o *Penicillium oxalicum*, quando aplicado em sementes de ervilha na forma de esporos, se desenvolvia sobre a superfície destas formando uma malha ou rede hifálica, esporulando sobre as mesmas durante germinação.

O sucesso do controle biológico pela inoculação de sementes com espécies do fungo *Trichoderma*, depende de fatores como: idade do esporo (KOMMEDHAL *et alii*, 1981), concentração de inóculo em função do tipo de solo (HADAR *et alii*, 1984), pH e temperatura (HARMAN *et alii*, 1981; KAISER, 1984), concentração e potencial de inóculo do patógeno a ser controlado no solo (KAISER, 1984).

A associação do tratamento biológico com esporos de *Trichoderma* spp mais o tratamento químico de sementes pode promover aumento da sobrevivência dos esporos do antagonico na superfície das sementes e na rizosfera das plântulas, através da eliminação dos competidores (KLASSEN, 1981; PAPAVIDAS & LEWIS, 1981).

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Solo e restos vegetais utilizados em isolamentos

Para obtenção de isolados de *Trichoderma* comprovável capacidade antagônica foram utilizados os substratos: solo, plantas, sementes, restos vegetais, cujas características, identificação, local de coleta constam da Tabela 1.

3.1.2. Isolados de fungos utilizados nos diferentes experimentos

3.1.2.1. Patógenos

Rhizoctonia solani, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii*, isolados de plantulas e plantas de soja infectadas naturalmente e, identificados

segundo BARNETT & HUNTER (1972). Nos experimentos com sementes utilizou-se um lote de cultivar Paraná, contaminadas com *Aspergillus*.

TABELA 1 - Características das plantas e restos vegetais utilizados no isolamento de *Trichoderma* spp.

Solo numero	Local/coleta	Classificação	pH	Vegetação predominante
1	Castro, PR	Latossolo vermelho escuro	6,1	soja (<i>Glycine max</i>); fazendeiro (<i>Galinsonga parviflora</i>)
2	Castro, PR	Latossolo vermelho escuro	6,3	soja (<i>Glycine max</i>); fazendeiro (<i>Galinsonga parviflora</i>)
3	Campo Mourão, PR	Latossolo roxo eutrófico	5,7	soja (<i>Glycine max</i>); trigo (<i>Triticum aestivum</i>); picão preto (<i>Bidens pilosa</i>); tremoço (<i>Lupinus albus</i>)
4	Ponta Grossa, PR	Latossolo roxo eutrófico	6,1	soja (<i>Glycine max</i>); trigo (<i>Triticum aestivum</i>); picão preto (<i>Bidens pilosa</i>); tremoço (<i>Lupinus albus</i>)
5	Dourados, MS	Latossolo roxo eutrófico	6,1	soja (<i>Glycine max</i>); milho (<i>Zea mays</i>); carrapicho de carneiro (<i>Acanthosperma hispidum</i>)
6	Guarapuava, PR	Latossolo Bruno distrófico	5,6	soja (<i>Glycine max</i>); trigo (<i>Triticum aestivum</i>); milho (<i>Zea mays</i>); fazendeiro (<i>Galinsonga parviflora</i>)
7	Guarapuava, PR	Latossolo vermelho escuro	5,8	soja (<i>Glycine ma</i>); trigo (<i>Triticum aestivum</i>); milho (<i>Zea mays</i>); fazendeiro (<i>Galinsonga parviflora</i>)
8	Londrina, PR	Latossolo roxo eutrófico	6,3	soja (<i>Glycine max</i>); milho (<i>Zea mays</i>); tremoço (<i>Luoinus albus</i>); picão preto (<i>Bidens pilosa</i>)

3.1.3. Isolados de Trichoderma

Os isolados de *Trichoderma* denominados de TH1 a TH45, prováveis antagonistas à *R. solani*, *M. phaseolina*, *S. rolfsii*, *Aspergillus* spp, "in vitro" e, em sementes de soja, num total de 45, foram obtidos de solo, raízes, rizosfera e caule de plantas de soja, trigo e ervas daninhas.

Para experimentos de tolerância a fungicidas e herbicidas, compatibilidade com a bactéria *Rhizobium japonicum*, antagonismo a *S. rolfsii*, *M. phaseolina* e *R. solani* e controle de microrganismos em sementes de soja, dentre os 45 isolados de *Trichoderma* foram utilizados os seguintes: TH10, obtido de raízes de soja coletadas em Guarapuava-PR, em latossolo bruno distrófico; TH20, isolado de resto vegetal de plantas de trigo coletados em Castro-PR, em latossolo vermelho escuro; TH32, isolado de sementes de soja cv. Bragg, plaqueadas em papel de filtro; TH35, isolado de partículas de solo aderido a raízes de plantas de soja cv. Bossier, cultivadas em latossolo vermelho escuro e coletadas em Ponta Grossa-PR; TH45, obtido de tecidos de raízes de soja, cv. Bossier, cultivadas em solo argiloso, no município de Dourados-MS.

Os isolados empregados (TH10, TH20, TH32, TH35, TH45) foram identificados como sendo *Trichoderma harzianum*, de acordo com RIFAI (1969).

Em experimento para obtenção de novos biotipos foi empregado o isolado de *T. harzianum* obtido de sementes (TH32).

3.1.4. Meios de cultura e soluções utilizadas

3.1.4.1. Meio de BDA

- Batata	200 g
- Glicose	200 g
- Agar	15 g
- Água destilada	1000 ml

3.1.4.2. Meio de Martin (MARTIN, 1950)

- Agar	20 g
- KH_2PO_4	1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
- Peptona	5 g
- Dextrose	10 g
- Rose bengal	0,033 g

- Estreptomicina	0,05 g
- Agua	1000 ml

3.1.4.3. Meio de Martin (MARTIN, 1950)
modificado para *Trichoderma*
(MMT)

- Agar	20 g
- KH_2PO_4	1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
- Peptona	5 g
- Dextrose	10 g
- Rose bengal	0,033g
- Terramicina 1,5% + sulfato de Estreptomicina 15% (Agrimicin 100)*	0,18 g
- Metalaxyl*	0,2 g
- PNCB (Pecenol)*	0,07 g
- Agua	1000ml

*modificações introduzidas

3.1.4.4. Meio seletivo para isolamento quantitativo de *Trichoderma* spp do solo (ELAD et alii, 1981), (TSM)

- Agar	20 g
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
- KH ₂ PO ₄	0,9 g
- KCl	0,15 g
- NH ₄ NO ₃	1 g
- Glucose	3 g
- Cloranfenicol	0,25 g
- PCNB	0,5 g
- Rose bengal	0,15 g
- Agua	1000 ml

3.1.4.5. Meio YMA (Yeast manitol agar)
(FRED et alii, 1932)

- Manitol	5 g
- Glutamato de sódio	0,5 g
- Solução K*	8,2 ml
- Solução T	10 ml
- Solução U	1 ml
- Solução V	1 ml

- Levedura	0,5g ou
Agua de levedura	50 ml
- Agar	12 g
- Agua q.s.p.	1000ml

*solução estoque

- K - KH_2PO_4	80 g/l
- T - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g/l
- U - CaCl_2	40 g/l
- V - FeCl_2	4 g/l

3.1.4.6. Meio mínimo (PONTECORVO e COL.
1953)

- NaNO_3	6 g
- KH_2PO_4	1,5 g
- KCl	0,5 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
- FeSO_4	0,01 g
- ZnSO_4	0,01 g
- Glicose	10 g
- Agar	15 g
- Agua destilada	1000 ml

3.1.4.7. Meio 523 (KADO & KESKETT,
1970)

- Sacarose	10 g
- Caseína hidrolizada	8 g
- Extrato de levedura	4 g
- KH_2PO_4	2 g ou
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	3 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
- Agar	15 g
- Água	1000 g
- pH 6,9 após autoclavagem	

3.1.5. Soluções

3.1.5.1. Solução salina

Preparou-se uma solução de cloreto de sódio 0,85% dissolvendo-se o sal em água destilada. Nove mililitros da solução foram adicionados em cada frasco e autoclavados em seguida.

3.1.5.2. Solução de Tween 80

Adicionou-se tween à água destilada, numa concentração de 0,1% (v/v) e 1,5 ml da solução foram colocados em tubos de ensaio, os quais foram autoclavados e, conservados sob refrigeração.

3.1.5.3. Solução de desoxicolato de sódio

Adicionou-se desoxicolato de sódio à água destilada, numa concentração de 0,6% (v/v).

3.1.6. Fungicidas

Para os experimentos foram utilizados ingrediente ativo dos seguintes fungicidas:

Tecto 10-S	Thiabendazole	2-(4-Thizoly) benzimidazole	10%	Merck e Sharp and Dome
	Captan	(N-triclorometil-mercapta-4-ciclohexeno-1, 2-dicarboximida)	75%	STAUFFER Prdutos Químicos Ltda.
Benlate	Benomil	Metil 1 (butil-carboxoil)-2-benzimidazole-carbamato	50%	E & DU PONT Nemours & Co.

Rodiarum	Thiram	bissulfeto de tetrametil-thiuram	70%	Rhodia - Indústrias Químicas e Têxteis S/A
Rovrin	Thiram + Iprodione	Isopropil carbamoil-1- (dicloro 3,5-fenil)-3-idantoina+bissulfeto de tetrametilthiuram	60% + 20%	Rhodia - Indústrias Químicas e Têxteis S/A

3.1.7. Herbicidas

Os diferentes herbicidas utilizados foram:

TORDON 2,4-D	2,4-D-MCPA	Sal ester do ácido 2,4 diclorofenoxiacético	360 g/l	DOW QUIMICA
LAÇO	Acetamilida	2-cloro-2,6-dietil-N-(Metoximetil) acetamilida	300 g/l	MONSANTO
LEXONE 700	Triazinona	4-amino-6-ter-butil-3 metiltio-1,3,3-triazina - 5-(4H)-ano	700 g/l	E & DU Pont
HERBIFLAN	dinitroanilina	a,a,a,-trifluoro-2,6-dinitro-N-N-dipropil-p-toluidina	445 g/l	Herbitécnica

3.1.8. Hospedeiro teste

Na execução dos experimentos foi empregado como hospedeiro a soja. As sementes utilizadas foram o cultivar Paraná, procedente do Centro Nacional de

Pesquisa de Soja - EMBRAPA, Londrina-PR, com poder germinativo em torno de 70%.

3.1.9. Equipamentos para irradiação de esporos de Trichoderma para obtenção de mutantes

. Lâmpada ultravioleta (253 nm) "mineral light", pertencente ao Departamento de Genética da ESALQ-USP.

. Fonte de radiação gama "cobalto-60" tipo gamma-bean 650, da Atomic Energy of Canada, pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA - ESALQ/USP.

3.2 Métodos

3.2.1. Amostragem

3.2.1.1. Amostragem de solos para isolamentos

Em cada uma das áreas de cultivo de soja, trigo, milho, foram coletadas 20 subamostras de solo de aproximadamente 200 g cada, com auxílio de amostrador de

solo, a uma profundidade aproximada de zero a dez centímetros. Após homogeneizadas essas subamostras compuseram uma amostra composta representando cada solo. Depois foram acondicionadas em saco plástico e, em seguida eram secas ao ar, a sombra, por um período de 24 a 72 horas, dependendo do grau de umidade. Posteriormente foram peneiradas em peneira 16 mesh, uniformizadas em moinho de bola, por 30 minutos. De cada amostra foram tomadas cinco subamostras de 10 gramas para determinação da umidade do solo, através de secagem em estufa a 105-110°C, até peso constante.

3.2.1.2. Amostragem de plantas e sementes

Pedaços de haste e raízes de plantas de soja sadias e infectadas por *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, foram coletados ao acaso em áreas cultivadas anteriormente com soja, milho, trigo, tremoço, em diferentes localidades.

A partir do material vegetal coletado procedeu-se o isolamento, através do método da implantação de tecidos em meio de cultura. Para tanto, as partes de plantas, foram desinfectadas em hipoclorito de sódio (3:1), lavados em água destilada estéril e,

plaqueadas em meio de Martin modificado para *Trichoderma* (MMT). A incubação deu-se no escuro e à temperatura de $26^{\circ}\text{C} + \text{ou} - 1$.

As sementes de soja foram semeadas em meio de Martin modificado para *Trichoderma*, na proporção de 10 sementes por placa e, 10 placas por repetição, por lote de semente empregado. A incubação durante sete dias, deu-se a $20^{\circ}\text{C} + \text{ou} - 1$ no escuro. Após esse período foi verificada a presença e/ou ausência de frutificações do fungo *Trichoderma* superficialmente as sementes ou ao meio de cultura.

3.2.2. Identificação e conservação de isolados de fungos

Para a identificação os isolados de interesse, foram cultivados em meio de batata-dextrose-agar (BDA) e posteriormente preservados pelo "Método de Castellani", descrito por FIGUEIREDO (1967). Discos de micélio do fungo foram transferidos para vidros de penicilina com capacidade para 6 ml, contendo 4 ml de água destilada esterilizada, tamponados com rolhas de borracha e, lacrados hermeticamente com tampas de alumínio (utilizando-se para tanto, máquina cravadora especial) e, mantidos sob temperatura aproximada de 10°C

(geladeira). A identificação foi baseada na chave para *Trichoderma* de RIFAI (1969), de acordo com características morfo-fisiológicas.

3.3. Experimentos

3.3.1. Comparação entre meios de cultura e diluição de solo para isolamento do fungo *Trichoderma* sp. a partir de solo

O ensaio teve por objetivo comparar meios de cultura indicados em literatura para isolamento de *Trichoderma* sp., quanto a sua eficiência, em condições brasileiras.

Baseando-se no número de colônias recuperadas na superfície do meio de cultura, foram comparados quatro diferentes meios de cultura: a. meio seletivo para *Trichoderma* (ELAD et alii, 1981); b. meio de Martin (MARTIN, 1950); c. meio de batata-dextrose-ágar + estreptomicina; d. meio de Martin (MARTIN, 1950) modificado tentando melhorar a sua eficiência para recuperar *Trichoderma*.

Utilizou-se no ensaio o isolado TH32 de *T. harzianum* multiplicado em meio de BDA, durante sete dias.

A partir de colônias desenvolvidas, preparou-se uma suspensão de 10^8 esporos/ml que foi adicionada ao solo contido em bandejas plásticas na dose de 100 ml/kg de solo seco autoclavado. As bandejas foram mantidas em regime normal de dia/noite a uma temperatura de $23^\circ +$ ou $- 1$ e umidade em torno de 60%, durante 30 dias. Após esse período procedeu-se a coleta de subamostras de 10 g de solo em cada tratamento, que após homogeneizadas constituíram a amostra de trabalho.

O solo foi diluído para 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Aliquotas com 1 ml foram retiradas de cada diluição, plaqueadas nos diferentes meios, vertidas em placas de Petri com um dia de antecedência e incubadas a uma temperatura de $26^\circ\text{C} +$ ou $- 1$, durante quatro dias. Após esse período realizou-se a contagem e identificação das colônias desenvolvidas.

3.3.2. Seleção de isolados de Trichoderma spp. com potencial antagônico

O objetivo do presente ensaio foi o de selecionar isolados de Trichoderma com capacidade para inibir o desenvolvimento de outros fungos.

Como parâmetro de comparação utilizou-se um isolado do fungo *R. solani* obtido a partir de plântulas de soja infectadas.

3.3.2.1. Preparo dos inóculos

3.3.2.1.1. Preparo de culturas do fungo *R. solani*

Para o preparo do inóculo, partiu-se sempre da cultura do fungo conservada em água (método de Castellani), a qual foi repicada para placas de Petri, contendo meio de BDA, incubadas em condições de ambiente de laboratório, a temperatura de aproximadamente 26°C, em ausência de luz. Após o crescimento do fungo em pelo menos dois terços da placa, foram retirados discos das colônias e transferidos para novas placas contendo meio de BDA, para os testes de antagonismo "in vitro".

3.3.2.1.2. Preparo de culturas dos isolados de *Trichoderma* sp., ensaiados como prováveis antagonicos

Os 35 diferentes isolados foram cultivados em meio de batata-dextrose-ágar, em placas de Petri, a uma temperatura de 26°C, durante seis dias em ausência de luz.

3.3.3. Teste de antagonismo "in vitro"

O método empregado foi o descrito por BELL et alii (1982) e consistiu na transferência de dois discos de 5 mm de diâmetro, retirado das margens de colônias de *R. solani* com quatro dias de idade, para dois pontos opostos ao centro da placa de Petri, contendo meio de BDA. Após 12 horas de incubação no escuro a 26°C, procedeu-se a transferência de um disco de micélio de *Trichoderma* para o centro das placas. As culturas pareadas foram incubadas em condições de laboratório a uma temperatura de 26°C + ou - 1, em ausência de luz, por um período de 120 horas.

A avaliação foi realizada empregando-se a metodologia proposta por WEN-SHI WU & JIN-HUEILU (1984), que consistiu na mensuração do crescimento das colônias do patógeno, no momento em que as colônias das testemunhas se achavam com crescimento em dois terços do tamanho da placa. O cálculo da porcentagem de redução do crescimento (RC%) foi feito utilizando-se a fórmula $RC\% = (CTP - CTA) / CAF \times 100$, onde CTP, crescimento total da colônia em presença do provável antagonístico e CTA total de crescimento da colônia em ausência do antagonístico.

3.3.4. Tratamento de esporos de I. harzianum (TH32) com luz ultravioleta e radiação gama visando obtenção de novos biótipos

O ensaio teve por objetivo verificar o comportamento de um isolado selvagem de T. harzianum (TH32), após seus esporos terem sido submetidos à ação de dois agentes mutagênicos: a. luz ultravioleta e b. radiação gama; avaliando-se a taxa de sobrevivência em diferentes doses e tempos de radiação para experimentos posteriores de comparação no antagonismo, tolerância a fungicidas e herbicidas. O isolado TH32 de T. harzianum

foi submetido ao tratamento com luz ultra-violeta (2.537Å) e radiação gama.

3.3.4.1. Tratamento com luz ultra-violeta

Esporos do isolado de *T. harzianum* selvagem (TH32) foram transferidos para solução de tween 80, estimando-se o número de esporos por mililitro, através da câmara de NEUBAUER. A seguir, a suspensão de esporos foi adicionada a solução salina (1:10), colocada em placa de Petri esterilizada e, procedeu-se a irradiação, mantendo-se sempre a suspensão a ser irradiada a uma distância de 15 cm da fonte de luz ultra-violeta 253 nm, em ambiente escuro. Os tempos de exposição (irradiação) foram 0, 4, 8, 16, 32, 64 e 70 minutos. Após cada irradiação e diluição em água esterilizada para 10^{-2} , foram semeados 0,1 ml da suspensão em placas de Petri contendo meio de BDA suplementado com desoxicolato de sódio. As placas foram incubadas a uma temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ em presença de luz artificial (lâmpada luz do dia TL 40W/54RS) e, após quatro dias, procedeu-se a contagem de número de colônias. Baseando-se no número de colônias sobreviventes, calculou-se a porcentagem de sobrevivência

utilizando-se a metodologia para o cálculo proposto por BARACHO & ROSIN (1977). Com os dados obtidos construiu-se a curva de sobrevivência.

3.3.4.1.1. Verificação da presença de mutantes em esporos tratados com luz ultravioleta e semeados em meio de BDA + (thiram, 60% + iprodine, 20%)

Em placas contendo meio BDA + (thiram + iprodione) na concentração de 100 ppm de princípio ativo foram semeados 0,1 ml da suspensão de esporos do fungo irradiados em luz ultravioleta durante 70 minutos (+ ou - 5% de sobrevivência) e 72 horas após, procedeu-se a contagem das colônias emergentes, observando-se principalmente características como tamanho e coloração. As colônias com características diferentes da selvagem foram repicadas para dez pontos por placa de Petri contendo meio de BDA, através de transferência de esporos com auxílio de palitos de dente esterilizados. Das colônias desenvolvidas foram retirados e transferidos

discos para meio de BDA contendo 100 ppm do fungicida rovrin (thiram 60% + iprodione 20%). Avaliou-se o crescimento linear das colônias em comparação à colônia selvagem.

3.3.4.2. Tratamentos com radiação gama

3.3.4.2.1. Determinação da sobrevivência de esporos de *Trichoderma harzianum*, submetidos à radiação gama

Esporos do isolado de *T. harzianum* (TH32), desenvolvidos em placas com meio de BDA, em presença de luz contínua durante sete dias foram suspensos em 10 ml de solução de tween 80 e agitados para desagregação das cadeias. Em câmara de NEUBAUER calibrou-se a concentração de esporos, para $(1 \times 10^{-9}$ esporos/ml). Retirou-se 10 ml de suspensão para controle (tempo-zero) e 10 ml para tubos de ensaio (24 cm) a fim de serem irradiados. As doses de radiação gama empregadas foram 00 Gy, 250 Gy, 500 Gy e 750 Gy. A fonte de radiação gama utilizada foi o cobalto-60 tipo "Gammabeam 650, da Atomic Energy of

Canadá", LH, Ottawa, Canadá, com atividade de aproximadamente $3,1 \times 10^{14}$ Bq, no início dos ensaios.

De cada dose, da suspensão de esporos irradiada e diluída para 10^{-1} e 10^{-2} foram semeados 0,1 ml em placas de Petri contendo meio de BDA, sempre em triplicata. Após 72 horas de incubação em presença de luz contínua, procedeu-se a contagem das colônias, e considerando-se as diluições e o volume semeado, estimou-se o número de esporos viáveis por mililitro. A porcentagem de sobrevivência foi calculada em relação a dose zero considerada com o nível de 100% de sobrevivência.

3.3.4.2.2. Verificação da presença de biótipos diferentes a partir de esporos tratados com radiação gama e semeados em meio de BDA + (thiram 60% + iprodione 20%) e BDA

Da suspensão de esporos (1×10^8) irradiada na dose 50 Gy (5% de sobrevivência) e diluída a

10⁴ esporos/ml, semeou-se 0,1 ml em placas de Petri contendo meio de BDA. Após quatro dias de incubação em presença de luz do dia e contínua, avaliou-se visualmente as colônias emergentes quanto a morfologia (cor, tamanho, etc.), em comparação às colônias provenientes de esporos não irradiados. Esporos das colônias diferentes da original foram transferidos para meio de BDA contendo o fungicida rovrin (thiram 60% + iprodione 20%) na concentração de 100 ppm.

3.3.5. Antagonismo de cinco isolados selvagens de Trichoderma sp. (TH10, TH20, TH32, TH35 e TH45) e duas variantes morfológicas do isolado TH32 (VMT-1 e VMT-2), aos fungos Rhizoctonia solani, Macrophomina phaseolina e Sclerotium rolfsii, em meio de BDA

O ensaio teve por objetivo verificar a capacidade de cinco diferentes isolados e duas variantes morfológicas do isolado TH32 de Trichoderma, em inibir o desenvolvimento de três patógenos em meio de BDA.

Empregou-se cinco diferentes isolados selvagens de *Trichoderma* selecionados dentre 45, como possuidores de capacidade de reduzir mais de 69% de crescimento de *R. solani* "in vitro", denominados de TH10, TH20, TH32, TH35 e TH45 e mais duas variantes morfológicas do isolado TH32, como prováveis inibidores de *R. solani*, *M. phaseolina* e *S. rolfsii*, em meio de cultura de BDA.

O método empregado foi o descrito por BELL et alii (1982) (culturas pareadas) e consistiu da transferência de discos com 0,5 cm de diâmetros retirados das margens de colônias de cada patógeno e dos isolados de *Trichoderma*, para placas de Petri, contendo meio de BDA. Da colônia do patógeno foram transferidos dois discos de 0,5 cm para lados opostos da placa, enquanto que do *Trichoderma* transferiu-se apenas um. Os fungos testados como prováveis inibidores de *R. solani*, *M. phaseolina* e *S. rolfsii* foram inoculados nas placas em períodos diferentes. Os discos de *R. solani* foram inoculados doze horas antes de *M. phaseolina* e *S. rolfsii* 18 horas do *Trichoderma*. A incubação deu-se à temperatura de 26°C + ou - 1, em ausência de luz. O critério de avaliação utilizado foi o descrito em 3.3.3.

3.3.6. Antagonismo a R. solani, em sementes contaminadas artificialmente

O experimento foi conduzido com a finalidade de verificar o efeito de cinco isolados selvagens de duas variantes morfológicas de *Trichoderma* sp. sobre *R. solani* presente em sementes de soja.

Sementes de soja, cv. Paraná, foram umedecidas em água e postas em contato com a superfície de colônias de *R. solani* desenvolvidas durante oito dias em meio de BDA. O tempo de permanência das sementes foi 24 horas. Após esse período, as sementes foram transferidas para superfície das colônias dos diferentes isolados de *Trichoderma*, agitadas rapidamente e, posteriormente plaqueadas em placas de Petri, contendo meio de BDA. Foram plaqueadas cinco sementes por placa, num total de 200 sementes por tratamento. A incubação deu-se a 26°C + ou - 1, em escuro. A avaliação foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico e consistiu da verificação da presença ou ausência de *Trichoderma* e contagem do número de sementes com e sem *R. solani*.

3.3.7. Substratos para multiplicação de T. harzianum (TH32)

O objetivo foi identificar substratos naturais simples para multiplicação, produção de esporos, veiculação de T. harzianum.

Os substratos ensaiados foram: a. bagacilho de cana-de-açúcar; b. bagacilho (com 2 a 4% de sacarose) + farelo de arroz (1:1); c. farelo de milho; d. farelo de arroz + areia (1:1); e. fubá de milho; f. fubá de milho + areia (3:1); g. quirera de arroz; h. quirera de arroz + areia (3:1); i. farelo de arroz; j. farelo de arroz + areia (3:1); k. quirera de milho + areia (1:1); l. quirera de milho + areia (3:1); m. grãos de milho pipoca; n. grãos de sorgo sacarino; o. grãos de aveia preta; p. grãos de trigo; q. grãos de centeio; r. vermiculita + turfa (1:1); s. vermiculita + farelo de milho (1:1); t. meio de batata-dextrose-ágar.

Sessenta gramas de cada substrato seco foram colocados em erlenmeyers com capacidade de 1000 ml, umedecido com água destilada até no máximo 50% do peso seco, e autoclavados a 120°C + ou - 1 sob pressão de 1,5 atm., em dois dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última autoclavagem, cada erlenmayer foi inoculado. A inoculação do substrato consistiu na adição

de cinco discos de 0,5 cm retirado da margem de colônias do fungo desenvolvida durante quatro dias em meio de BDA em ambiente de laboratório sob luz contínua. Após dez dias de incubação em ambiente, determinou-se a produção de esporos em cada substrato. Consistiu da retirada de 10 g de cada substrato colonizado, diluição em água esterilizada e contagem em câmara de Neubauer. Para cada substrato foram realizadas quatro repetições em frascos independentes e, os resultados expressos em esporos/ml.

3.3.8. Eficiência do tratamento biológico e químico de sementes de soja quanto a emergência em campo

O objetivo foi verificar o efeito do tratamento biológico de sementes de soja, com esporos de *T. harzianum* e químico, sobre a emergência de plântulas em condições de campo, bem como distinguir o mais eficiente entre nove diferentes substratos empregados para multiplicação do fungo antagônico.

3.3.8.1. Tratamento de sementes com esporos

Os esporos de três isolados de *T. harzianum* (TH32, VMT-1, VMT-2), para tratamentos das sementes, foram extraídos dos seguintes substratos colonizados: a. grãos de aveia preta; b. bagacilho + farelo de arroz; c. bagacilho; d. farelo de arroz; e. farelo de milho; f. quirera de milho; g. grãos de sorgo sacarino; h. bagacilho + farelo de milho e i. meio de batata-dextrose-ágar.

A colonização dos diferentes substratos deu-se em condições de ambiente de laboratório, durante 10 dias em erlenmeyers de 500 ml contendo 60 gramas (peso seco) do substrato umidecido com água a ser colonizado, autoclavado em dois dias consecutivos a 1,5 atm. e 105°C, por uma hora cada vez. A inoculação do substrato após autoclavagem deu-se com a transferência de cinco discos de 0,5 cm de diâmetro retirado de margens de colônias dos fungos desenvolvidos em meio de BDA, durante quatro dias, em temperatura ambiente e, em presença de luz no dia continua.

Os esporos para tratamento das sementes foram obtidos através da retirada de cinco gramas de substrato colonizado, adição de 100 ml de água destilada

esterilizada, agitação durante dois minutos, passagem em peneira 325 mesh (0.044 ABNT) e diluição até uma concentração de 10^9 esporos/ml. Para cada 10 gramas de sementes de soja, cv. Paraná adicionou-se, 2 ml da suspensão de esporos, a fim de promover o molhamento das mesmas. Após terem sido secas ao ar em sombra realizou-se a semeadura normal em sulco, numa densidade de 20 sementes por metro linear.

- Tratamento químico

Foi realizado via seca, empregando-se os fungicidas: captan, thiran (Rodiauram) e thiran + iprodione (Rovrin), nas dosagens de 150 g p.c. por 100 kg de sementes. O processo de semeadura foi idêntico ao do tratamento biológico.

As avaliações consistiram da contagem das plântulas emergidas aos oito dias, cálculo das porcentagens e comparações entre químico e biológico.

3.3.9. Eficiência do tratamento biológico de sementes, sulco e combinação sulco e sementes, quanto a emergência das plântulas, sobrevivência em plantas e solo

O objetivo foi verificar o comportamento de diferentes substratos para multiplicação do fungo *T. harzianum*, quanto a eficiência na produção de esporos e para tratamento de sementes ou para aplicação em sulcos de semeadura, para controle de microrganismos patogênicos.

3.3.9.1. Preparo do inóculo

O isolado de *T. harzianum* VMT-1, variante morfológico de THS2, foi multiplicado em: a. bagacilho da cana-de-açúcar, b. bagacilho + farelo de arroz (1:1) e c. farelo de milho, d. farelo de arroz, e. grãos de sorgo sacarino, f. bagacilho + farelo de milho, g. grãos de aveia preta, h. quirera de milho e i. meio de bata-dextrose-ágar.

A colonização dos diferentes substratos deu-se em condições de ambiente de laboratório, durante 10 dias, em erlenmeyers de 500 ml contendo 60 gramas de

peso seco do substrato, autoclavados em dois dias consecutivos a 15 atm., e 105°C durante 1 hora e 30 minutos cada vez. Os frascos foram inoculados com cinco discos de colônias do fungo, desenvolvidas em meio de BDA, durante quatro dias a temperatura ambiente e em presença de luz contínua. A incubação dos frascos contendo os substratos inoculados, deu-se em ambiente a uma temperatura variável entre 22 e 28°C.

3.3.9.2. Tratamento das sementes

Sementes de soja, cv. Paraná, apresentando índice de infecção de 80% com *Aspergillus* sp, foram pulverizadas com uma suspensão de esporos (10^8 esporos/ml), na dosagem de 2 ml/100 g de sementes, quantidade de suspensão eficiente para promover o molhamento e não encharcamento das mesmas. Após secagem das sementes à sombra durante três horas, procedeu-se a semeadura em sulcos, numa densidade de 25 sementes por metro de sulco, e a uma profundidade aproximada de 5 cm, em condições de campo, em solo anteriormente cultivado com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

3.3.9.3. Tratamento de sulco de semente dura

Cada substrato infestado após seco à sombra foi aplicado em 1,50 m de sulco na dose de 50 g (peso seco), a uma profundidade aproximada de 10 cm, a seguir adicionou-se uma fina camada de solo sobre este foi feita a sementeira. Nos tratamentos conjugados sulco + sementes o processo foi idêntico porém empregando-se as sementes tratadas com suspensão de 10^6 esporos/ml de *T. harzianum*. Todos os tratamentos foram repetidos quatro vezes.

Foram realizadas avaliações de: a. emergência através da contagem de plântulas; b. presença do *T. harzianum* em cotilédones das plântulas (tratamento de sementes) e, em hastas das plantas aos 30 dias de idade, através do plaqueamento de segmentos do tecido vegetal após assepsia em meio de Martin modificado para *Trichoderma* com incubação em ausência de luz em condições de laboratório e contagem dos pontos com presença do fungo antagonico; c. porcentagem de plantas com sistema radicular escurecido devido a presença de patógenos como: *M. phaseolina*, *Rosellinea* sp., *Fusarium* sp. e outros saprófitos, sendo esta avaliação realizada no final do ciclo das plantas. A amostra consistiu do arranquio de 50

plantas ao acaso por repetição, em cada tratamento, lavagem em água de torneira para remoção do solo e avaliação visual com contagem das raízes escurecidas ou podres; e. verificação da população do *T. harzianum* por ocasião da colheita, sendo que nesta avaliação foram coletadas amostras de solo em seis diferentes pontos da linha de plantas, numa profundidade aproximada de 10 cm com auxílio de um furador de solo. Após secagem a sombra, o solo de cada tratamento foi plaqueado pelo método da diluição em série (10^{-3} e 0,5 ml/placa), em meio de Martin modificado para *Trichoderma*. Após sete dias de incubação a $26^{\circ}\text{C} + \text{ou} - 1$, em ausência de luz, procedeu-se a contagem das colônias emergentes.

3.3.10. Sobrevivência de isolados de *T. harzianum* em sementes de soja tratadas com suspensão de esporos

O objetivo foi verificar a longevidade e a ação de esporos de cinco diferentes isolados de *T. harzianum* aplicados na forma de suspensão em sementes de soja.

Sobre sementes de soja, cv. Paraná, com germinação em torno de 80%, foram aplicadas suspensões

contendo 10^8 esporos/ml dos isolados TH10, TH20, TH32, TH35, TH45, VMT-1 E VMT-2 de *T. harzianum*, desenvolvidos em meio de BDA, de modo a promover um molhamento das mesmas, sendo para isto necessário o emprego de 2 ml da suspensão para cada 100 sementes. Após o tratamento as sementes foram postas a secar a sombra, por duas horas, em temperatura ambiente e acondicionadas em sacos de papel "Kraft". A sobrevivência foi determinada através do plaqueamento de 200 sementes em meio de Martin modificado para *Trichoderma*, colocando-se 10 sementes por placa, a intervalos cada 30 dias, até um período de 120 dias e aos 240 dias. Após o plaqueamento as sementes foram incubadas por um período de 72 horas a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, no escuro. A avaliação consistiu da verificação da presença de colônias do fungo no meio de cultura e contagem das sementes com estruturas deste. Os dados foram expressos em porcentagem de sementes com *Trichoderma*, nos diferente períodos, em relação a sementes sem tratamento.

3.3.11. Sensibilidade "in vitro" de cinco linhagens selvagens e duas variantes morfológicas de T. harzianum aos fungicidas benomyl; thiabendazole; carboxin; thiran e iprodione + thiram

O objetivo foi verificar o comportamento de cinco isolados selvagens e duas variantes morfológicas de T. harzianum, a concentrações de 0,1, 1, 10, 100 e 1.000 ppm dos fungicidas: a. benomyl [metil 1 (butilcarbomoi)-2-benzimidazole-carbamato] 50% de i.a., da E. Dupont Nemours & Co.; b. thiabendazole [2-(4 thiazolyl)-benzimidazole] 10% de i.a., da Merck Sharp and Dohme; c. thiram (bissulfeto de tetrametiltiuram) 70% de i.a., da Rhodia-CNDA; d. captam (N-triclorometil mercapta-4-ciclohexeno K, 2-dicarboximida) 75% i.a., da Stauffer Produtos Químicos, Ltda. e. thiram 60% + iprodione [isopropilcarbomoi-1-(dicloro 3,5 - fenil) - 3 - hidantoina] 20% i.a., da Rhodia-CNDA.

3.3.11.1. Teste em meio de BDA

As colônias do fungo foram inicialmente cultivadas em meio ágar-água e após quatro dias de incubação discos de micélios com 0,5 cm de diâmetro, seccionados com auxílio de furador de rolha, foram retirados da margem das colônias e transferidos para placas de Petri contendo BDA suplementado com fungicida.

O meio de cultura com fungicida foi preparado de acordo com a técnica de EDGINTON *et alii* (1971), modificada por MENTEN *et alii* (1976), dissolvendo-se o produto em acetona (5,0 ml) e completando-se o volume para 100 ml com água destilada esteril (solução estoque). A partir desta solução foram feitas diluições em série transferindo-se uma alíquota de 1,0 ml de cada suspensão para 100 ml de meio de cultura de BDA fundente (45 a 47°C) de maneira a obter-se as concentrações de 0,1, 1, 10, 100 e 1000 ppm.

Cada tratamento (fungicida) foi repetido quatro vezes, inclusive a testemunha sem fungicida. A incubação deu-se sob luz do dia de 40 watts, colocada a uma altura de 40 cm e temperatura ao redor de 26°C em condições de ambiente.

A avaliação consistiu de: a. mensuração do crescimento da colônia, com auxílio de régua milimetrada,

no momento em que as colônias testemunha atingiram crescimentos em dois terços da placa; b. esporulação, após oito dias de incubação em presença de luz contínua e a partir do preparo de suspensão de esporos destas e contagem em hemacitômetro.

3.3.12. Sensibilidade "in vitro" de isolados selvagens e duas variantes morfológicas de I. harzianum aos herbicidas 2,4-D, Metribuzin e Trifluralin

A finalidade foi a de verificar o comportamento de duas linhagens selvagens, TH32 e TH45, e duas variantes morfológicas de TH32 (VMT-1 e VMT-2), do fungo T. harzianum, frente a concentrações de 0,1, 1, 10, 100, 1000 ppm dos herbicidas. 2,4-D, alachlor, metribuzin e trifluralin. No Brasil, pouco se conhece a respeito do efeito dos herbicidas sobre espécies do gênero Trichoderma e esse conhecimento é importante, considerando-se o seu potencial para emprego no controle biológico de doenças e o uso maciço dos herbicidas em áreas agricultáveis.

A metodologia usada para o ensaio foi idêntica a utilizada para os fungicidas.

3.3.13. Influencia de sementes tratadas com fungicidas sobre diferentes isolados de T. harzianum

Com a finalidade de verificar a influencia dos fungicidas benomil, thiabendazole, thiram 60% + iprodione 20% e captan presentes em sementes tratadas sobre diferentes isolados de T. harzianum, foi conduzido o presente experimento. Sementes de soja, cv. Paraná, após terem sido tratadas com os fungicidas por via seca, foram dispostas em número de dez por placa de Petri, contendo meio de BDA, previamente inoculadas com 0,5 ml de uma suspensão de 10^8 esporos do fungo por mililitro. Cada um dos sete isolados de T. harzianum foram inoculados independentemente em seis repetições. A incubação durante oito dias, deu-se em presença de luz do dia continua e a temperatura ambiente de laboratório.

A avaliação consistiu da verificação visual da presença ou ausência de halo de inibição do desenvolvimento dos isolados de Trichoderma ao redor das sementes e comparadas às testemunhas.

3.3.14. Compatibilidade entre *Rhizobium japonicum*, um isolado selvagem de Trichoderma (TH32), duas variantes morfológicas VMT-1 e VMT-2 e mistura destes com thiram

Com o objetivo de verificar a compatibilidade entre *T. harzianum*, *Rhizobium japonicum* e mistura com o fungicida thiram, foram conduzidos dois ensaios, sendo um "in vitro" e outro "in vivo".

3.3.14.1. Multiplicação do inóculo

As estirpes da bactéria a serem inoculadas, foram produzidas em meio YWB (VINCENT, 1975), durante três dias sob agitação constante, numa temperatura de 28°C, e em presença de luz fluorescente. Após esse período, através de determinação por densidade ótica, foi verificado que o meio de cultura apresentava cerca de 10^7 células /ml, número recomendado para inoculação.

Os isolados de *Trichoderma* sp. foram multiplicadas em meio de BDA em presença de luz à temperatura de 26°C + ou - 1.

3.3.14.2. Preparo e peletização das sementes

Após desinfecção com hipoclorito de sódio (3:1) durante três minutos e secagem ao ar, as sementes passaram pelo processo de peletização, de acordo com a metodologia descrita por SOMASEGARAM & HOBEN (1985), utilizando-se uma mistura de: a. CaCO_3 (15 g/kg de sementes); b. solução de sacarose a 10% (15 ml/kg de sementes); c. suspensão de bactéria na concentração de 10^9 células/ml (1 ml/30 sementes). Após o processo de peletização as sementes foram secas ao ar durante uma hora e a seguir tratadas com uma suspensão de esporos dos isolados de *T. harzianum* indicados (2 ml/100 g) e/ou thiram (2 g/kg).

3.3.14.3. Ensaio "in vitro"

Oito horas após as placas com meio YWA terem sido semeadas com esfregaço das cepas SEMIA-587 IPAGRO-RS (A), SEMIA-5019 (29W) IPAGRO-RS (B) de *Rhizobium japonicum*, procedeu-se a transferência de um disco de micélio (5 mm) do *Trichoderma*, para o centro das mesmas. Após seis dias de incubação em estufa a 26°C em ausência de luz, procedeu-se a avaliação macroscópica,

verificando-se a presença e/ou ausência de halo de inibição ao redor da colônia de *Trichoderma* sp. Considerou-se como compatível o isolado que não apresentou halo de inibição de crescimento.

3.3.14.4. Ensaio "in vivo"

Sementes de soja, cv. Paraná, foram inoculadas de acordo com os seguintes esquemas de tratamento: a. bactérias SEMIA-587-IPAGRO(A); b. bactéria 5019 (29W-IPAGRO(B); c. bactéria A e tratamento com esporos de *Trichoderma*; d. bactéria B e tratamento com esporo de *Trichoderma*; e. semente não inoculada; f. sementes com esporos de *Trichoderma*; g. bactéria A e thiram; h. bactéria B e thiram; i. bactéria A, thiram e esporos de *Trichoderma* e j. bactéria B, thiram e *Trichoderma*.

Após terem sido tratadas seis sementes foram semeadas em copo plástico (10 cm de altura x 8 cm de diâmetro), contendo areia e vermiculita (2:1) esterilizada. Dez dias após a semeadura procedeu-se um desbaste, deixando-se quatro plantas por copo, as quais permaneceram por um período de 110 dias em condições de casa-de-vegetação.

A avaliação foi realizada aos 120 dias de idade das plantas e consistiu do arranquio das plantas, lavagem das raízes e contagem do número de nódulos/planta; os dados foram expressos em número médio de nódulos/planta.

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1. Comparação da eficiência de meios de cultura para isolamento de Trichoderma harzianum do solo

Os resultados dos experimentos encontram-se na Tabela 2. A análise estatística dos dados obtidos revelou diferenças significativas para o número de colônias presentes, recuperadas nos diferentes meios de cultura, principalmente na diluição 10^{-3} .

Independente do meio de cultura utilizada a diluição exerceu influencia na recuperação do fungo a partir do solo inoculado artificialmente com o isolado de T. harzianum (TH32). A diluição 10^{-3} permitiu a maior recuperação independente do isolado.

Quanto à eficiência a ordem dos meios foi a seguinte: a. meio de Martin modificado por Trichoderma (NMT); b. meio de BDA + estreptomicina; c. meio seletivo para isolamento quantitativo de Trichoderma do solo (TSM); d. meio de Martin. Na diluição 10^{-3} o meio de BDA

+ estreptomicina apresentou eficiência superior ao meio seletivo para *Trichoderma* (TSM).

TABELA 2 - Eficiência de quatro diferentes meios de cultura para recuperação do fungo *Trichoderma harzianum* (TH32), a partir do solo

Meios de cultura	Colônias recuperadas nas diluições					
	10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	
	x	Vx+0,5	x	Vx+0,5	x	Vx+0,5
Meio de Martin modificado para <i>Trichoderma</i> (MNT)	34,72 ¹	5,89 aA ²	10,73 ¹	3,27 aB ²	6,22 ¹	2,49 aC ²
Meio de BDA e estreptomicina	25,97	5,09 bA	4,97	2,23 cB	1,93	1,39 cC
Meio seletivo para <i>Trichoderma</i> (TSM)	18,99	4,35 cA	7,98	2,82 bB	3,70	1,92 bC
Meio de Martin	18,24	4,27 cA	6,72	2,59 bB	3,48	1,86 bC
	24,05	4,90 a	7,60	2,73 b	3,68	1,91 c

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por Vx+0,5

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância

Os resultados obtidos no ensaio concordam com os obtidos por JOHNSON & CURL (1972), TSAO (1972) e

MARTIN (1950), indicando que esse gênero de fungo é bem recuperado em meio de Martin.

O meio de Martin modificado para *Trichoderma* (MMT) utilizado no experimento provou ser efetivo para detecção e estimativa de *T. harzianum* em solos inoculados artificialmente. O efeito seletivo desse meio é baseado no fato de que espécies de *Trichoderma* são relativamente tolerantes à diferentes níveis de PCNB e "rose bengal". O metalaxyl favoreceu o crescimento e a esporulação das colônias de *Trichoderma*, sem contaminação. As colônias se desenvolveram bem, apresentando nitidamente a característica morfológica, coloração "verde cana", o que facilitou a sua identificação dentre outros fungos do solo presente.

Uma boa supressão de bactérias em geral foi obtida com Agrimicin 100 que se constitui em uma mistura de terramicina 1,5% + sulfato de estreptomicina 15%, utilizando-se 0,18 g/litro de meio.

O meio modificado para *Trichoderma* desfavoreceu o aparecimento de fungos como *Rizhopus* spp e *Mucor* spp, que usualmente se desenvolve sobre colônias dos demais fungos, em meios como o de Martin (MARTIN, 1950) e extrato do solo-ágar (JOHNSON & CURL, 1972; MONDASHER, 1965; MUGHOGHO, 1968). Fungos como *Penicillium*

spp, e *Aspergillus* desenvolveram-se fracamente no meio modificado para *Trichoderma*.

Um número bem inferior de colônias de *T. harzianum* foi detectado no meio seletivo para *Trichoderma* quando comparado ao meio de Martin modificado para *Trichoderma*. No meio seletivo para *Trichoderma* além de menor número de colônias, outros fungos também se desenvolveram. Na diluição 10^{-4} as diferenças entre os números de colônias entre os meios modificado para *Trichoderma* e seletivo para *Trichoderma* e de Martin foram as menores, girando em torno de 20%; porém, nessa concentração, a contagem foi facilitada.

Para o solo analisado, o meio de Martin modificado para *Trichoderma* (MMT), foi superior nas três diluições, mesmo em relação ao meio seletivo para *Trichoderma* (TSM). O meio modificado para *Trichoderma* mostrou portanto ser o mais vantajoso pois se constitui do meio de Martin comum, com a adição de poucos antibióticos e um fungicida facilmente encontrado no mercado.

A quantificação da população de *Trichoderma* spp e o seu isolamento em larga escala para a seleção de isolados, pode dar uma contribuição de grande valor para a pesquisa em controle biológico, envolvendo esse tipo de microrganismo.

4.2. Seleção de isolados de Trichoderma sp. com potencial antagônico a patógenos

Através do emprego da técnica de culturas pareadas, entre 35 isolados de *Trichoderma* sp. e o fungo de *R. solani*, foi possível diferenciá-los quanto a sua capacidade para inibir o crescimento micelial e verificar a variabilidade, entre isolados existentes na natureza (Tabela 3).

Após a análise estatística comparativa para eficiência, foram selecionados os cinco melhores isolados de *Trichoderma*, que apresentaram a maior porcentagem de inibição de crescimento do patógeno.

Os dados obtidos confirmam as observações feitas por WEINDLING (1934), de que ocorrem diferenças entre grupos e espécies de *Trichoderma* quanto a sua ação, seja por agressividade ou efeito de seu princípio letal, em função do patógeno. Também são concordantes com as afirmações de BELL et alii (1982), de que existem diferenças no antagonismo e que cada isolado do patógeno pode ser antagonizado por mais de um isolado. Portanto, há uma alta variabilidade genética natural entre isolados do fungo a partir de diferentes habitats. Este fato mostra a importância da busca de isolados com diferentes características. Também futuros trabalhos de melhoramento

genético utilizando as técnicas clássicas de mutação e recombinação e, inclusive, técnicas modernas como a fusão de protoplastos e a tecnologia do DNA recombinante poderão ser utilizadas com sucesso, combinando as diferentes características favoráveis ao controle biológico entre isolados obtidos.

TABELA 3 - Inibição do crescimento micelial do fungo *R. solani* (isolado de plântula de soja) por diferentes isolados de *Trichoderma* spp, de diferentes origens.

Isolado de <i>Trichoderma</i> spp	Origem	% inibição crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> ¹
TH32	Sementes de soja cv. Dragg	72,95 a
TH20	Resto de plantas de trigo - Castro - PR	72,92 a
TH35	Solo de rizosfera - Ponta Grossa - PR	69,42 b
TH45	Raízes de planta de soja - Dourados - MS	69,38 bc
TH10	Raízes de soja - Guarapuava - PR	69,37 bc
TH12	Solo de área de cultivo de soja - Guarapuava - PR	68,30 bcd
TH19	Raízes de plantas de soja - Londrina - PR	68,15 cd
TH11	Solo da rizosfera de <i>Galinsoga parviflora</i> - Castro - PR	67,90 d
TH13	Resto de plantas de trigo - Londrina - PR	67,87 d
TH29	Solo de área de cultivo de milho - Dourados - MS	67,87 d
TH4	Raízes de (<i>Acanthosperum hispidum</i>) - Dourados - MS	67,79 d
TH6	Raízes de tremoço (<i>Lipinus albus</i>) - Londrina - PR	67,60 d
TH8	Raízes de milho - Guarapuava - PR	66,30 e
TH24	Raízes de trigo - Guarapuava - PR	66,15 d
TH15	Raízes de picão preto (<i>Bidens pilosa</i>) - Londrina - PR	66,02 e
TH14	Raízes de soja - Londrina - PR	65,67 ef
TH31	Solo da rizosfera de plantas de milho - Ponta Grossa - PR	65,19 efg
TH18	Restos de plantas de milho - Londrina - PR	64,57 fgh
TH30	Raízes de <i>Bidens pilosa</i> - Dourados - MS	64,42 gh
TH16	Raízes de tremoço (<i>Lipinus albus</i>) - Campo Mourão - PR	63,77 h
TH22	Solo da rizosfera de plantas de soja - Castro - PR	63,75 h
TH01	Solo de área de cultivo com milho - Guarapuava - PR	63,60 hi
TH03	Raízes de plantas de trigo - Ponta Grossa - PR	63,30 hi
TH25	Solo da rizosfera de plantas de <i>Bidens pilosa</i> - Londrina - PR	62,48 ij
TH23	Hastes de soja em decomposição - Dourados - MS	61,82 jk
TH27	Hastes de milho em decomposição - Dourados - MS	61,70 jk
TH33	Solo da rizosfera de plantas de soja - Castro - PR	60,70 k
TH9	Raízes de tremoço (<i>Lipinus albus</i>) - Londrina - PR	53,57 l
TH26	Solo da rizosfera de plantas de fazendeiro (<i>Galinsoga parviflora</i>) - Castro - PR	50,70 m
TH31	Raízes de plantas de milho - Ponta Grossa - PR	29,51 n
TH34	Hastes de plantas de soja em decomposição - Ponta Grossa - PR	23,61 o
TH32	Solo de área de cultivo com trigo - Londrina - PR	16,07 p
TH28	Solo de área de cultivo com milho - Londrina - PR	16,00 p
TH5	Raízes de plantas de picão (<i>Bidens pilosa</i>) - Dourados - PR	15,64 p
TH50	Sementes de soja cv. Paraná	15,50 p

¹ Médias de quatro repetições

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância

Os isolados ensaiados quanto ao potencial antagônico a *R. solani*, foram de origem geográfica e ecológicas diferentes. Os cinco isolados que apresentaram maior eficiência foram obtidos de sementes de soja, restos de plantas de trigo, solo da rizosfera e de raízes de soja. Esses resultados comprovam as afirmações de CHANG & KOMMEDAHL (1968), de que microrganismos antagônicos são favorecidos pela rizosfera, rizoplano e sementes de plantas e de ARTIGUES & DAVET (1982) de que a ação de determinados antagônicos pode ser diferente em função da origem e da sua capacidade para produzir enzimas.

O critério de seleção empregado no experimento porcentagem de inibição do crescimento micelial permitiu separar os 35 diferentes isolados em função da sua ação sobre o patógeno, não foi considerado o modo de ação, o qual pode ser competição por nutrientes, parasitismo, produção de antibióticos e lise. Como foi dado uma vantagem de 12 horas para o crescimento do patógeno e, mesmo assim conseguiu-se porcentagens de inibição de até 73%, é bem provável que, sob condições favoráveis de campo, estes isolados possam exercer maior ação sobre *R. solani*. Considerando a metodologia proposta por BELL *et alii* (1982), onde a eficiência baseada em sistema de notas 1 indica ausência de inibição e 5

inibição completa do patógeno, ficaria difícil discernir os melhores isolados, porque as leituras intermediárias podem apresentar alta variabilidade. O mesmo não acontece no sistema empregado neste ensaio, uma vez que na avaliação é mensurada diretamente a colônia.

Concorda-se com as afirmações de ALLEN & HAENSELER (1935), de que testes em laboratório são indicativos do efeito de *Trichoderma* sobre os patógenos testados. Porém, é sabido que, nem sempre os melhores isolados "in vitro" são os mais eficientes em condições naturais, porque além do componente genético, fatores do meio, raças, tanto do patógeno como do antagonico estão envolvidos. Acredita-se entretanto que a seleção "in vitro" acompanhado de outros estudos complementares, muito poderá contribuir para o desenvolvimento do controle biológico do patógeno, em condições de campo.

Após feitas as comparações, foram selecionados cinco isolados de *Trichoderma* com melhor eficiência ou que apresentaram índices de inibição de crescimento micelial acima de 69%. Estes foram utilizados nos demais experimentos após terem sido identificados, de acordo com RIFAI (1969), como *Trichoderma harzianum*. Os isolados classificados como *T. harzianum* foram TH10, TH20, TH32, TH35 e TH45.

4.3. Inibição do crescimento micelial do fungos R. solani, M. phaseolina e S. rolfsii, por diferentes isolados de T. harzianum

Os dados obtidos nos experimentos apresentados na Tabela 4, mostram diferenças ocorridas tanto para os isolados de T. harzianum quanto a sua capacidade para inibir o crescimento dos três patógenos, bem como no comportamento destes aos isolados antagônicos em potencial.

Dentre os sete diferentes isolados de T. harzianum estudados, os isolados VMT-1, VMT-2 e TH35 foram superiores aos demais frente a R. solani, M. phaseolina e S. rolfsii, enquanto que o TH10 foi o menos eficiente.

TABELA 4 - Inibição "in vitro" do crescimento micelial de *R. solani*, *M. phaseolina* e *S. rolfsii* por diferentes isolados de *T. harzianum*.

Isolados de <i>T. harzianum</i>	% de inibição do crescimento micelial					
	<i>R. solani</i>		<i>M. phaseolina</i>		<i>S. rolfsii</i>	
	x	$\sqrt{x/100}$	x	$\sqrt{x/100}$	x	$\sqrt{x/100}$
VMT-1	74,91 ¹	54,94 a ²	59,25 ¹	50,33 a ²	64,52 ¹	53,44 a ²
VMT-2	74,15	59,33 ab	58,75	50,04 a	65,76	54,18 a
TH35	67,14	55,02 abc	53,50	47,00 ab	62,75	52,39 a
TH45	66,77	54,80 abc	51,75	46,00 b	64,52	53,44 a
TH32	65,01	53,73 bc	54,00	47,29 ab	60,27	50,92 a
TH20	64,59	53,48 bc	49,74	44,85 b	37,96	38,03 b
TH10	57,46	49,29 c	38,18	38,16 c	31,05	33,86 b

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por $\sqrt{x/100}$

Médias seguidas da mesma letra na vertical e não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância

Para *M. phaseolina*, os isolados VMT-1, VMT-2, TH35 e TH32 se destacaram dos demais, enquanto que para *S. rolfsii* somente os isolados TH20 e TH10, foram inferiores.

Os resultados obtidos no antagonismo a *R. solani*, confirmam as observações de ALLEN & HAENSELER

(1935), ALMEIDA & LANDIM (1981) e WEINDLING (1934), de que o fungo interfere com a atividade normal do patógeno em condições "in vitro" e sugerem que este processo ocorre devido à liberação de substâncias de natureza enzimática ou autolítica, tendo como ação principal a decomposição de hifas. LIU & BAKER (1980) constataram situação idêntica baseados em observações de que a ação de *T. harzianum* a *R. solani*, ocorria mais em presença do tecido celular do patógeno, e com a produção de enzimas. Para *M. phaseolina*, GRAFFAR (1968) e NORTON (1954), observaram que o *T. viride* atuava pela produção de enzimas e ao contato das hifas, sendo sua ação dependente do contato entre ambos. No presente experimento, os isolados de *T. harzianum* VMT-1 e VMT-2, provavelmente atuaram através da liberação de substâncias para o meio de cultura, uma vez que foi constatada a inibição do contato entre o patógeno e os isolados de *T. harzianum*.

Dos sete isolados de *T. harzianum* testados, cinco foram capazes de inibir o crescimento de *S. rolfsii*, o que concorda com afirmações de BELL *et alii* (1982) e TROUTMAN *et alii* (1980) de que um único isolado de *S. rolfsii* pode ser antagonizado por mais de um isolado ou espécies diferentes de *Trichoderma*.

Como os isolados mais eficientes foram dois biótipos obtidos a partir do isolado de *T. harzianum*

(TH32), sendo inclusive pouco superiores a este, a obtenção de novos biótipos pode constituir uma boa linha de pesquisa, visando melhor eficiência para controle de patógenos. Essa observação concorda com os resultados obtidos por PAPAVIZAS *et alii* (1982) em que os biótipos mutantes de *T. hamatum* foram superiores ao selvagem, tanto para antagonismo como para tolerância a fungicidas.

4.4. Sobrevivência de T. harzianum à luz ultra-violeta radiação gama e, obtenção de novos biótipos

4.4.1. Sobrevivência de T. harzianum à luz ultra-violeta e obtenção de novos biótipos de T. harzianum

Uma suspensão de esporos do isolado selvagem de *T. harzianum* (TH32) foi irradiada conforme descrito no item 3.3.4.1. A Tabela 5 apresenta os valores de sobrevivência nos diferentes tempos de exposição à luz UV. Com o aumento do tempo de radiação houve diminuição da sobrevivência. Os esporos de TH32 sobreviveram até o tempo de radiação mais elevado (70 minutos), com uma sobrevivência de 6,31%. Isto demonstra que essa espécie

de fungo é altamente resistente à luz UV com taxa de sobrevivência situando-se acima dos 70 minutos.

A alta resistência de *T. harzianum* a luz UV pode ser devida a um eficiente mecanismo de reparo existente na espécie e que deve ter-se desenvolvido como proteção a luz UV solar. De qualquer modo, a luz UV não é um mutagênico que pode ser usado apropriadamente para esse fungo. De fato, em nenhum dos tempos de exposição conseguiu-se biótipos diferentes da linhagem selvagem (TH32) e nem mutantes morfológicos.

TABELA 5 - Porcentagem de esporos de *Trichoderma* sp. (TH32) sobreviventes à luz UV (média de 2 experimentos).

Tempo de irradiação (UV) em minutos	% sobrevivência
0	100,00
4	71,57
8	41,05
16	36,84
32	27,36
64	23,15
70	6,31

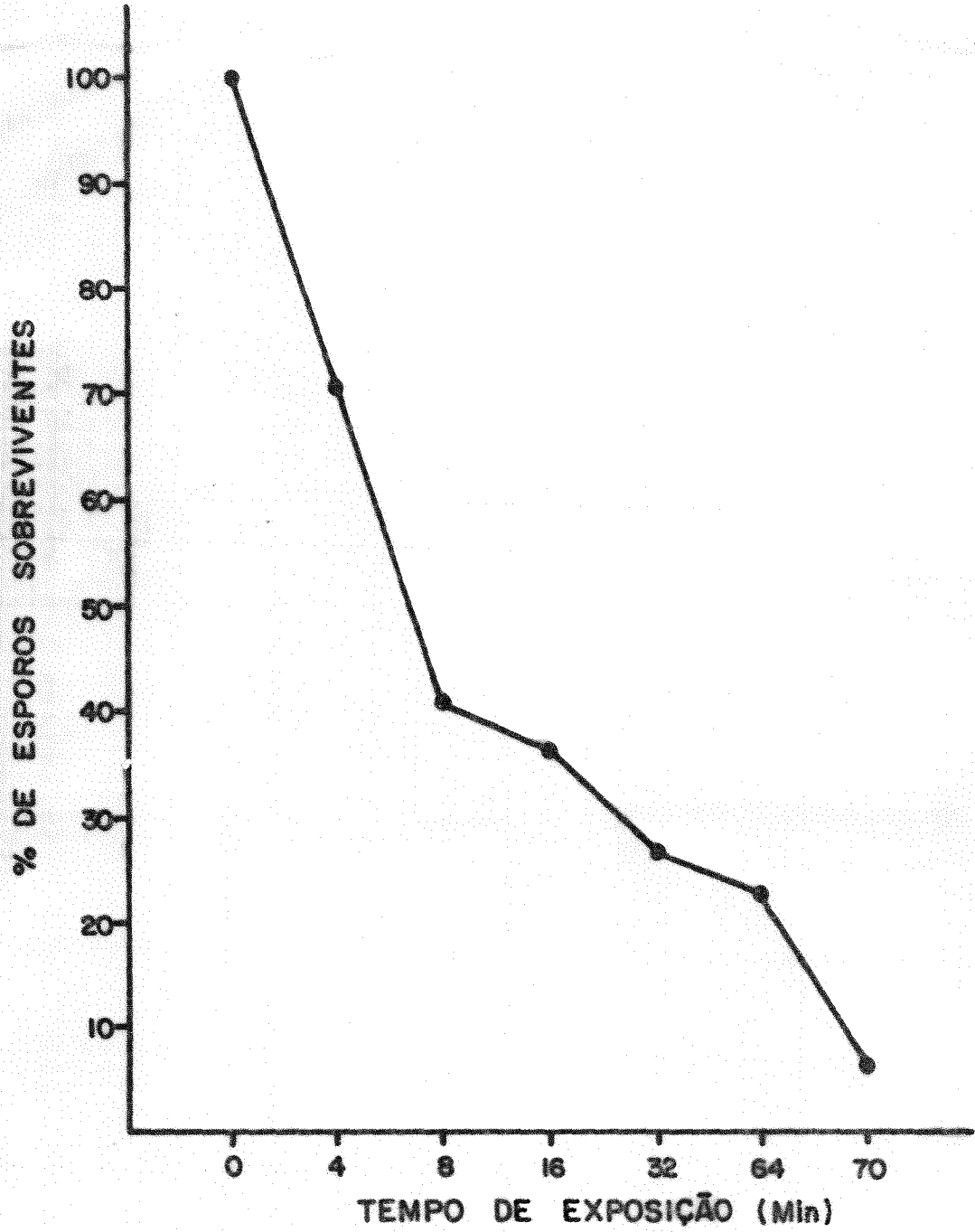


FIG. 1 , SOBREVIVÊNCIA DE ESPOROS DE T. HARZIANUM (TH32) EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO A LUZ ULTRA-VIOLETA.

4.4.2. Sobrevivência de T. harzianum a radiação gama e obtenção de novos biótipos

A dose de radiação gama capaz de inviabilizar 60% dos esporos do isolado de *T. harzianum* (TH32), foi por volta de 50-Gy (Figura 2), apesar de que na dose de 75 Gy a sobrevivência relativa foi de 23,8%. Dos esporos irradiados na faixa de 50 Gy e transferidos para meio de BDA, conseguiu-se dois mutantes morfológicos em relação a linhagem selvagem (TH32). Um apresentando a cor branca, denominado de "VMT-1" e outro amarelo denominado "VMT-2". Quando comparados com a linhagem original, esses novos biótipos apresentaram crescimento ligeiramente inferior ao da mesma (Tabela 6 e Figura 3).

TABELA 6 - Crescimento micelial do isolado TH32 de *T. harzianum* e duas variantes morfológicas VMT-1 e VMT-2, em meio de batata-dextrose-ágar.

Isolado de <i>T. harzianum</i>	Crescimento micelial		
	horas de incubação		
	24	36	42
TH32	1,95 ¹	3,86 ¹	4,60 ¹
VMT-1	1,78	2,92	3,40
VMT-2	1,61	2,65	3,90

¹ Média de quatro repetições

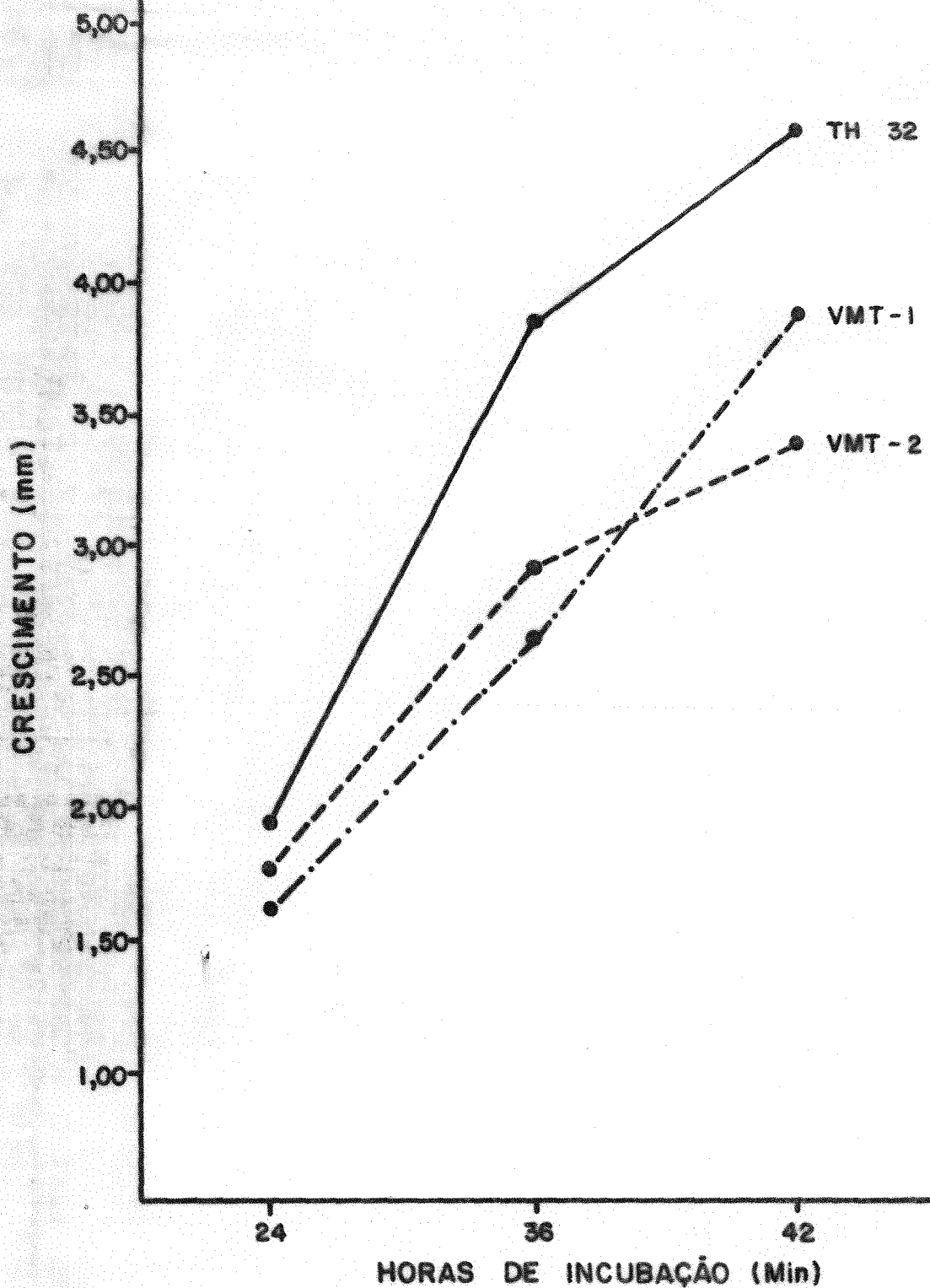


FIG. 3 . CRESCIMENTO MICELIAL DO ISOLADO TH³² DE I. HARZIANUM E, DUAS VARIANTES MORFOLÓGICAS VMT-1 E VMT-2 EM MEIO DE BATATA-DEXTROSE-AGAR.

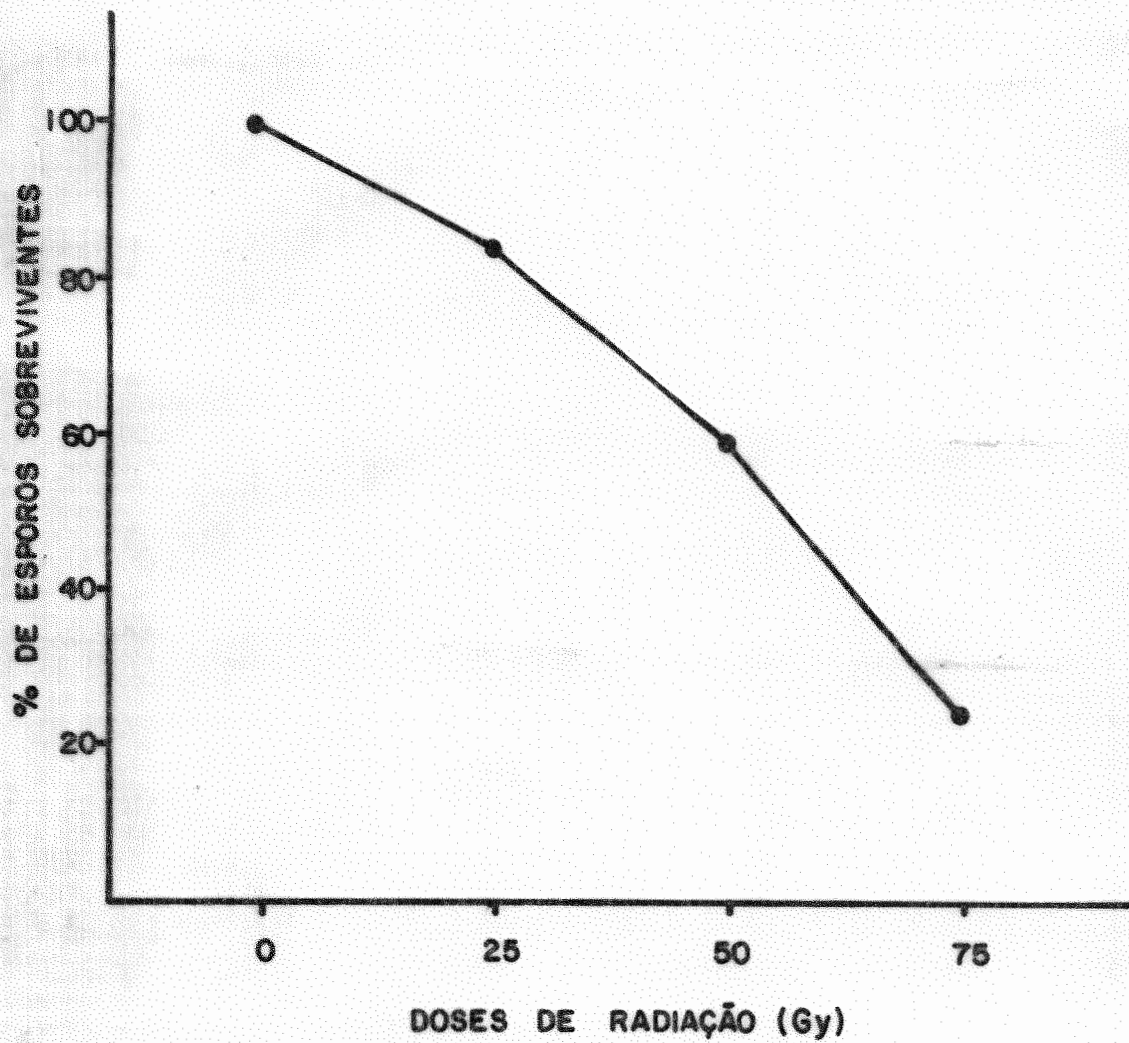


FIG. 2 . SOBREVIVÊNCIA DE ESPOROS DE *I. HARZIANUM* (TH32) SUBMETIDOS A DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO GAMA.

Dentre as duas técnicas utilizadas para obtenção de novos biótipos, a mais eficiente foi a radiação gama, apesar da baixa frequência de aparecimento de colônias diferentes de linhagem selvagem. Os dados de RIFAI (1969) também indicam a dificuldade para obtenção de novos biótipos de *Trichoderma*. Entretanto, PAPAIVIZAS *et alii* (1982) obtiveram biótipos de *T. harzianum* para morfologia alterada, tolerância a benomil, antagonismo a *R. solani*, *S. rolfsii* e *Pythium*, com o uso de radiação ultra-violeta, embora utilizassem tempos de radiação de até 100 minutos.

A radiação gama permitiu a obtenção de dois biótipos de *T. harzianum* com morfologia alterada, concordando com os resultados obtidos anteriormente por TROUTMAN & MATEJKA (1978), os quais conseguiram biótipos de *T. viride*, tolerantes ao benomil. Em função desses resultados pode-se concluir que o emprego de raios gama para obtenção de novos biótipos é viável em espécies do gênero *Trichoderma*.

4.5. Influência de diferentes isolados de T. harzianum no tratamento de sementes de soja inoculadas artificialmente com R. solani.

A análise dos dados obtidos no ensaio mostram que é possível a inoculação das sementes de soja com o fungo R. solani, colocando-os em contato com micélio do fungo por 24 horas. Os resultados mostraram também que houve controle do patógeno pelo tratamento das sementes com T. harzianum (Tabela 7).

TABELA 7 - Avaliação "in vitro" do antagonismo de diferentes isolados de T. harzianum ao fungo R. solani, presente em sementes de soja, cv. Paraná, inoculados artificialmente.

Isolados de <u>T. harzianum</u>	% de sementes sem <u>R. solani</u> ¹	
	x	Vx + 0,5
TH45	87,50 ¹	9,36 a ²
VMT-2	85,00	9,24 ab
VMT-1	80,00	8,96 ab
TH32	77,50	8,82 ab
TH35	75,00	8,68 b
TH20	37,50	6,16 c
TH10	32,50	5,73 c
Testemunha	0,00	0,00 d

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por Vx+0,5

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Teste de Duncan a 5% de significância)

Todos os isolados de *T. harzianum* exerceram ação sobre o fungo *R. solani* presente nas sementes inoculadas artificialmente. Dos sete isolados de *T. harzianum* empregados o TH45 foi o mais eficiente, apresentando controle em cerca de 87% das sementes, seguido de VMT-2, VMT-1, TH32 e TH35. O isolado TH10 foi o menos eficiente. Com exceção os isolados TH32 e TH10, os demais comprovam novamente a sua eficiência, uma vez que em experimento anterior, já se comportaram de maneira idêntica. Apesar de conduzidos independentemente, os resultados do presente experimento podem ser considerados promissores e complementares aos anteriores uma vez que, não se procedeu a assepsia das sementes aproximando-se assim das condições naturais. Outra evidência é a indicação do potencial para emprego desse gênero de microrganismo para controle desse patógeno quando este se achar presente em sementes principalmente como contaminante. O tratamento de sementes com microrganismo antagonistas pode constituir um método econômico e importante para proteção das plântulas em pré e pós-emergência. Uma das maneiras de atuação do agente de biocontrole é a destruição de inóculo do patógeno presente nas sementes (KOMMEDAHL & WINDELS, 1978). Segundo MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986), fungos do gênero *Trichoderma* são excelentes agentes de biocontrole de *R.*

solani, causador do tombamento de plantas quando inoculados ao solo.

Os resultados de controle de **R. solani** presentes nas sementes de soja, através do emprego de esporos de diferentes isolados de **T. harzianum** concordam com os dados de KOMMEDAHL & WINDELS (1978), MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986), pois nas sementes tratadas foram observadas reduções acentuadas de sementes com patógeno. Em condições de campo isso poderia significar uma redução do inóculo introduzido, sem considerar a ação dos antagonicos na proteção das sementes antes e durante o processo de germinação, além de posterior proteção das plântulas. A variabilidade verificada entre isolados, incluindo as variantes obtidos artificialmente, sugere que uma seleção pelo uso do melhoramento genético para obtenção de isolados de **Trichoderma** com maior eficiência, é um processo que pode conduzir a resultados promissores.

4.6. Tolerância de diferentes isolados de **T. harzianum** a fungicidas presentes em sementes de soja tratadas

Os resultados obtidos (Tabela 8) mostram diferenças quanto a tolerância dos sete isolados de **T. harzianum** aos fungicidas captan, thiram, thiabendazole e thiram + iprodione, presentes em sementes de soja

tratadas. Não foi verificado comportamento diferenciado para os dois biótipos de TH32 (VMT-1 e VMT-2). Dos fungicidas utilizados somente o thiabendazole foi prejudicial a todos os isolados. Foi verificada a presença de halo de inibição de desenvolvimento da colônia de *Trichoderma*, ao redor de todas as sementes tratadas com esse fungicida. O resultado mostra a inibição do crescimento, causado pelo fungicida thiabendazole e, concorda com os dados de ABDEL MOITY et alii (1982), ALLEN et alii (1980), CHANG et alii (1986) e DAVET et alii (1981), de que isolados de *T. harzianum* não são tolerantes a benzimidazóis, mas toleram captan, iprodione, thiram. O estudo realizado é uma associação do tratamento químico e biológico, apesar de não se ter levado em consideração a microflora presente nas sementes. Os resultados obtidos permitem verificar que é possível empregar determinados fungicidas no tratamento das sementes, mesmo quando se desejar proceder a um pós-tratamento destas com fungos do gênero *Trichoderma* podendo, desta maneira, ter uma melhor performance do tratamento como um todo. Isso já havia sido proposto por RICHARDSON (1954), após ter observado uma tolerância de até 6,2 ppm de thiram por *T. viride*. Todavia, são necessários estudos mais detalhados com relação a dosagem de fungicidas e tolerância por outros isolados selvagens, bem como a atuação sobre os vários microrganismos

presentes nas sementes ou componentes da microflora do solo de semeadura. Os resultados também fazem supor que um melhoramento genético possa ser considerado com a finalidade de obtenção de linhagens que apresentem alta tolerância a fungicidas comumente utilizados.

TABELA 8 - Reação de sete isolados de *T. harzianum* a fungicidas presentes em sementes de soja, cv. Paraná, em meio de BDA.

Isolado de <i>Trichoderma</i> sp.	Reação aos fungicidas ¹			
	Captan	Thiran	Thiabendazole	Thiran + Iprodione
TH10	-	-	+	-
TH20	-	-	+	-
TH32	-	-	+	-
TH35	-	-	+	-
TH45	-	-	+	-
VMT-1	-	-	+	-
VMT-2	-	-	+	-

¹ - = ausência de halo ao redor da semente de soja tratada; + = presença de halo ao redor da sementes tratada. Média de quatro repetições.

4.7. Efeito do tratamento biológico e químico sobre a sanidade de sementes e emergência de plântulas de soja em condições de campo

O objetivo principal do experimento foi a eliminação de fungos do gênero *Aspergillus* além de outros microrganismos presentes em níveis elevados nas sementes. Os resultados obtidos sobre os tratamentos de sementes com esporos diferentes isolados de *T. harzianum* e/ou fungicidas estão apresentados na Tabela 9. O tratamento com esporos do isolado TH32 e o mutante morfológico VMT-1, controlaram, respectivamente, 77 e 79% do *Aspergillus* sp. sobre as sementes. Os demais isolados apresentaram eficiência inferior. O fungicida captan conseguiu eliminar cerca de 92% do *Aspergillus*.

De maneira geral, a mistura de esporos de *Trichoderma* com fungicida foi mais eficiente do que o fungo sozinho, mas não foi superior ao tratamento químico. Apesar de não apresentar eficiência superior ao tratamento químico, a mistura de ambos poderá ser benéfica para veiculação dos esporos para implantação desses antagonicos em áreas de cultivo, visando o seu estabelecimento para controle futuro de patógenos presentes nas sementes e no solo.

TABELA 9 - Porcentagem de sementes de soja, cv. Paraná, associadas a microrganismos sob diferentes tratamentos com esporos de *Trichoderma harzianum* e/ou fungicidas.

Porcentagem em sementes ¹						
Tratamentos	<i>Alternaria</i> tenuis	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>C. kikuchii</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	Bactérias não identificadas
T32	0,90	19,25	1,00	0,00	0,00	4,50
T35	0,13	38,75	0,00	2,00	0,00	7,00
T45	0,08	42,25	0,75	1,75	1,50	2,50
VNT-1	0,67	22,75	1,50	0,25	0,00	6,75
VNT-2	1,07	25,75	1,00	0,75	0,00	7,75
T32+thiram	0,70	28,00	0,00	0,00	0,00	11,50
T32+captan	1,70	17,75	0,00	0,00	3,00	12,50
T35+thiram	0,36	16,25	0,00	1,75	0,00	9,50
T35+captan	1,20	15,75	0,00	0,00	0,00	9,00
T45+thiram	1,05	24,50	0,75	2,00	0,00	15,50
T45+captan	0,82	9,00	0,00	0,00	0,00	11,25
Thiram	1,03	4,05	0,00	1,00	0,00	12,25
Captan	0,95	6,75	0,00	0,50	0,75	10,75
Testemunha	1,85	04,00	1,00	1,75	7,00	2,75

¹ Médias de quatro repetições.

4.8. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas e esporos de T. harzianum produzidos em substratos naturais, sobre a emergência de plântulas em condições de campo

Os resultados obtidos sobre a emergência de plântulas oriundas de sementes tratadas com esporos de T. harzianum (TH32) e fungicidas (Tabela 10), e semeadas em solo em condições de campo, mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 11). Mostraram também os efeitos benéficos do emprêgo desse microrganismo no sistema.

A maior porcentagem de emergência foi observada no tratamento das sementes com esporos do fungo, multiplicado em farelo de arroz, o qual promoveu um aumento de 70% na germinação em relação ao controle sem tratamento. Além deste, o tratamento com esporos produzidos em grãos de aveia preta, bagacilho + farelo de arroz, grãos de sorgo sacarino e farelo de milho, apresentaram eficiência superior aos tratamentos com thiram, thiram + iprodione e captan.

TABELA 10 - Porcentagem de sementes de soja, cv. Paraná, com associação de microorganismos, após o tratamento com suspensão de esporos (10^8) de cinco diferentes isolados de *T. harzianum*.

Microorganismos	Isolados de <i>T. harzianum</i> / % sementes com microorganismos ¹					
	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2	Testemunha
<i>Phomaopsis sojae</i>	0,00	0,33	0,01	0,00	0,00	1,25
<i>Cercospora kikuchii</i>	0,15	0,00	0,75	0,25	0,00	0,90
<i>Fusarium</i> sp.	0,00	2,00	1,75	0,25	0,75	2,25
<i>Aspergillus</i> sp.	19,50	38,75	42,25	22,75	25,75	84,50
<i>Penicillium</i> sp.	0,00	0,00	1,50	0,00	0,00	7,75
<i>Alternaria tenuis</i>	0,90	0,13	0,08	0,67	1,07	1,70
<i>Curvularia</i> sp.	0,16	0,08	0,00	0,12	0,05	0,13
Bactérias não identificadas	4,50	7,00	2,50	6,75	7,75	1,50
% Sementes germinadas sadias	61,50	65,00	55,75	59,50	57,75	27,00

¹ Média de quatro repetições.

TABELA 11 - Porcentagem de emergência de plântulas oriundas de sementes de soja, cv. Paraná, tratadas com esporos do isolado TH32 de *T. harzianum* desenvolvidos em diferentes substratos.

Tratamentos	% de Emergência ¹ (aos 8 dias)
Farelo de arroz	96,00 a
Grãos de aveia preta	89,37 b
Bagacilho + farelo arroz	79,50 c
Grãos de sorgo sacarino	79,25 c
Farelo de milho	78,00 c
Thiram	72,10 d
Quirera de milho	72,05 d
Thiram + iprodione	69,62 d
Meio de batata-dextrose-ágar	63,50 e
Captan	62,62 e
Bagacilho + farelo de milho	38,25 f
Controle sem tratamento	20,07 g

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (teste de Duncan a 5% de significância); média de quatro repetições

4.9. Comparação da eficiência do tratamento de sementes com esporos de um isolado selvagem e dois mutantes morfológicos de T. harzianum, produzidos em substratos naturais; avaliação em condições de campo

A análise dos dados da porcentagem de emergência mostra diferenças do efeito benéfico obtido. Foram constatadas diferenças entre os substratos utilizados para um mesmo isolado, bem como entre os três isolados do fungo, para um mesmo substrato. Sem considerar o substrato de multiplicação, a ordem dos isolados por funcionamento, foram o mutante VMT-2, seguido de VMT-1 e TH32, com percentuais de aumento da germinação em torno de 139,40, 131,92 e 114,67%, respectivamente, quando comparados ao controle sem tratamento. Da mesma forma os substratos que proporcionam melhor eficiência na produção de esporos para tratamento das sementes foram o farelo de arroz e grãos de aveia preta, destacando-se o farelo de arroz para três isolados empregados (Tabela 12).

Os resultados obtidos mostram o potencial do emprego de mutantes de T. harzianum no tratamento de sementes de soja. De modo geral, todos os tratamentos favoreceram e aumentaram o percentual de germinação,

quando comparados ao controle sem tratamento. Ficou demonstrada a possibilidade do uso de *T. harzianum* (isolados selvagens e mutantes) para promover uma maior emergência de plântulas de soja, multiplicando-os em substratos naturais.

TABELA 12.- Emergência (%) de plântulas de soja, cv. Parana, sementes inoculadas com esporos de *T. harzianum* e semeadas em suspensão de campo.

Tratamento	<i>T. harzianum</i> /porcentagem de emergência aos 8 dias ¹						Médias
	TH32		VMT-1		VMT-2		
	x	arc.sen	x	arc.sen	x	arc.sen	
	$\sqrt{x/100}$		$\sqrt{x/100}$		$\sqrt{x/100}$		
Farelo de arroz	92,22	73,81aA	96,20	78,77aA	97,78	81,44aA	78,00
Grãos de aveia preta	89,49	70,99bA	89,49	71,08bA	90,76	72,31bA	71,46
Grãos de sorgo sacarino	73,11	58,77cB	79,25	62,90cA	80,63	63,89cA	61,85
Farelo de milho	71,11	57,49cdB	78,00	62,03cA	78,25	62,20cA	60,57
Quirera de milho	68,23	55,69deB	72,12	58,13dB	77,75	61,85cA	58,55
Bagacilho + farelo de milho	59,07	50,22fA	38,24	38,10iB	38,86	38,56fB	42,32
Meio de BDA	58,05	49,63fB	63,52	52,84f ⁹ A	66,75	54,79dA	52,42
Bagacilho + farelo de arroz	50,62	45,35gB	79,51	63,09cA	78,76	62,55cA	56,99
Bagacilho	48,44	44,11gA	52,07	46,18hA	50,00	45,00eA	45,09
Testemunha sem tratamento	20,03	26,59	20,03	26,59	20,03	26,59	26,59

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (Teste de Duncan a 5% de significância); média de quatro repetições

Apesar de não ter sido quantificada a flora microbiana nos diferentes tratamentos, pelos resultados obtidos para emergência, provavelmente os isolados de *T. harzianum* atuaram como inibidores de microrganismos prejudiciais presentes nas sementes (Tabela 10) e no solo ou estimularam o desenvolvimento da flora microbiana benéfica. Provavelmente ocorreu eliminação dos microrganismos causadores do apodrecimento das sementes e/ou raízes de plântulas.

Um dos problemas da aplicação de antagonistas ao solo é sua incapacidade para se estabelecer no ecossistema e competir com a microflora do solo. Esse obstáculo pode em parte ser vencido através da aplicação do agente de biocontrole via semente após ter sido desenvolvido em base alimentar favorável (HADAR et alii, 1979; WELLS et alii, 1972). Nos experimentos conduzidos ficou evidenciado a eficiência de substratos naturais como farelo de arroz, farelo de milho, bagacilho e grãos de aveia preta.

Os resultados satisfatórios obtidos com o emprego dos mutantes morfológicos de *T. harzianum* (VMT-1 e VMT-2) concordam com as afirmações de MONTENECOURT & EVELEIGH (1977, 1979), de que a obtenção de mutantes de espécies de fungos do gênero *Trichoderma* é viável, pois podem mostrar maior capacidade para a produção de enzimas e com qualidades superiores ao isolado selvagem.

Concordam ainda com DURRELL (1968), que afirma que o *Trichoderma* difere na sua capacidade de inibir os diferentes patógenos. Os substratos adicionados junto à suspensão de esporos ou os esporos neles multiplicados, podem exercer influência no controle biológico. Seja protegendo o hospedeiro após a aplicação inicial ou favorecendo a sobrevivência através do estímulo ao aumento do número de propágulos. ELAD et alii (1982) observaram que *T. harzianum* persistiu por mais de três meses em solo quando multiplicado em farelo de trigo, postulando ser isto devido à presença de determinadas substâncias, principalmente fontes de carbono. Porém é necessário selecionar os substratos, uma vez que substâncias como polissacarídeos podem estimular determinados patógenos como *Pythium* e *Rhizoctonia solani*, agentes causais do tombamento de plântulas.

Os resultados obtidos diferem daqueles obtidos por KAISER (1984), que comparou o tratamento de sementes com esporos de *T. hamatum*, *T. harzianum* e os fungicidas metalaxyl e captan, em grão de bico, em condições de campo. O autor não observou diferenças positivas para o tratamento com *Trichoderma* que foi inferior ao tratamento químico. No presente estudo, o isolado TH32 e os mutantes VMT-1 e VMT-2 foram capazes de promover aumento na emergência das plantas em índices superiores ao tratamento com o fungicida thiram.

O *T. harzianum* pode promover um controle efetivo do apodrecimento de sementes e raízes em pré e pós-emergência, bem como do tombamento das plântulas (HARMAN et alii, 1980, 1981), fato constatado nos experimentos, principalmente quando o fungo antagonico foi desenvolvido em farelo de arroz e grãos de aveia preta.

Uma possível explicação para os melhores resultados na emergência de plântulas oriundas de sementes tratadas com esporos de *T. harzianum*, em comparação ao tratamento químico, é que os esporos do fungo veiculados junto às sementes quando em contato com o solo germinaram e o micélio além de fornecer proteção aos cotilédones acompanharam o desenvolvimento do sistema radicular protegendo-o. O fungicida aderido às sementes pode ter tido persistência limitada e por ocasião da sementeira, foi diluído no solo, não translocando para o sistema radicular. Em termos de princípio ativo, no tratamento biológico teremos um maior índice que no químico, quando se compara o número de esporos e a quantidade de fungicida presente nas sementes.

É possível que resultados mais satisfatórios possam ser obtidos através de: a. seleção de isolados de *Trichoderma*, mais eficientes para controle de patógenos de sementes e solo, e b. pela pesquisa de um número maior de substratos para produção de inóculo,

independente de serem ou não esterilizados e pela correlação entre isolado de *Trichoderma* sp. x substratos x variedade x região (condição climática, solo, etc.), sempre voltado para sanidade de sementes e plântulas.

Os diversos experimentos envolvendo o tratamento de sementes de soja com esporos de isolados de *T. harzianum* e/ou fungicidas revelaram que: a. o fungo *T. harzianum* possui capacidade para eliminar microrganismos presentes nas sementes, sendo no caso o maior percentual de eliminação o de *Aspergillus* spp.; b. mutantes do TH32 apresentaram bom potencial para emprêgo nesse tipo de controle; c. o *T. harzianum* possui boa tolerância aos fungicidas thiram e captan, utilizados normalmente em tratamento de sementes; d. em função do substrato em que for desenvolvido o *T. harzianum* a sua eficiência poderá ser melhorada; e. quando comparado ao tratamento químico, o tratamento biológico foi inferior, e f. a combinação químico com o biológico, apesar de inferior ao químico, foi superior ao biológico. O efeito dessa combinação a longo prazo poderá ser superior ao controle biológico, porém é necessário mais pesquisas nesse sentido.

4.10. Sobrevivência do fungo T. harzianum aplicado sob a forma de esporos em sementes de soja

A análise da porcentagem de sobrevivência dos esporos, quantificada pelo surgimento de colônias junto a sementes de soja em meio de cultura, revelou diferenças significativas entre os isolados do fungo, (Tabela 13). De modo geral, as maiores porcentagens de sobrevivência foram obtidas até os 90 dias, ocorrendo um decréscimo a partir desse período. Independente do período de avaliação, o isolado TH32 de T. harzianum foi o que apresentou a maior média de sobrevivência e o isolado TH10 a menor de 30 aos 240 dias. Os resultados obtidos mostram claramente a variabilidade quanto a sobrevivência existente entre isolados quando seus esporos são aplicados em sementes de soja. Para os biótipos de TH32 (VMT-1 e VMT-2), não foram observadas evidências de maior capacidade de sobrevivência, em comparação à linhagem original. Ficou evidenciada, a capacidade de sobrevivência de esporos na superfície de sementes de soja, quando estocadas em condições ambiente. Aos 240 dias, 50% das sementes tratadas com esporos de TH32 se apresentaram com esporos viáveis, produzindo colônias do fungo quando plaqueadas em meio de cultura, sem problemas de contaminação por outros microrganismos.

TABELA 13 - Sobrevivência de diferentes isolados de *Trichoderma harzianum*, em sementes de soja, cv. Paraná, inoculadas com suspensão de esporos (10^9 esp./ml) e estocadas em ambiente; verificação em meio de BDA.

Isolados de <i>T. harzianum</i>	% de sementes com esporos do fungo ¹										
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		240 dias		Média
	x	$\sqrt{x+1}$	x	$\sqrt{x+1}$	x	$\sqrt{x+1}$	x	$\sqrt{x+1}$	x	$\sqrt{x+1}$	
TH32	99,99	10,04aA	93,70	9,73abA	91,23	9,60aAB	86,20	9,33aB	49,93	7,13aC	9,17a
TH35	98,74	9,98abA	96,20	9,85aA	84,96	9,27aB	74,95	8,71bC	30,47	5,61dB	8,68b
VNT-1	98,23	9,96abA	88,73	9,47abB	83,73	9,20aB	74,79	8,70bC	31,11	5,66bcD	8,60bc
VNT-2	92,98	9,69abA	92,48	9,66aA	83,69	9,20aA	69,95	8,42bB	27,44	5,33cC	8,53bc
TH45	89,96	9,53abA	79,96	8,99bB	47,46	6,96bC	38,47	6,28cD	9,95	3,30dE	8,46c
TH20	89,23	9,49bA	87,48	9,40abA	86,23	9,34aB	69,95	8,42bB	34,91	5,99bC	7,01d
TH10	49,93	7,13cA	9,23	3,19cB	8,48	3,07cB	4,46	2,23dC	0,39	1,18eD	3,38e
	87,94	9,40A	73,24	8,61B	64,52	8,09C	54,66	7,46D	22,91	4,89E	

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (teste de Duncan a 5% de significância); média de quatro repetições.

Pelos resultados obtidos parece ser perfeitamente viável utilizar o tratamento de sementes de soja, com esporos de *T. harzianum* por ocasião do beneficiamento e desta forma, ter uma proteção até a ocasião do beneficiamento.

O tratamento poderá promover a proteção das sementes contra microrganismos presentes externamente e internamente a estas, promover maior porcentagem de emergência e desenvolvimento das plântulas, além de em alguns casos fornecer proteção indireta na fase adulta das plantas. Essas afirmações estão de acordo com KOMMEDHAL & WINDLES (1978), de que o tratamento biológico de sementes com antagonistas é um método econômico e importante, o qual atua na destruição de patógenos presentes nas sementes e fornece proteção contra os do solo. Provavelmente o *T. harzianum* atue de maneira idêntica à observada por WINDLES (1981), com *Penicillium oxalicum*, que em sementes de ervilha tratadas formou uma malha hifálica e esporulou abundantemente durante o processo de germinação, protegendo-as.

A concentração de inóculo empregada pareceu ter sido adequada, uma vez que a sobrevivência foi satisfatória para alguns isolados. Para maior sobrevivência do fungo é necessário promover seleção a partir de um número maior de isolados dessa e de outras espécies, inclusive complementando o estudo com dados de emergência e sobrevivência em campo, uma vez que vários autores como HADAR *et alii* (1984), HARMAN *et alii* (1981) e KAISER (1984), enfatizam que fatores como tipo, pH e temperatura do solo, devem ser conhecidos para que se

tenha sucesso no tratamento de sementes com microrganismos.

4.11. Efeito de diferentes substratos utilizados para multiplicação; modos de aplicação de T. harzianum (TH32), no desempenho e sobrevivência, em condições de campo

O isolado de T. harzianum (TH32), obtido a partir de sementes de soja, aumentou a emergência de plântulas em relação à testemunha, quando utilizado no tratamento de sementes (Tabela 14). A análise dos dados da emergência de plântulas, revelou diferenças entre as três modalidades de aplicação: a. tratamento das sementes com esporos do fungo; b. aplicação de substrato colonizado pelo fungo, no sulco de semeadura + tratamento das sementes, com esporos e c. aplicação de substrato colonizado pelo fungo no sulco de semeadura. Ocorreram ainda diferenças entre os substratos utilizados para o desenvolvimento do fungo, antagônico potencial. A emergência de plântulas oriundas de sementes tratadas com esporos foi superior aos demais modos de aplicação inclusive a testemunha.

Para tratamento de sementes, os esporos com maior eficiência foram os multiplicados em farelo de

arroz, seguido de grãos de aveia preta (Tabela 15). O farelo de arroz também se destacou às aplicações no sulco de semeadura + tratamento de sementes e semente no sulco. Para tratamento de sulco, o farelo de milho foi o segundo mais eficiente.

Verificou-se que a presença do *T. harzianum* nos cotilédones quando partes destes foram colocados em meio de cultura. Ocorreram variações em função do substrato utilizado. Os maiores percentuais de sobrevivência foram observados no tratamento de sementes com esporos, produzidos em substratos como farelo de arroz, grãos de aveia preta, grãos de sorgo sacarino e bagacilho + farelo de milho (Tabela 16 e 17).

No sistema radicular das plantas verificou-se um alto percentual de sobrevivência de *T. harzianum* com diferença estatística entre eles (Tabela 18). O maior percentual foi observado quando esporos para tratamento das sementes foram multiplicados nos substratos: farelo de arroz, grãos de sorgo sacarino, bagacilho + farelo de milho, grãos de aveia preta, bagacilho. A menor porcentagem de sobrevivência do fungo foi para esporos produzidos em farelo de milho.

TABELA 14 - Porcentagem de emergência de plântulas de soja em campo, em função de três modalidades de tratamento com *T. harzianum* (TH32): sementes, sulco e sulco + sementes.

Tratamentos	Emergência (%)								Médias
	Tipo de inóculo								
	Sem. não inoc.		T. sementes		T. sulc.+semen.		T. sulco		
	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$	
Farelo de arroz	20,02	4,42 b	95,99	9,79 aA	51,47	7,71 eB	48,87	6,99 dB	7,17 f
Grãos de aveia preta	21,00	4,63 a	89,35	9,45 bA	90,12	9,49 aA	76,61	8,75 aB	9,49 a
Bagacilho+farelo de arroz	20,02	4,42 b	79,49	8,91 cA	79,99	8,94 bA	68,24	8,26 bB	8,94 c
Grãos de sorgo sacarino	19,00	4,19 b	79,24	8,90 cA	62,23	7,88 cB	53,74	7,33 cC	7,88 d
Bagacilho	21,00	4,63 a	77,92	8,96 cA	62,18	7,76 cB	78,87	8,88 aC	8,00 c
Farelo de milho	18,00	3,97 c	77,99	8,83 cB	51,47	7,17 eA	53,68	7,28 cB	9,19 b
Quirera de milho	19,02	4,19 b	72,00	8,48 dA	31,73	5,63 gB	27,49	5,24 gC	5,63 h
Meio batata-dextrose-ágar	16,80	3,70 c	63,46	7,96 eA	57,07	7,55 dB	45,11	6,71 eC	7,55 e
Bagacilho+farelo de milho	18,00	3,97 c	38,24	6,18 fA	38,48	6,20 fA	36,85	6,07 fA	6,20 g
Controle sem tratamento			20,02	4,47 gA	20,02	4,47 hA	20,02	4,47 hA	4,47 i
Médias			65,81	8,11 a	54,70	7,39 b	48,57	6,96 c	

* Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (Teste de Duncan a 5% de significância); média de quatro repetições

TABELA 15 - Efeito de diferentes substratos, sobre produção e viabilidade de esporos de *T. harzianum* (TH32), quando empregados em tratamento de sementes.

Substratos	Número esporos presentes/g de substrato ($\times 10^6$)	Unidades formadas de colônias ¹ ($\times 10^3$) por grama de sementes tratadas com suspensão de esporos 10^6 (2 ml/100 g) ²	
Bagacilho+farelo de arroz (1:1)	15,35	126,25 ^a	11,23 a ²
Bagacilho	5,25	80,5	8,96 b
Grãos de aveia preta	21,90	59,25	7,69 c
Farelo de arroz	11,57	45,25	6,71 d
Quirera de milho	13,80	40,00	6,32 de
Quirera de arroz	14,47	35,75	5,96 e
Quirera de milho+solo(3:1)	12,00	26,25	5,11 f
Grãos de trigo	3,22	26,00	5,09 f
Grãos de centeio	3,02	23,00	4,79 fg
Farelo de milho ⁴	4,40	21,25	4,60 gh
Quirera de arroz+areia lavada(3:1)	12,75	19,50	4,40 ghi
Fubá de milho+areia lavada(1:1)	5,67	19,00	4,35 ghi
Grãos de sorgo sacarino	2,27	18,75	4,32 ghi)
Meio de batata-dextrose-agar(BDA)	15,90	17,75	4,21 hij
Vermiculita+turfa	4,30	17,75	4,02 ijk
Bagacilho+farelo de milho	5,32	15,00	3,86 jk
Fubá de milho+areia lavada(3:1)	3,68	14,00	3,73 k
Farelo de arroz+areia lavada(3:1)	6,95	13,00	3,59 k
Grãos de milho de pipoca	4,40	6,75	2,59 l
Vermiculita+farelo de milho	8,82	6,00	2,44 l
Naste de soja seccionada	2,77	5,50	2,31 l

¹ Recuperadas em meio Martin modificado para *Trichoderma*, a partir de suspensão de esporos obtidas de sementes tratadas (2 ml de suspensão de 10^6 esporos/ml/100 g de sementes); médias de quatro repetições.

² Dados transformados por $Vx+0,5$

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Duncan.

TABELA 16 - Porcentagem de cotilédones de soja, cv. Paraná, com presença do fungo *T. harzianum*, empregado no tratamento das sementes por ocasião da semeadura.

Tratamentos	Cotilédones com Trichoderma (%) ¹					
	TH32		VMT-1		VMT-2	
	x	arc sen(SQR(x/100))	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$
Farelo de arroz	97,50	84,96 a	80,50	8,96 a	86,25	9,31 ab
Grãos de avia preta	97,50	84,96 a	93,75	9,68 a	91,25	9,57 a
Grãos de sorgo sacarino	93,75	77,40 ab	82,50	9,06 b	78,75	8,89 b
Bagacilho+farelo de milho	90,00	73,99 ab	80,50	8,96 b	78,00	8,85 b
Bagacilho	89,25	70,97 b	82,50	9,07 b	80,00	8,95 b
Bagacilho+farelo de arroz	88,00	69,80 b	83,00	9,10 b	76,25	8,75 b
Quirera de milho	62,50	52,55 c	70,00	8,36 c	66,25	8,16 c
Meio de batata-dextrose-ágar	53,00	46,73 c	46,25	6,79 d	45,00	6,74 d
Farelo de milho	32,00	34,18 d	26,00	5,09 e	28,00	5,33 e
Testemunha	1,00	4,90 e	0,25	0,25 f	0,50	0,92 f
	70,45	60,04	64,52	7,57	63,02	7,55

¹ Média de quatro repetições

TABELA 17 - Porcentagem de cotilédones com *T. harzianum* (TH32 de plântulas de soja oriundas de sementes tratadas com suspensão de esporos e semeadas em sulcos infestados ou não com diferentes substratos colonizados.

Tratamentos	% de recuperação			
	sementes tratadas		sementes tratadas + sulco tratado com substrato	
	x	arc sen $\sqrt{x}/100$	x	arc sen $\sqrt{x}/100$
Farelo de arroz	98,21	82,32 aA	90,30	74,32 aA
Quirera de milho	95,47	77,72 abA	92,69	74,32 aA
Grãos de soja sacarino	93,37	75,08 abcA	87,01	68,87 abA
Bagacilho + farelo de milho	88,93	70,57 bcdA	85,17	67,35 abA
Bagacilho + farelo de arroz	86,60	68,53 cdeA	82,87	65,55 abA
Quirera de arroz	83,04	65,58 deA	75,08	60,05 bA
Grãos de aveia preta	82,98	65,63 deA	82,87	65,55 abA
Bagacilho	80,51	63,80 deA	82,87	65,55 abA
Vermiculita + turfa	74,13	59,43 eA	77,75	61,85 bA
Farelo de milho	52,51	46,44 fA	60,10	50,83 cA
Farelo de milho + vermiculita	49,91	44,95 fA	53,80	47,18 cA
Controle sem tratamento	0,73	4,90 g	0,25	2,86 d

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5% de significância (teste de Duncan)

TABELA 18 - Recuperação de *T. harzianum* em meio de Martin modificado para *Trichoderma*, a partir de raízes de plântulas de soja, cv. Paraná, aos 30 dias de idade, originárias de sementes tratadas com suspensão de esporos produzidos em diferentes substratos.

Tratamentos	% de raízes com <i>T. harzianum</i>	
	x	arc sen $\sqrt{x/100}$
Farelo de arroz	95,35 ¹	77,55 a ²
Grãos de sorgo sacarino	85,17	67,35 b
Bagacilho+farelo de milho	84,60	66,89 b
Grãos aveia preta	77,75	61,85 b
Bagacilho	77,75	61,85 b
Quirera de milho	47,48	43,55 c
Meio de batata-dextrose-ágar	28,66	32,37 d
Bagacilho + farelo de arroz	29,93	33,16 d
Farelo de milho	28,22	32,09 d
Testemunha	0,36	3,46 e

¹ Médias de quatro repetições

² Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem entre si (teste de Duncan a 5% de significância)

Dados originais transformados por arc sen $\sqrt{x/100}$

Na avaliação da população de *T. harzianum* em solo, no final de ciclo das plantas de soja, alguns substratos e modo de aplicação se destacaram (Tabela 19). Os substratos que mais favoreceram a sobrevivência do fungo durante todo o ciclo das plantas foram o bagacilho + farelo de milho, tanto no tratamento de sementes como a aplicação em sulco de semeadura. O substrato colonizado

com o fungo, aplicado no sulco de semeadura, foi o que mais favoreceu a sobrevivência e a multiplicação do fungo.

Entre os dados da sanidade de raízes avaliada no final de ciclo, através da verificação e contagem de raízes escurecidas ou não, determinação do porcentual, foram verificadas diferenças estatísticas entre os substratos utilizados na multiplicação do fungo e modos de aplicação do inóculo (Tabela 20). No tratamento das sementes com esporos do fungo *T. harzianum* (TH32), produzidos em quirera de milho, farelo de milho, bagacilho + farelo de milho, farelo de arroz, foram verificados os menores percentuais de raízes de plantas de soja escurecidas. No sistema de tratamento de sulco com substrato infestado + sementes com suspensão de esporos e, tratamento de sulco só destacaram-se, grãos de aveia preta e, bagacilho + farelo de arroz. Nas raízes escurecidas além de saprófitas, foi verificada a presença dos fungos, *Fusarium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Rosellinea* sp.

TABELA 19 - Presença do fungo *T. harzianum* (TH32) em solo, no final do ciclo da cultura de soja detectada através do método da diluição de solo em série, plaqueado em meio de Martin modificado para *Trichoderma*.

Tratamentos	Colônias recuperadas (diluição 10 ⁻³)			
	sem. inoculadas		sulco infestado	
Bagacilho + farelo de milho	21,42 ¹	4,68 a ²	24,48	4,99 a
Farelo de arroz	12,80	3,64 b	21,42	4,68 b
Bagacilho	12,77	3,64 b	6,94	2,72 c
Grãos aveia preta	3,87	2,09 c	7,12	2,76 c
Bagacilho + farelo de arroz	2,04	1,59 c	24,58	5,00 a
Quirera de milho	2,05	1,58 c	6,92	2,71 c
Grãos de sorgo sacarino	1,88	1,54 c	5,87	2,52 d
Farelo de milho	1,73	1,49 c	3,78	2,06 e
Meio de batata-dextrose-ágar	1,72	1,47 c	5,86	2,50 d
Testemunha	0,06	0,74 d	1,62	1,08 f

¹ Média de quatro repetições

² Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância)

TABELA 20 - Porcentagem de plantas com sistema radicular com a presença dos fungos *M. phaseolina*, *Rosellina* sp., *Fusarium* sp. e outros saprófitos, no final do ciclo das plantas de soja.

Tratamentos	% de plantas com raízes escurecidas						
	Trat. sem.		Trat. sul.+sem.		Trat. de sulco		Médias
	x	$\sqrt{x+1}$	x	arc sen SQR(x/100)	x	arc sen SQR(x/100)	
Quirera de milho	1,8 ¹	1,65 a ²	8,85 ¹	11,35 ab ²	8,05 ¹	2,83 cde ²	6,23 ab ²
Farelo de milho	2,65	1,84 a	3,05	9,31 a	6,12	2,43 cde	3,94 a
Bagacilho + farelo de trigo	4,02	2,13 a	4,40	11,92 ab	7,82	2,74 cde	5,41 ab
Farelo de arroz	4,82	2,16 a	18,67	25,34 d	16,17	3,98 de	3,22 c
Bagacilho + farelo de arroz	5,67	2,44 ab	4,70	11,49 ab	5,37	2,28 ab	5,24 ab
Grãos de sorgo sacarino	5,10	2,45 ab	9,47	16,31 bc	7,52	2,72 cde	7,36 bc
Bagacilho	9,72	3,27 bc	8,92	17,35 bc	9,35	3,03 bc	9,36 bc
Grãos de aveia preta	11,02	3,39 cd	3,92	11,35 ab	5,12	2,24 a	6,68 ab
Meio de batata-dextrose-ágar	15,80	3,91 cd	17,70	24,86 c	16,17	3,98 de	16,55 d
Testemunha	16,90	4,19 d	17,90	24,88 c	18,52	4,28 de	17,17

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por:

$\sqrt{x+1}$, arc sen SQR(x/100)

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância)

Segundo MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986), fatores como sistema de multiplicação, modo de aplicação do agente de biocontrole, são tão importantes quanto a identificação de antagonistas superiores. Para ser efetivo o microrganismo antagônico necessita ser capaz de manter sua existência quando exposto à competição com a

microflora nativa do solo e ser capaz de exercer ação antibiótica quando o balanço microbiano é alterado ou quando novos antagonistas aparecerem com o desenvolvimento da planta.

No presente estudo, os resultados obtidos sobre a emergência de plântulas e sobrevivência de *T. harzianum*, mostraram o efeito antagônico sobre a microflora prejudicial presente em sementes e solo, quando empregado sob a forma de tratamento de sementes, ou aplicado ao sulco de semeadura. O tratamento das sementes com esporos resultou em maior emergência, maior porcentual de sobrevivência em cotilédones, nas raízes de plântulas e no solo ao final do ciclo. Essa prática, pode ser identificada como potencialmente boa para a aplicação de antagonistas, visando o controle de patógenos, principalmente os de solo. Sendo ainda viável para a veiculação dos microrganismos antagônicos a patógenos de culturas vegetais subsequentes. Além desse aspecto a técnica se enquadra dentro da teoria de que o modo de aplicação precisa ser prático, econômico e adaptável à mecanização.

Como os substratos em que foi desenvolvido o fungo exerceram influência benéfica, aumentando a efetividade do *T. harzianum* sobre a emergência e, sobrevivência em condições de campo, o seu modo de ação pode não ter sido como agente controlador de patógenos,

mas como estimulador da propagação de *T. harzianum* no solo e em consequência estimulando também a capacidade supressiva deste. A causa da baixa eficiência de alguns substratos pode estar ligado ao fato do isolado de *T. harzianum* utilizado não possuir sistema enzimático suficiente para degradar os componentes orgânicos presentes, e assim estes passando os meios a não constituir uma base alimentar ao antagônico, mas sim a outros microrganismos prejudiciais. A cultivar de soja empregada, pode ter contribuído para as diferenças no funcionamento dos diferentes substratos. Como foi empregada uma única cultivar e sabe-se que as sementes ao germinarem, assim como, o sistema radicular das plântulas liberam exudatos que podem influenciar negativamente ou positivamente a microflora presente no ambiente. A variabilidade observada quanto ao desempenho dos isolados de *T. harzianum* no solo, sugere que estes não podem ser estocados por períodos prolongados ou a flora microbiana nativa foi capaz de colonizar e utilizar os componentes contidos nos substratos.

4.12. Influencia do tratamento químico e biológico de sementes sobre a nodulação, em raízes das plantas de soja por Rhizobium japonicum

Os resultados da compatibilidade "in vitro" em meio de YMA entre duas estirpes de *R. japonicum* (SEMIA 587-IPAGRO; SEMIA 5019-IPAGRO) e um isolado selvagem e duas variantes morfológicas de *T. harzianum*, mostram que pode ocorrer influência de alguns isolados do fungo antagônico, sobre estirpes da bactéria fixadora de nitrogênio de soja. Os isolados TH10 e TH45 inibiram o desenvolvimento da estirpe SEMIA 5010-IPAGRO (Tabela 21).

Para o sistema de tratamento de sementes de soja com: a. esporos de *T. harzianum* (TH32, VMT-1, VMT-2); b. fungicida thiram; c. esporos de *T. harzianum* + fungicida thiram, a análise conjunta do número dos nódulos formados, revelou que todos os tratamentos afetaram a nodulação das plantas desenvolvidas em condições de vaso (Tabela 22). Outro aspecto observado é que as bactérias diferem na sua capacidade para formar nódulos, sendo a estirpe SEMIA 587-IPAGRO, a que mais favoreceu a nodulação.

O tratamento das sementes com esporos do isolado TH32 de *T. harzianum* foi o mais prejudicial para a estirpe SEMIA 5019-IPAGRO, em comparação com

tratamentos com thiram + esporos do fungo. Essa situação não foi verificada para os isolados mutantes VMT-1 e VMT-2.

TABELA 21 - Comportamento de duas estirpes de *Rhizobium japonicum* frente a diferentes isolados *T. harzianum*, em meio de cultura, em placas de Petri.

Isolados de <i>T. harzianum</i>	Inibição de crescimento ¹ Isolados de <i>Rhizobium japonicum</i>	
	SEMIA 587-IPAGRO	SEMIA 5019(29W) IPAGRO
TH10	+	-
TH20	-	-
TH32	-	-
TH35	-	+
TH45	+	-
VMT-1	-	-
VMT-2	-	-

¹ - indica ausência de inibição; + indica presença de inibição (halo). Avaliação visual

TABELA 22 - Influência do tratamento de sementes com esporos de *T. harzianum* (TH32, VMT-1 e VMT-2) sobre a nodulação das plantas de soja em condições de casa-de-vegetação.

Tratamentos sementes inoculadas com	Números médios de nódulos formados/planta						Médias
	TH32		VMT-1		VMT-2		
	x	$\sqrt{x+1}$	x	$\sqrt{x+1}$	x	$\sqrt{x+1}$	
Bactéria SEMIA 587-IPAGRO(A)	11,99 ¹	3,60 aA ²	13,22 ¹	3,77 aA ²	12,43 ¹	3,66 aA ²	3,68 a
Bactéria SEMIA 5019 (29W)- -IPAGRO(B)	9,98	3,31 bA	10,42	3,38 bA	10,93	3,45 aA	3,38 b
Bactéria A + esporos de <i>T. harzianum</i>	8,73	3,11 bB	9,23	3,19 bcAB	10,72	3,42 abA	3,24 c
Bactéria B + thiram + esporos de <i>T. harzianum</i>	8,49	3,08 bA	8,74	3,12 bcdA	8,74	3,12 cA	3,10 cd
Bactéria B + thiram	8,24	3,04 bA	7,98	2,99 cdA	7,98	2,99 cA	3,01 de
Bactéria A + thiram	8,23	3,03 bA	7,98	2,99 cdA	8,23	3,03 cA	3,02 de
Bactéria A + thiram + esporos de <i>T. harzianum</i>	6,45	2,73 cB	7,22	2,86 dB	8,98	3,16 bcA	2,91 e
Bactéria B + esporos de <i>T. harzianum</i>	5,72	2,59 cB	8,23	3,03 cdA	8,47	3,07 cA	2,90 e
Controle sem inoculação	0,45	1,20 dA	0,45	1,20 eA	0,45	1,20 dA	1,20 f

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância)

No sistema de tratamento das sementes com esporos de *T. harzianum*, a estirpe SEMIA 587-IPAGRO, foi a mais prejudicada quanto a nodulação, quando comparada a SEMIA 5019-IPAGRO, na mesma condição.

Dos três isolados de *T. harzianum* empregados o VMT-1 foi o menos prejudicial para ambas estirpes, enquanto que os demais apresentaram comportamento diferenciado.

Os resultados obtidos para nodulação mostram apenas que, para o isolado IH32 não existiu muita correspondência entre o teste "in vitro" e "in vivo". Na primeira condição, esse isolado de *T. harzianum*, não mostrou efeito sobre os dois isolados da bactéria, enquanto que para formação de nódulos, este mesmo isolado exerceu influência sobre a estirpe SEMIA 587-IPAGRO. Situação idêntica foi verificada com os isolados VMT-1 e VMT-2.

A estirpe SEMIA 587-IPAGRO, foi prejudicada pelo tratamento das sementes com thiram e pela mistura de thiram mais esporos dos três isolados do fungo, situação não verificada para a estirpe 5019-IPAGRO, a qual foi afetada apenas pelo tratamento das sementes com esporos dos três isolados.

Os dados do experimento concordam em parte com afirmações de HARMAN *et alii* (1981), de que a adição de inóculo de *Rhizobium* sp., junto à suspensão de *T. hamatum*, utilizados no tratamento de sementes de ervilha não promoveu redução significativa no número de nódulos formados. Concordam ainda com ANGEL *et alii* (1981) que inoculando simultaneamente *T. viride* e *R. japonicum* verificaram uma redução no número de nódulos formados, em condições de solo estéril.

Os fungicidas aplicados em sementes são frequentemente tóxicos a *Rhizobium* spp (BOLLEN, 1961;

ODEYEMI & ALEXANDER, 1977). Essa situação ficou evidenciada no ensaio, quando as sementes foram tratadas com fungicida ou mistura fungicida + esporos de *T. harzianum*. Como alguns fungicidas têm marcada influência sobre bactérias do solo é de se esperar que o tratamento químico de sementes com estes, além de influenciar a ação de bactérias do gênero *Rhizobium*, atue também sobre outras bactérias benéficas. Da mesma forma essa afirmação pode ser feita para o *Trichoderma*, apesar de nem todos os isolados empregados terem sido igualmente prejudiciais, reduzindo o número médio de nódulos, nas condições em que se conduziu o ensaio. Talvez uma seleção de isolados com eficiência no controle de patógenos e com boa compatibilidade com a bactéria *Rhizobium* spp, ensaiados em condições de campo, possam fornecer outras informações e contribuir para a aplicação de sistema de controle em larga escala, sem risco de interferência no processo normal de desenvolvimento da planta. Outro ponto importante é que em condições de campo podem existir estirpes da bactéria eficientes para nodulação e adaptadas a esse tipo de gênero e espécie de fungo.

4.13. Ação de fungicidas sobre o crescimento e esporulação de diferentes isolados de T. harzianum

De modo geral, os fungicidas benomil, captan, thiabendazole, iprodione + thiram, thiram, presentes em meio de cultura, exerceram efeito negativo sobre o desenvolvimento dos sete isolados de *T. harzianum* ensaiados (Tabelas de 23 a 27). O efeito exercido foi variável de acordo com o isolado e os fungicidas nas diferentes concentrações. Para benomil, a partir de 10 ppm ocorreram reduções de 100% no crescimento de todos os isolados. A 1 ppm os isolados TH10, TH32, TH35 sofreram reduções acima de 50%. Na concentração de 0,1 ppm os isolados menos afetados foram TH20 e TH45. Com captan todos os isolados foram inibidos apenas em concentração a partir de 1000 ppm. De maneira geral, com esse fungicida a redução do crescimento foi quase que uniforme com o aumento da concentração do produto no meio de cultura. Na concentração de 0,1 ppm o isolado TH45 mostrou ser o mais tolerante. O thiabendazole foi bastante prejudicial ao crescimento dos isolados de *T. harzianum* ensaiados, pois na concentração de 1,0 ppm, os isolados TH32, TH45, VMT-1 e VMT-2 sofreram reduções de até 100% no seu crescimento. A 10 ppm apenas o isolado TH10 sobreviveu, com redução de cerca de 77% no seu crescimento. O fungicida thiram

permitiu o crescimento dos diferentes isolados em concentrações de até 100 ppm e, na concentração de 10 ppm exceção ao isolado TH45, a redução do crescimento não atingiu 50%. A mistura thiram + iprodione permitiu o crescimento dos isolados VMT-1 e VMT-2 em concentrações de até 100 ppm, enquanto que os demais isolados foram inibidos a partir de 10 ppm. Na concentração de 0,1 ppm o isolado TH45 foi o menos afetado.

TABELA 23 - Porcentagem de redução do crescimento de diferentes isolados de *T. harzianum*, em meio de batata-dextrose-ágar, contendo diferentes concentrações de benomil.

Concentrações de i. ativo ppm	% de redução do crescimento ¹ isolados de <i>T. harzianum</i>						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	19,23	1,45	22,81	7,83	2,00	6,69	5,59
1	67,56	40,00	58,21	58,53	34,23	36,43	33,86
10	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
100	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1000	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Média de quatro repetições

TABELA 24 - Porcentagem de redução do crescimento de diferentes isolados de *T. harzianum*, em meio de batata-dextrose-ágar, contendo diferentes concentrações de thiram.

Concentrações de i. ativo ppm	% de redução do crescimento ¹ isolados de <i>T. harzianum</i>						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	26,75	10,89	13,12	15,34	7,56	15,56	15,34
1	30,12	12,23	24,34	25,00	18,67	25,00	25,00
10	41,14	36,67	47,56	47,00	51,12	48,89	50,00
100	73,04	75,00	77,56	75,00	77,78	73,67	72,00
1000	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Média de quatro repetições

TABELA 25 - Porcentagem de redução do crescimento de diferentes isolados de *T. harzianum*, em meio de batata-dextrose-ágar, contendo diferentes concentrações de thiabendazole.

Concentrações de i. ativo ppm	% de redução do crescimento ¹ isolados de <i>T. harzianum</i>						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	23,94	18,34	13,26	16,63	17,76	18,12	15,89
1	65,51	77,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
10	76,97	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
100	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1000	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Média de quatro repetições

TABELA 26 - Porcentagem de redução do crescimento de diferentes isolados de *T. harzianum*, em meio de batata-dextrose-ágar, contendo diferentes concentrações de thiram + iprodione.

Concentrações de i. ativo ppm	% de redução do crescimento ¹ isolados de <i>T. harzianum</i>						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	30,90	10,89	18,54	17,53	6,45	17,23	16,01
1	57,08	57,08	63,49	58,43	59,23	56,12	57,56
10	64,61	64,61	67,42	71,35	71,67	65,89	68,68
100	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	84,78	86,12
1000	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Média de quatro repetições

TABELA 27 - Porcentagem de redução do crescimento de diferentes isolados de *T. harzianum*, em meio de batata-dextrose-ágar, contendo diferentes concentrações de captan.

Concentrações de i. ativo ppm	% de redução do crescimento ¹ isolados de <i>T. harzianum</i>						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	16,45	12,60	11,12	15,34	8,89	13,34	16,00
1	27,88	12,36	23,34	27,00	16,67	22,23	23,34
10	31,67	34,88	45,56	37,78	47,78	48,34	47,78
100	66,67	71,92	75,56	74,45	76,67	77,78	70,56
1000	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Média de quatro repetições

Dentre os fungicidas ensaiados, os menos prejudiciais foram o thiram e o captan, e intermediário a

mistura thiram + iprodione, enquanto que o thiabendazole e benomil foram os mais prejudiciais.

Para a esporulação os dois fungicidas thiram e mistura thiram + iprodione, exerceram ação negativa aos isolados TH32, TH45, VMT-1, VMT-2 (Tabelas 28 e 29). Para os isolados TH32 e VMT-1, concentrações entre 0,1 e 1 ppm de iprodione e thiram foram suficientes para inibir cerca de 50% da produção dos esporos, enquanto que para os isolados TH45 e VMT-2 esse nível de redução ocorreu entre 1 e 10 ppm do princípio ativo do produto presente no meio de cultura. Na concentração de 0,1 ppm do fungicida foi observada uma redução mínima na quantidade de esporos produzidos.

TABELA 28 - Influência do fungicida thiram, sobre a esporulação de quatro isolados de *T. harzianum* "in vitro".

Concentrações de princípio ativo	Esporos produzidos (10 ⁸) Isolados de <i>T. harzianum</i>							
	TH32		TH45		VMT-1		VMT-2	
	x	Vx+1	x	Vx+1	x	Vx+1	x	Vx+1
0,0	16,02 ¹	4,12 aC ²	13,34 ¹	3,78 aD ²	21,12 ¹	4,70 aA ²	19,99 ¹	4,58 aB ²
0,1	9,89	3,30 bC	12,99	3,74 aA	10,39	3,37 bBC	10,84	3,44 bB
1	6,34	2,71 cB	10,24	3,35 bA	6,74	2,78 cB	6,79	2,79 cB
10	2,67	1,91 dB	5,17	2,48 cA	2,74	1,93 dB	2,59	1,89 dB
100	0,77	1,33 eC	1,11	1,45 dB	2,33	1,82 eA	2,19	1,78 eA
1000	0,00	1,00 fA	0,00	1,00 eA	0,00	1,00 fA	0,00	1,00 fA

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por Vx+1

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância)

TABELA 29 - Influência do fungicida thiram + iprodione (Rovrin) sobre a esporulação de quatro isolados de *T. harzianum* "in vitro".

Concentrações de princípio ativo	Esporos produzidos Isolados de <i>T. harzianum</i>							
	TH32		TH45		VMT-1		VMT-2	
	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$
0,0	11,57 ¹	3,40 aC ²	15,04 ¹	3,87 aA ²	13,74 ¹	3,70 aB ²	14,64 ¹	3,82 aA ²
0,1	10,69	3,27 bB	13,42	3,66 bA	9,52	3,08 bC	13,04	3,61 bA
1	5,64	2,37 cB	8,39	2,89 cA	1,64	1,28 cD	8,04	2,83 cA
10	1,59	1,26 dB	5,89	2,42 dA	1,27	1,12 dB	5,72	2,39 dA
100	0,21	0,46 eC	0,17	0,41 eC	0,47	0,68 eB	0,64	0,80 eA
1000	0,00	0,00 fA	0,00	0,00 fA	0,00	0,00 fA	0,00	0,00 fA

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por $\sqrt{x+0,5}$

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância)

Com thiram, uma inibição de cerca de 50% na produção de esporos foi verificada para os isolados TH32, VMT-1 e VMT-2, nas concentrações entre 0,1 e 1 ppm. O isolado TH45 foi mais tolerante e a redução de 50% na esporulação foi verificada entre 1 e 10 ppm. A 0,1 ppm a maior inibição na esporulação foi verificada no isolado TH32 (Tabela 29). De modo geral, o efeito dos fungicidas sobre a esporulação e o crescimento foi idêntico em todos os tratamentos. Um fator importante que pode influenciar o comportamento da tolerância a nível de isolado dentro da mesma espécie, é a combinação de mais de um produto

químico. No presente trabalho foi verificado que a mistura thiram + iprodione afetou o desenvolvimento dos diferentes isolados de *T. harzianum*, quando comparado com o tratamento só com thiram. Atualmente, existem trabalhos que defendem uma possível utilização de fungicidas e esporos do fungo *Trichoderma* no tratamento de sementes; entretanto, os resultados obtidos até o momento são contraditórios e não conclusivos, como os obtidos nesse experimento. Portanto, estudos de compatibilidade, tolerância à mistura de diferentes espécies de *Trichoderma* "in vitro" e em solo são necessários.

4.14. Influência de herbicidas sobre o crescimento e esporulação de diferentes isolados de *T. harzianum* "in vitro"

Os herbicidas trifluralin, 2,4-D, metribuzin, alachlor, setoxydin presentes em diferentes concentrações em meio de cultura exerceram efeito negativo mais acentuado sobre a esporulação do que sobre o crescimento (Tabelas 30 a 34).

Em relação ao crescimento, os sete isolados estudados, apresentaram comportamento variável, sendo que alguns não foram inibidos em concentrações de até 100 ppm. Concentrações de até 1 ppm de metribuzin não foram suficientes para inibir o crescimento do isolado

TH35 e, a 10 ppm a redução foi de apenas 5%, em comparação à testemunha sem tratamento. Com alachlor, exceção ao isolado TH10 que sofreu redução de 5% no seu crescimento a 10 ppm, os demais isolados não foram afetados nas concentrações de 0,1 a 10 ppm. Os isolados TH32, VMT-1, VMT-2, apesar de sofrerem redução, apresentaram crescimento em presença de até 1000 ppm do princípio ativo do herbicida contido no meio. O herbicida trifluralin nas concentrações de 0,1 a 10 ppm não exerceram qualquer efeito inibitório a nenhum dos isolados testados. A 100 ppm o isolado TH45 foi pouco afetado, sofrendo uma redução de apenas 14%. Em meio com 2,4-D, exceto o isolado TH10, todos os demais desenvolveram em concentrações de até 1000 ppm do princípio ativo. Nas concentrações de até 100 ppm o isolado TH20 não sofreu qualquer redução no crescimento e a 1000 ppm apresentou redução de cerca de 56%. De modo geral, em todas as concentrações o comportamento dos isolados ensaiados foi semelhante. Na concentração de 0,1 ppm os isolados TH45 e TH32, foram os menos afetados, apresentando um percentual de redução inferior a 2,5%.

TABELA 30 - Influência do herbicida alachlor, em diferentes concentrações sobre o crescimento (cm) de *T. harzianum*, "in vitro".

Concentrações de princípio ativo ppm	% de redução do crescimento ¹ isolados						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	5,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
100	68,15	57,22	64,77	55,56	57,22	58,88	62,77
1000	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Calculada com base no crescimento micelial da testemunha sem tratamento; média de quatro repetições.

TABELA 31 - Influência do herbicida metribuzin, em diferentes concentrações sobre o crescimento (cm) de *T. harzianum*, "in vitro".

Concentrações de princípio ativo ppm	% de redução do crescimento ¹ isolados						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	10,85	7,00	8,17	0,00	0,89	7,78	0,00
1	7,00	7,78	8,85	0,00	5,56	16,67	8,67
10	22,90	8,33	7,49	5,00	6,45	23,34	14,78
100	35,55	20,00	20,82	22,23	27,56	23,12	22,56
1000	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Calculada com base no crescimento micelial da testemunha sem tratamento; média de quatro repetições.

TABELA 32 - Influência do herbicida trifluralin em diferentes concentrações sobre o crescimento (cm) de *T. harzianum*, "in vitro".

Concentrações de princípio ativo ppa	% de redução do crescimento ¹ isolados						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	26,82	0,00	0,00	11,17	3,11	3,11	11,00
1	28,23	0,00	20,55	13,53	5,55	14,44	17,41
10	32,70	0,00	35,55	20,35	8,11	23,88	21,90
100	45,88	8,33	49,77	33,88	13,88	37,00	36,52
1000	73,52	43,33	73,33	56,23	54,44	58,11	61,11

¹ Calculada com base no crescimento micelial da testemunha sem tratamento; média de quatro repetições.

TABELA 33 - Influência do herbicida 2,4-D em diferentes concentrações sobre o crescimento (cm) de *T. harzianum*, "in vitro".

Concentrações de princípio ativo ppa	% de redução do crescimento ¹ isolados						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	15,08	0,00	6,77	12,13	0,88	10,44	7,07
1	22,85	0,00	15,25	20,00	10,88	17,97	19,66
10	24,85	0,00	13,33	20,22	9,77	20,56	21,91
100	23,78	0,00	14,12	21,34	12,77	22,24	24,15
1000	100,00	55,55	62,71	68,53	68,11	69,66	65,50

¹ Calculada com base no crescimento micelial da testemunha sem tratamento; média de quatro repetições.

TABELA 34 - Influência do herbicida sethoxydin em diferentes concentrações sobre o crescimento (cm) de *T. harzianum*, "in vitro".

Concentrações de princípio ativo ppm	% de redução do crescimento ¹ isolados						
	TH10	TH20	TH32	TH35	TH45	VMT-1	VMT-2
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	16,66	4,49	2,22	10,00	1,11	8,89	5,55
1	18,67	7,86	16,66	1,11	8,88	20,78	12,22
10	27,77	20,22	30,00	16,11	10,55	29,21	24,44
100	43,88	23,59	38,88	24,44	29,77	34,83	32,77
1000	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Calculada com base no crescimento micelial da testemunha sem tratamento; média de quatro repetições.

A esporulação dos isolados TH32, TH35, TH45, VMT-1 e VMT-2, foi afetada negativamente. Este efeito foi quantificado através da análise estatística dos dados de contagem dos esporos na diluição 10⁸ (Tabelas 35 a 39). Os cinco isolados apresentaram comportamento variável, com a concentração do princípio ativo do herbicida adicionado ao meio, existindo uma razão positiva, pois na medida em que se aumentou a concentração do herbicida, ocorreu uma diminuição no total de esporos produzidos. Com trifluralin e alachlor o isolado TH45 diferenciou-se dos demais, sendo inclusive superior às demais a partir de 1 ppm. Com metribuzin, o isolado TH32 mostrou melhor performance que os demais em todas as concentrações. Para sethoxydin os isolados menos

afetados na produção de esporos foram o VMT-1 e VMT-2. Para 2,4-D na concentração de 0,1 ppm, o isolado que mais se destacou foi o VMT-1, enquanto que nas concentrações de 1 e 10 ppm destacou-se o TH32. Na concentração de 100 ppm o isolado VMT-1, foi superior aos demais.

TABELA 35 - Influência do herbicida metribuzin, sobre a esporulação de quatro isolados de *T. harzianum*, "in vitro".

Concentrações de princípio ativo	Esporulação (10 ⁶) Isolados de <i>T. harzianum</i>							
	TH32		TH45		VMT-1		VMT-2	
	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$
0,0	17,77 ¹	4,27 aAB	18,23 ¹	4,32 aA ²	17,94 ¹	4,34 aA ²	17,84 ¹	4,28 aB ²
0,1	3,17	1,19 bAB	3,01	1,87 bA	3,24	1,95 bA	4,19	2,16 bA
1	2,47	1,72 cA	2,22	1,65 cB	2,52	1,74 cA	2,69	1,78 cB
10	2,09	1,61 dA	1,99	1,58 dA	2,02	1,61 dA	1,64	1,46 dC
100	2,04	1,59 dA	1,87	1,54 dAB	1,87	1,51 eB	0,52	1,01 eBC
1000	0,00	0,70 eA	0,00	0,70 eA	0,00	0,70 fA	0,00	0,70 fB

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por $\sqrt{x+0,5}$

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância)

TABELA 36 - Influência do herbicida 2,4-D sobre a esporulação de quatro isolados de *T. harzianum* "in vitro".

Concentrações de princípio ativo	Esporulação (10 ⁶) Isolados de <i>T. harzianum</i>			
	TH32	TH35	VMT-1	VMT-2
0,0	17,77 aC	11,65 aD	18,62 aA	18,20 aB
0,1	6,90 bC	7,00 bB	9,05 bA	8,55 bB
1	6,37 cA	6,20 cB	6,05 cBC	5,95 cC
10	6,25 cA	6,15 cB	5,17 dC	5,47 dBC
100	4,35 dB	5,40 dA	3,82 eC	3,22 eCD
1000	2,45 eBC	2,62 eB	2,95 fA	2,72 fAB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância); média de quatro repetições.

TABELA 37 - Influência do herbicida trifluralin, sobre a esporulação de quatro isolados de *T. harzianum* "in vitro".

Concentrações de princípio ativo	Esporulação (10 ⁶) Isolados de <i>T. harzianum</i>							
	TH32		TH45		VMT-1		VMT-2	
	x	log(x+1)	x	log(x+1)	x	log(x+1)	x	log(x+1)
0,0	18,49 ¹	2,97 aAB ²	18,46 ¹	2,96 aAB ²	18,39 ¹	2,96 aB ²	18,62 ¹	2,97 aAB ²
0,1	8,49	2,25 bB	18,76	2,98 aA	7,69	2,16 bC	7,87	2,18 bC
1	3,44	1,49 cC	4,64	1,73 bA	3,88	1,58 cB	3,49	1,50 cC
10	3,44	1,49 cB	4,14	1,63 cA	2,99	1,38 dC	3,07	1,40 dC
100	2,77	1,32 dB	4,09	1,62 cA	2,34	1,20 eC	2,52	1,25 eC
1000	2,69	1,30 dA	2,74	1,32 dA	1,94	1,08 fB	2,02	1,10 fB

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por log(x+1)

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância)

TABELA 38 - Influência do herbicida sethoxydin, sobre a esporulação de quatro isolados de *T. harzianum* "in vitro".

Concentrações de princípio ativo	Esporulação (10 ⁶) Isolados de <i>T. harzianum</i>							
	TH32		TH45		VMT-1		VMT-2	
	x	log(x+1)	x	log(x+1)	x	log(x+1)	x	log(x+1)
0,0	17,77 ¹	2,93 aA ²	18,22 ¹	2,95 aA ²	18,24 ¹	2,95 aA ²	18,99 ¹	2,99 aA ²
0,1	4,69	1,74 bBC	4,39	1,68 bCD	4,97	1,78 bAB	5,19	1,62 bA
1	2,54	1,26 cB	2,79	1,33 cA	2,79	1,33 cA	2,69	1,30 cAB
10	1,89	1,06 dB	1,39	0,87 dC	2,59	1,27 cA	2,04	1,11 dB
100	1,17	0,77 eC	0,62	0,48 eD	1,72	1,00 dB	1,94	1,08 dA
1000	0,00	0,00 fA	0,00	0,00 fA	0,00	0,00 eA	0,00	0,00 eA

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por log(x+1)

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância)

TABELA 39 - Influência do herbicida alachlor, sobre a esporulação de quatro isolados de *T. harzianum* "in vitro".

Concentrações de princípio ativo ppm	Esporulação (10 ⁶) Isolados de <i>T. harzianum</i>							
	TH32		TH45		VMT-1		VMT-2	
	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$	x	$\sqrt{x+0,5}$
0,0	17,77 ¹	4,27 aB ²	18,57 ¹	4,36 aA ²	18,02 ¹	4,30 aA ²	17,84 ¹	4,28 aB ²
0,1	4,27	2,18 bA	3,74	2,06 bB	3,89	2,09 bB	4,19	2,16 bA
1	2,71	1,79 cB	3,42	1,98 cA	2,52	1,73 cB	2,69	1,78 cB
10	1,79	1,51 dBC	2,94	1,85 dA	1,66	1,47 dC	1,64	1,46 dC
100	0,47	0,98 eBC	0,68	1,08 eA	0,57	1,03 eAB	0,52	1,01 eBC
1000	0,00	0,70 fB	0,24	0,86 fA	0,07	0,75 fB	0,00	0,70 fB

¹ Média de quatro repetições

² Dados originais transformados por $\sqrt{x+0,5}$

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si (teste de Duncan, a 5% de significância)

Comparando-se o efeito dos herbicidas ensaiados, sobre o crescimento e esporulação dos isolados de *T. harzianum* empregados, verificou-se que a esporulação foi a mais prejudicada. A partir de 0,1 ppm todos os herbicidas foram capazes de reduzir a esporulação em cerca de até 90%. Essa mesma situação não se verificou para crescimento, uma vez que concentrações de 0,1 e 1 ppm a inibição foi mínima e, determinados isolados se desenvolveram até em concentrações de 1000 ppm de 2,4-D, trifluralin e alachlor.

Os resultados evidenciaram o efeito dos herbicidas sobre o crescimento e esporulação dos

diferentes isolados de *T. harzianum*, nativos de áreas de cultivo de soja. O efeito prejudicial foi bastante acentuado sobre a esporulação, com os cinco herbicidas e a partir da diluição 0,1 ppm, enquanto que para o crescimento esse efeito foi menos evidenciado.

A literatura pertinente ao assunto é escassa e não conclusiva, o trifluralin é citado como não tendo ação sobre o crescimento de *T. viride* (SEZGIN, 1978), enquanto que o 2,4-D em solução de Fries, reduziu cerca de 72% do crescimento (MILLIKAN, 1964). Apesar dos experimentos terem sido conduzidos com *T. harzianum* os resultados obtidos não se assemelham aos dados de literatura uma vez que foram observadas pequenas reduções no crescimento e esporulação do fungo nas diferentes concentrações de trifluralin e, o 2,4-D permitiu o crescimento do fungo em concentrações de até 1000 ppm do produto.

Para metribuzin, sethoxydin e alachlor praticamente não existem referências bibliográficas sobre o seu modo de ação sobre fungos do gênero *Trichoderma* porém os resultados permitiram verificar que estes herbicidas têm ação negativa, mas não acentuada, principalmente nas concentrações de 0,1 e 1 ppm, as quais se assemelham mais às condições reais de campo.

Como o estudo foi "in vitro", provavelmente o efeito dos herbicidas em condições de

campo seja diferente, uma vez que fatores como: tipo, pH do solo, vegetação predominante, sistema de cultivo e microflora nativa, exercem ação sobre o produto aplicado (ALTMAN & CAMPBELL, 1977). Outro fator importante a ser considerado é a população de *Trichoderma* spp predominante no solo. Os resultados obtidos nos experimentos evidenciaram diferenças quanto a tolerância dos herbicidas pelos diferentes isolados de *T. harzianum* testados. Porém, esses resultados obtidos podem não representar muito em termos de ação do herbicida sobre o antagonismo de *T. harzianum* a patógenos uma vez que foram avaliados apenas o efeito sobre o crescimento e esporulação. Sob condições de campo essas doses estudadas podem ser pouco representativas. O ideal seria a determinação da quantidade real de herbicida em contato físico com o microrganismo, a qual pode ser avaliada pela aplicação atual mais o resíduo das anteriores. Outro ponto importante é a determinação da ação do herbicida sobre a ação do *Trichoderma* dentro de um sistema como preparo do solo e cultura utilizada.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições em que se desenvolveu o presente estudo permitiram concluir que:

1. o meio de cultura (MMT) usado no presente trabalho foi superior aos meios recomendados na literatura corrente permitindo a recuperação de porcentagem maior de *Trichoderma* do solo;

2. o hipoclorito de sódio não eliminou o *Trichoderma* associado com as partes vegetais utilizadas para isolamento do fungo indicando a possibilidade de uma associação sistêmica com os tecidos da planta;

3. é possível isolar o fungo *Trichoderma* sp. de sementes de soja, restos vegetais e solo da rizosfera de diferentes plantas e regiões agrícolas do Brasil; alguns isolados de *T. harzianum* são capazes de inibir fungos como a *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* em meio de cultura; a R.

solani foi inibida em sementes de soja inoculadas artificialmente;

4. os meios de cultura e as diluições de solo utilizadas, influenciaram no número de colônias de *Trichoderma harzianum* isoladas a partir de solo inoculado artificialmente;

5. a radiação gama provoca mutação em *Trichoderma harzianum* permitindo a obtenção de variantes, enquanto que a luz ultra violeta (253 nm) não foi apropriada para induzir mutantes morfológicos no isolado empregado;

6. todos os cinco fungicidas estudados inibiram o crescimento dos isolados de *T. harzianum* utilizados principalmente em concentrações acima de 0,1 ppm, enquanto que thiram e thiram + iprodione inibiram a esporulação;

7. os cinco herbicidas afetaram o crescimento e esporulação dos isolados de *T. harzianum*;

8. os substratos em que foram produzidos os esporos, exerceram influência sobre: a. a ação do *T. harzianum*, quando este foi empregado no tratamento de

sementes de soja, aumentando a emergência da plântulas;
b. a sobrevivência de *T. harzianum* durante o ciclo da cultura da soja e c. a sanidade de raízes das plantas; farelo de arroz foi o substrato mais favorável;

9. o tratamento das sementes com esporos de *T. harzianum* na semeadura foi superior aos demais métodos de aplicação;

10. o tratamento de sementes de soja com esporos de *T. harzianum* prejudicou a nodulação de plantas de soja por *Rhizobium japonicum*;

11. os isolados de *T. harzianum* brasileiros possuem potencial para emprego na proteção das sementes e posteriormente da plantas contra microrganismos presentes em sementes e no solo principalmente quando for feito o tratamento das sementes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL MOITY, T.H. & SHATLA, M.N. Biological control of white rot disease *Sclerotium cepivorum* of onion by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology Zeitschrift*, Berlin, 100: 29-35, 1981.

ABD-EL MOITY, T.H.; PAPAIVIZAS, G.C. & SHATLA, M.N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. *Phytopathology*, St. Paul, 72: 396-400, 1982.

ALEXANDER, M. *Microbial Ecology*. New York, John Wiley & Sons, p. 207-223, 1971.

ALLEN, M.C. & HAENSELER, C.M. Antagonistic action of *Trichoderma* on *Rhizoctonia* and other soil fungi. *Phytopathology*, St. Paul, 25: 244-252, 1935.

ALLEN, R.N.; PEGG, K.G., FORSBERG, L.I. & FIRTH, D.J. Fungicidal control in pineapple and avocado of diseases caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Austral. Jour. Exp. Agric. Anim. Husb.* Melbourne, 20: 119-124, 1980.

- ALMEIDA, R.T. & LANDIM, C.M.U. Preliminary studies on the biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. causal agent of sclerotial wilt of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Fitossanidade*, Fortaleza, 5: 15-20, 1981.
- ALTMAN, J. & CAMPBELL, C.L. Effect of herbicides on plant diseases. In: BAKER, K.F. et alii eds. *Ann. Review of Phytopathology*, Palo Alto, Academic Press, 15: 361-395, 1977.
- ALTMAN, J. & ROSS, M. Plant pathogens as a possible factor in unexpected preplant herbicide damage in sugarbeets. *Plant Disease*, Beltsville, 31: 85-88, 1967.
- ANDERSON, E.J. Indirect effects of agricultural chemicals in soil. Long-term effects of soil fungicides. *Annu. Conf. Control Soil Fungi* 10, San Francisco, 1962. *Proceedings*. San Francisco, 1964, p. 17.
- ANGLE, J.S.; PUGASHETTI, B.K. & WAGNER, G.H. Fungal effects on *Rhizobium japonicum* - Soybean symbiosis. *Agronomy Journal*, Madison, 73: 301-306, 1981.

ARTIGUES, M. & DAVET, P. Research on criteria for selection of clones of *Trichoderma* active against sclerotial fungi. In: La selection des plants pour la resistance anse maladies. Paris. Institut Nacional de la Recherche Agronomique. Ecole National Superieure d'Agronomie, Montpellier, France, p. 181-192, 1982.

AUDUS, L.J. Herbicides behaviour in soil. II. Interactions with soil microorganismos. In: AUDUS, L.J., ed. **The Physiology and Biochemistry of Herbicides**, New York, Academic Press, 1964. Cap. 3, p. 163-206.

AYERS, W.A. & P.B. ADAMS. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* species by *Sporidesmium sclerotivorum*. **Can. Jour. Microbiol.** Ottawa, 25: 17-20, 1970.

AYERS, W.A. & ADAMS, P.B. Mycoparasitism and its application to biological control of plant diseases. In: PAPAIVIZAS, G.L., ed. **Biological Control in Crop Production**, New Jersey, Allanheld, Osmum & Co., 1981, p. 91-703.

BACKMAN, P.A. & RODRIGUEZ-KABANA, R. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. *Phytopathology*, St. Paul, 65: 819-821, 1975.

BAKER, K.F. & COOK, R.J. Biological Control of Plant Pathogens, San Francisco, W.H. Freeman and Company, 1974, 433 p.

BAKER, K.F.; FLENTJE, N.T.; OLSEN, C.M. & STRETTON, H.M. Effect of antagonists on growth and survival of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, 57: 591-597, 1967.

BARACHO, I.R. & ROSIN, R.T. Tabela por La Kalkulado de MD95, en fungo. *Sciencia Revuo de Internancia Sciencia Asocio Esperantista*, Beogradia, Iugoslavia, 28: 223-226, 1977.

BERNETT, H.L. & BINDER, F.L. The fungal host-parasite relationship. *Ann. Rev. Phytopathol.* Palo Alto, 11: 273-292, 1973.

BELL, D.K.; WELLS, H.D. & MARKHABELL, D.K.; WELLS, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, 72: 379-382, 1982.

BLISS, D.E. The destruction of *Armillaria mellea* in citrus soils. *Phytopatology*, St. Paul, 41: 665-683, 1951.

BOLLEN, W.B. Interaction between pesticides and soil microorganisms. In: BOLLEN et alii ed. *Ann. Riview Microbiol.* Palo Alto, Academic Press, 15: 69-92, 1961.

BOOSALIS, M.G. & MANKAU, R. Parasitism and predation of soil microorganisms. In: BAKER, K.F. ed. *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens*, Berkeley, Univers. California Press, p. 374-389. 1970.

BOZARTH, G.A.; FUNDERBURK Jr. & CURL, E.A. Interaction of fluometuron and soil microorganisms. *Weed Sci.* Champaign, 8: 236, 1969.

BRIAN, P.W. & HEMMING, H.G. Gliotoxin a fungistatic metabolic product of *trichoderma viride*. *Phytopatology*, St. Paul, 35: 218-221, 1945.

BROWN, M.E. Seed and root bacterization. *Ann. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, 12: 181-197, 1974.

CARTER, M.V. & PRICE, T.V. Biological control of *Eutypa armeniaca*. II, Studies of the interaction between *E. armeniaca* and *Fusarium lateritium* and their relative sensitivities to benzimidazole chemicals. **Austral. Journ. Agric. Res.**, Melbourne, 25: 105-109, 1974.

CHANDLER, J.M. & SANTELMAN, P.W. Interactions of four herbicides with *Rhizoctonia solani* in cotton seedling. **Weed Sci.**, Champaign, 16: 453-453, 1968.

CHANG, I.P. & KOMMEDAHL, T. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. **Phytopathology**, St. Paul, 58: 1395-1401, 1968.

CHANG, Y.C.; BAKER, R.; KLEIFELD, R. & CHET, I. Increased growth of plants in presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, Beltsville, 70: 145-148, 1986.

CHET, I. & BAKER, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, 70: 994-998, 1980.

COLE, M.A. Effect of long-term atrazine application on soil microbial activity. *Weed Science*, Champaign, 24: 473-476, 1976.

COOK, R.J. & BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983, 539 p.

CROSSBARD, E. Techniques for the assay of effects of herbicides on the soil microflora. In: LOVELOCK, B., ed. *Some Methods for Microbiological Assay*, New York, Academic Press, 1975, p. 224-235.

CURL, E.A. & FUNDERBURK, J.R.H.H. Some effects of atrazine on *S. rolfsii* and inhibitory soil microorganisms. *Phytopatology*, St. Paul, 55: 497, 1965.

CURL, E.A.; RODRIGUEZ-KABANA; FUNDERBURK Jr., H.H. Influence of atrazine and varied carbon and nitrogen amendments on growth of *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma viride* in soil. *Phytopatology*, St. Paul, 58: 323, 1968.

DANIELSON, R.M. & DAVEY, C.B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soils Biol. Biochem.*, Elmsford, 5: 485-494, 1973.

DANIELSON, R.M. & DAVEY, C.B. Non-nutritional factors affecting growth of *Trichoderma* in culture soil. *Soil Biol. Biochem.*, Elmsford, 5: 495-504, 1973.

DAVET, P. Effects de quelques pesticides sur la colonisation d'un substrat par le *Trichoderma harzianum*, Rifai, en presence des autres champignons du sol. *Soil Biol. Biochem.*, Elmsford, 13: 513-517, 1981.

DAVET, P.; ARTIGUES, M. & MARTIN, C. Production in conditions non asseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai, pour des essais de lutte biologique. *Agronomie*, Paris, 1: 933-936, 1981.

DAVIS, D.E.; PILLAI, C.G.P. & TRUELOVE, B. Effects of brometryn and MSMA on *Chlorella* and two fungi. *Weed Science*, Champaign, 24: 587-593, 1976.

- DAVEY, C.B. & PAPAVIDAS, G.C. Effect of dry mature plant material and nitrogen on *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopatology*, St. Paul, 50: 522-526, 1960.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 57: 363-369, 1971.
- DROZDOWICZ, A. Os herbicidas e os microrganismos. *Rev. Microbiol.* 2: 43-61, 1971.
- DURRELL, L.W. Hyphal invasion by *Trichoderma viride*. *Mycopatol. et Mycol. Appl.*, Chicago, 35: 138-144, 1968.
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L. & BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopatology*, St. Paul, 61: 42:44, 1971.
- ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I. & HENIS, Y. Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma* spp. and plant pathogenic fungi. *Phytopatology Zeitschrift*, Berlin, 107: 168-175, 1983.

ELAD, Y.; CHET, I. & HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* in straw-berry fields by *Trichoderma harzianum*. *Plant Soil*, The Hague, 60: 245-254, 1981.

ELAD, Y.; CHET, I. & HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 28: 719-725, 1985.

ELAD, Y.; CHET, I. & KATAN, J. *Trichoderma harzianum*. A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 119-121, 1980.

ELAD, Y.; CHET, I.; BOYLE, P. & HENIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 85-88, 1983.

ELAD, Y.; HADAR, Y.; HADAR, E.; CHET, I. & HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* in carnation. *Plant Disease*, Beltsville, 65: 675-677, 1981.

ELAD, Y.; HADAR, Y.; CHET, I. & HENIS, Y. Prevention with *Trichoderma harzianum* Rifai aggr., of reinfestation by *Sclerotium rolfsii* Sacc. and *Rhizoctonia solani* Kuhn of soil fumigated with methyl bromide, and improvement of disease control in tomatoes and peanuts. *Crop Protection*, Guildford, 1: 199-211, 1982.

ELAD, Y.; KALFON, A. & CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton by seed-coating with *Trichoderma* spp. spores. *Plant and Soil*, The Hague, 66: 279-281, 1982.

ELAD, Y.; KATAN, J. & CHET, I. Physical, biological, and chemical control integrated for soil borne diseases of potatoes. *Phytopathology*, St. Paul, 70:418-422, 1980.

END, C.F. The effect of simazine and atrazine on certain fungi of the soil microflora and their metabolic process. *Soil Science*, Baltimore, 22: 49-50, 1962.

ESHEL, Y. & KATAN, J. Effect of time of application of diphnenamid on pepper, weeds and disease. *Weed Sci.*, Champaign, 20: 468-471, 1972.

FERRERA-CERRATO, R. Hiperparasitism of *Trichoderma viride* (Hyphomycetes) on phytopathogenic and saprophytic fungi. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, México, 18: 77-81, 1976.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*. São Paulo, 33: 9-13, 1967.

FILHO, E.S. & DHINGRA, O.D. Effect of herbicides on survival of *Macrophomina phaseolina* in soil. *Trans. Br. Mycol. Soc. London*, 74: 61:64, 1980.

FLETCHER, W.M. The effect of herbicides on soil microorganisms. *In*: WOODFORD, E.K. ed. *Herbicides and the soil*. Oxford, Blackwell, p. 20-63, 1960.

GARIBALDI, A. The use of suppressive soils as substrate for ornamental and flowering plants. *Acta horticulture*, The Hague, 150: 103-111, 1983.

GARRET, S.D. *Soil fungi and soil fertility*. Pergamon Press e MacMillan Co. 165 pp. 1963.

- GHAFFAR, A. Interactions of soil fungi with *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby the cause of root rot in cotton. *Mycopath. Mycol. Appl.*, Chicago, 32:(2): 196-201, 1968.
- GINDRAT, D.; Van der HOEVEN, E. & MOODY, A.R. Control of *Phomopsis sclerotioides* with *Gliocladium roseum* or *Trichoderma*. *Neth. Jour. Plant Pathol*, Wageningen, 83: 429-438, 1977.
- GRAY, D. Fluid drilling of vegetable seeds. *Hortic. Rev.* 3: 1-27, 1981.
- GROSSBARD, E. Effects on the soil microflora. *Ann. Review of Microbiology*, Palo Alto, Academic Press, 36: 99-147, 1976.
- HADAR, Y.; CHET, I. & HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat-bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopatology*, St. Paul, 69: 64-68, 1979.

HADAR, Y.; HARMAN, G.E. & TAYLOR, A.G. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. *Phytopathology*, St. Paul, 74: 106-110, 1984.

HARMAN, G.E.; CHEI, I. & BAKER, R. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 1167-1172, 1980.

HARMAN, G.E.; CHEI, I. & BAKER, R. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. *Phytopathology*, St. Paul, 71: 569-572, 1981.

HENIS, Y. Biological control - Ecological Principles of Biological Control of Soilborne Plant Pathogens: *Trichoderma* model. In: KLUG, M.J. & REDDY, C.A., ed *Microbial Ecology*, New York, Academic Press, p. 322-430, 1984.

HENIS, Y. Ecological principles of biocontrol of soilborne plant pathogens: *Trichoderma* model, *Microbial Ecology*, New York, 10: 353-361, 1984.

- HENIS, Y. & BEN-YEPHET, Y. Effect of propagule size of *Rhizoctonia solani* on saprophytic growth, infectivity, and virulence seedlings. *Phytopatology*, 60: 1351-1356, 1970.
- HENIS, Y.; ADAMS, P.B.; LEWIS, J.A. & PAPAIVIZAS, G.C. Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. *Phytopatology*, St. Paul, 73: 1043-1046, 1983.
- HENIS, Y.; GHAFFAR, A. & BAKER, R. Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: effect of successive plantings, PCNB and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. *Phytopatology*, St. Paul, 68: 900-907, 1978.
- HOLLAND, A.A. & PARKER, C.A. Studies on microbial antagonism in the establishment of clover pasture. II. The effect of saprophytic soil fungi upon *Rhizobium trifolii* and the growth of subterranean clover. *Plant Soil*, The Hague, 25: 329-340, 1966.
- HUBBARD, J.P.; HADAR, Y. & HARMAN, G.E. Supprevisson of biological control agent *Trichoderma hamatum* on seeds by soil-borne *Pseudomonas* spp. *Phytopatology*, St. Paul, 72: 1009, 1982.

- HUBBARD, J.F.; HARMAN, G.E. & HADAR, Y. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. *Phytopatology*, St. Paul, 73: 655-659, 1983.
- HUBER, D.M.; SEELY, C.I. & WATSON, R.D. Effect of the herbicide diuron on foot rot of winter wheat. *Plant Dis. Repr.*, Beltsville, 50: 852-854, 1966.
- JOHNSON, L.F. & CURL, E.A. Methods for Research on the Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens, Minneapolis. Burgess Publishing Co., 250 p., 1972.
- JOHNSON, L.F.; CURL, E.A.; BORD, J.H. & FRIBOURG, H.A. Methods for studying Soil Microflora - Plant Disease Relationships. Minneapolis, Burgess Publishing Co., 1959, 172 p.
- KAISER, W.J. Biological control of seed rot and pre-emergence damping-off of chickpea with *Penicillium oxalicum*. *Plant Disease*, Beltsville, 68: 806-811, 1984.
- KATAN, J. & ESHEL, Y. Interactions between herbicides and plant pathogens. *Residue Rev.*, New York, 45: 145-177, 1973.

KELLEY, W.D. Evaluation of *Trichoderma harzianum* impregnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinamomi* causing damping-off of pine seedlings. *Phytopathology*, St. Paul, 66: 1023-1027, 1976.

KELMAN, A. & COOK, R.J. Plant pathology in the People's Republic of China. *Annu. Rev. Phytopathology*, Palo Alto, 15: 409-429, 1977.

KLASSEN, W. The role of biological control in integrated pest management systems. In: PAPAIVIZAS, G.C., *Crop Protection*, New York, Allanheld Osmun Publishers p. 433-445.

KOMMEDAHL, T. & WINDELS, C.E. Evaluation of biological seed treatment with antagonists. *Phytopathology*, St. Paul, 65: 296-300, 1975.

KOMMEDAHL, T.; WINDELS, C.E.; SARBINI, G. & WILEY, H.B. Variability in performance of biological and fungicidal seed treatment in corn, peas, and soybeans. *Prot. Ecol.*, Amsterdam, 3: 55-61, 1981.

KRAFT, J.M. & PAPAIVIZAS, G.C. Use of host resistance, *Trichoderma*, and fungicides to control soilborne diseases and increase seed yields of peas. *Plant Disease*, Beltsville, 1234-1237, 1983.

KREZEL, Z. & LESZCZYNSKA, D. The effect of herbicides on the antibiotic activity of *Streptomyces griseus*. *Meded. Fac. Landbouwwet, Ghent*, 35: 655-61, 1970.

KUTER, G.A.; NELSON, E.B.; HOITING, H.A.J. & MADEN, L.V. Fungal populations in container media amended with composted hardwood bark suppressive and conducive to *Rhizoctonia* damping-off. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 1450-1456, 1983.

LEWIS, J.A. & PAPAIVIZAS, G.C. Effect of fumigant metham on *Trichoderma* spp. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 30: 1210-1213, 1984.

LIU, S.D. & BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 404-412, 1980.

LIU, S.D. & BAKER, R. Mechanism of Biological Control in Soil Suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 1234-1237, 1983.

- LIU, SHU-YEN & VAUGHAN, E.P., Control of *Pythium* infection in table beet seedlings by antagonistic microorganisms. *Phytopathology*, St. Paul, 55: 986-989, 1965.
- MANDELS, M.; WEBER, J. & PARIZEK, R. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. *Appl. Microbiol.*, Sofia, 21: 152-154, 1971.
- MARDIS, J.J.; MITCHELL, D.J. & SONODA, R.M. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. *Phytopathology*, St. Paul, 71: 1257-1260, 1981.
- MARSHAL, D.S. Effect of *Trichoderma harzianum* seed treatment and *Rhizoctonia solani* inoculum concentration on damping-off of snap bean in acid soils. *Plant Disease*, Beltsville, 66: 788-789, 1982.
- MARTIN, J.P. Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, Baltimore, 134: 1528-1529, 1950.
- MARTIN, J.P. & PRATT, P.F. Fumigants, fungicides and the soil. *Agric. Food Chem.*, Easton, 6(5): 345-48, 1958.

- MENTEN, J.D.M.; MACHADO, C.E.; MINUSSI, E.; CASTRO, C. & KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Microphomina phaseolina* (Tass.) Gold. in vitro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 1(2): 57-66, 1976.
- MERRIMAN, P.R.; PRICE, D.R.; KOLIMORGEN, J.F.; PIGGOTT, T. & RIDGE, E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on growth of cereals and carrots. *Aust. J. Agric. Res.*, Melbourne, 25: 219-226, 1974.
- MIALL, L.M. In: "The filamentous fungi. In: SMITH, E.J.; BUREY, D.R., eds. *Industrial Mycology*, London, Edward Arnold Press, 1975, p. 104-121.
- MIHUTA-GRIMM, L. & ROWE, R.C. *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off radish in organic soil and comparison of four delivery systems. *Phytopathology*, St. Paul, 76: 306-312, 1986.
- MILLIKAN, D.F. & FIELDS, M.L. Influence of some representative herbicidal, chemicals upon the growth of some soil fungi. *Phytopathology*, St. Paul, 54: 901-902, 1954.

MIRKOVA, E. Use *Trichoderma harzianum* Rifai for wilt (*Fusarium oxysporum* Sch. f. *dianthi* (Printt et Del. Snyd. et Hans.) control in glasshouse carnations. *Gradinarska i Lazarska Nauka*, 20(1): 65-69, 1983. Apud: *Biocontrol News and Information*, 4: 39-40, janeiro. 1984. (Resumo).

MITCHELL, J.E. The mechanisms of biological control of plant diseases. *Soil Biol. Biochem.*, Elmsford. 5: 721-728, 1973.

MIXON, A.C. & CURL, E.A. Influence of plant residues on *Sclerotium rolfsii* and inhibitory soil organisms. *Crop Science*, Madison. 7: 641-644, 1967.

MONTEGUT, J. Value of the dilution method. In: PARKINSON, D. & WAID, J.S. *The Ecology of Soil Fungi*, Liverpool, University Press, 1960, p. 126-152.

MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. *Appl. microbiol.*, Sofia, 33: 178-183, 1977.

- MOUBASHER, A.M. Selective effects of fumigation with carbon disulphide on the fungus flora. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 46: 338-344, 1965.
- MUGHOGHO, L.K. The fungus flora of fumigated soils. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 51: 441-459, 1968.
- NELSON, E.B. & HOITINK, H.A.J. The role of microorganisms in the suppression of *Rhizoctonia solani* in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 274-278, 1983.
- NEWEIGY, N.A.; EISA, N.A.; EL-SHEWY, L.A. 1982. Biological control of damping-off in broad bean varieties Giza 2 and Rebya 40. *Research Bulletin*, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, 1778 27 pp. Apude *Biocontrols News and Information*, 4, 1653, 1983.
- NORTON, D.C. Antagonism in soil between *Microphomina phaseolina* and selected soil inhabiting organisms. *Phytopathology*, St. Paul, 44: 552-524, 1954.
- ODEYEMI, O. & ALEXANDER, M. Use of fungicide-resistant rhizobia for legume inoculation. *Soil Biol. Biochem.* Elmsford, 9: 247-251, 1977.

OLSEN, C.M.; FLENTJE, N.T. & BAKER, K.F. Comparative survival of monobasidial cultures of *Thanatephorus cucumeris* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, 57: 598-601, 1967.

ORTUNO, A.; HERNANSAEZ, A. & NOGUERA, J. Influencia de la simazina sobre microorganismos solubilizadores de fosforo en suelos calizos. *Anales de Edafologia e Agrobiologia*, 37: 431-439, 1978.

PAPAVIZAS, G.C. Status of applied biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.*, Elmsford, 5: 709-720, 1973.

PAPAVIZAS, G.C. Biological control in crop production. In: *Symposium in Agricultural Research 5*. Allanheld, Osmum Co., London, 461 p, 1981.

PAPAVIZAS, G.C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and pea and bean rhizospheres. *Phytopathology*, St. Paul, 72: 121-125, 1982.

PAPAVIZAS, G.C. & DAVEY, C.B. Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of soil fungi. *Soil Sci.*, Baltimore, 88: 112-117.

PAPAVIZAS, G.C. & LEWIS, J.A. Introduction and augmentation of microbial antagonists for the control of soilborne plant pathogens. In: PAPAVIZAS, G.C. ed. **Crop Protection**, New York, Allanheld Osmun Publishers, p. 305-322, 1981.

PAPAVIZAS, G.C. & LEWIS, J.A. Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. **Phytopathology**, St. Paul, 73: 407-411, 1983.

PAPAVIZAS, G.C. & LUMSDEN, R.D. Biological control of soilborne fungal propagules. **Annu. Rev. Phytopathol.**, Palo Alto, 18: 389-413, 1980.

PAPAVIZAS, G.C.; DUNN, M.T.; LEWIS, J.A. & BEAGLE-RISTAINO, J. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. **Phytopathology**, St. Paul, 74: 1171-1175, 1984.

PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A. & Abd-EL MOITY, T.H. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, St. Paul, 72: 126-132, 1982.

- PEEPLES, J.L.; CURL, E.A. & RODRIGUEZ-KABANA, R. Effect of some EPTC on biocontrol activity of *Trichoderma viride* against *Sclerotium rolfsii*. *Plant Dis. Repr.*, Beltsville, 60: 1050-1054, 1976.
- PEGG, K.G. Soil application of elemental sulphur as a control of *Phytophthora cinamomi* root and heart rot of pineapple. *Austral. Jour. Exp. Agric. Anim. Husb.*, Melbourne, 17: 859-865, 1977.
- PLETZ, R.C.; MITCHELL, D.J. & GALLAHER, R.N. Population dynamics of soilborne fungi in a field multicropped to rye and soybeans under reduced tillage in Florida. *Phytopathology*, St. Paul, 75: 1447-1451, 1985.
- PUNJA, Z.K.; GROGAN, R.G. & UNRUH, T. Comparative control of *Sclerotium rolfsii* on golf greens in northern California with fungicides inorganic salts, and *Trichoderma* spp. *Plant Disease*. 66: 1125-1128, 1982.
- RICHARDSON, L.T. The persistence of thiram in soil and its relationship to microbial balance and damping-off control. *Can. J. Botany*, Ottawa, 32: 335-346, 1954.

- RICHARDSON, L.T. Effect of insecticides and herbicides applied to soil, on the development of plant diseases. II. Early blight and *Fusarium* wilt of tomato. *Can. J. Plant Sci.*, Ottawa, 39: 30-38, 1959.
- RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Commonw. Mycol. Inst. Mycol. Rep.*; 116; 56 pp., 1969.
- ROBINSON, R.S. The antagonistic action of the products of several soil microorganisms on the activities of the legume bacteria. *Soil Sci. Soc. Proc. Am.*, Baltimore, 10: 206-210, 1945.
- RODRIGUES-KABANA, R. Effect of atrazine on growth of *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma viride* in soil. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 13: 1343, 1967.
- ROSLYCKY, E.B. Response of soil microflora and certain crops to vorlex and linuron. *Can. J. Soil Sci.* 61: 11-17, 1981.
- SCHEUPP, H. & FREI, E. Soil fungistasis with respect to pH and profile. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 15: 1273-1279, 1969.

SHIPPERS, B. & GAMS, W. Soil-borne Plant Pathogens, New York, Academic Press, 1350 p. 1979.

SESAN, T. Contributions to the study of the biology of some antagonistic fungi. III. Effect of the reation of the medium on the growth and sporulation of *Trichoderma viride*. Pers.. ex Fr. *Biologie Vegetala*, Roma, 35(1): 35-43, 1983.

SETHI, R.P. & SUBRA-RAO, N.S. Inhibitory or stimulatory effects of soil fungi on *Rhizobia*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Tokio, 14: 325-327, 1968.

SEZGIN, E. Investigations on the effects of some herbicides on growth and virulence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma viride*. *Journal of Turkish Phytopathology*, 7:(213): 105-112, 1978. *Apud Plant Pathology*, 59:1, janeiro, 1980 (Resumo).

SHOKES, F.M.; LYDIA, S.D. & JORDAN, W.R. Effect of water potential on the growth and survival of *Microphomina phaseolina*. *Phytoplathology*, St. Paul, 67: 239-241, 1977.

SMITH, N.R. & FLETCHER, W.W. C,5-Dihalogeno-4-hidroscy
-Benzonitriles and soil microorganisms. **Hort.
Research**, Montgomery, St. Paul, 4: 60-61, 1964.

SIVAN, A.; ELAD, J. & CHEI, I. Biological control effects
of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium
aphanidermatum*. **Phytophatology**, St. Paul, 74: 498-501,
1984.

SMITH, N.R. & DOWSON, U.T. The bacteriostatic action of
rose-bengal in media used for plate counts of soil
fungi. **Soil Science**, Baltimore, 58: 467-471,
1944.

SMITH, N.R.; VIRGINIA, T. & WENZEL, E. The efect of
certain herbicides on soil microorganism. **Soil
Science**, Baltimore, 10: 197-201, 1945.

STESSEL, G.J.; LEBEN, C. & KEIT, G.W. Screening tests,
designed to discover antibiotic suitable for plant
desease control. **Mycologia**, New York, 45: 135-324,
1953.

SUBBARAO, N.S. Interaction of nitrogen-fixing microorganisms with other soil microorganisms p. 40-64. In: SUBBARAO, N.S. Current Development in Biological Nitrogen Fixation. Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi 351 p. 1984.

SUBBARAO, N.S. & BAILEY, D.L. Rhizosphere studies in relation to varietal resistance to susceptibility of tomato to verticillium wilt. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 39: 1747-1758, 1961.

SYCHEV, P.A. & SHAPOSHNIK, Y.U.A. Antagonistic effects of *Trichoderma viride* Fr. in relation to some pathogens of *Cucumis sativum* L. *Mikologiya i Fitopatologia*, Moscou, 16(2): 154-159, 1982.

TANG, A.; CURL, E.A. & RODRIGUES-KABANA, R. Effect of trifluralin on inoculum density and spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in soil. *Phytopathology*. St. Paul, 60: 1082, 1970.

THIRUMALACHAR, M.Y. & O'BRIEN, M.J., 1977. Suppression of charcoal rot in potato with bacterial antagonistic. *Plant Disease Reprtr*, Beltsville, 61(7): 543-546, 1977.

- TRINICK, M.J. & PARKER, C.A. Interactions to the microflora from nodulation problem and non-problem soils towards *Rhizobium* spp on agar culture. *Soil -Biol. Biochem.* Elmsford, 15(3): 295-301, 1983.
- TROUTMAN, J.L. & MATEYKA, J.C. Induced tolerance of *Trichoderma viride* to benomyl. *Phytopathol. News*, St. Paul, 12: 131, 1978.
- TROUTMANN, P; KEANE, P.J. & MERRIMAN, P.R. Reduction of sclerotial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Coniothyrium minutans*. *Soil. Biol. Biochem*, Elmsford, 12: 461-465, 1980.
- TSAO, P.H. Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Phytopathology*. St. Paul, 60: 157-186, 1970.
- TU, C.M. & BOLLEN, W.B. Interaction between paraquat and microbes in soil. *Weed Research*, Oxford, 8: 28, 1968.
- TURNER, G.J. & TRIBE, H.T. Preliminary field plot trials on biological control of *Sclerotinia trifoliorum* by *Coniothyrium minutans*. *Plant Pathol.* Oxford, 24: 109-113, 1975.

TWEEDY, B.G. & TURNER, N. Effect of dacthal on soil microorganisms. *Phytopathology*, St. Paul, 55: 1080, 1965.

VAN DEN BOOGERT, P.H.J.F. & JAGER, G. Biological control of *Rhizoctonia solani* on potatoes by antagonists. 3. Inoculation of seed potatoes with different fungi. *Neth. J. Pathol.*, Wageningen, 90: 117-126, 1981.

WACHA, A.G. & TIFFANY, L.H. Soil fungi isolated from fields under different tillage and weed - control regimes. *Mycologia*, New York, 71: 1215-1226, 1979.

WAKSMAN, S.A. & HORNING, E.S. Distribution of antagonistic fungi in nature and their antibiotic action. *Mycologia*, New York, 35: 47-65, 1943.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, St. Paul, 22: 837-845, 1932.

WEINDLING, R. Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*, St. Paul, 24: 1153-1179, 1934.

WELLS, H.D. & BEL, D.K. Variable antagonistic reaction in vitro of *Trichoderma harzianum* against several pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 1048-1049, 1979.

WELLS, H.D.; BELL, D.K. & JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, St. Paul, 62: 442-447, 1972.

WENSLEY, R.N. & HUANG, C.M. Control of *Fusarium* wilt of muskmelon and other effects of benomyl soil drenches. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 16: 615-620, 1970.

WIJETUNGA, C.; STACK, R.W. & BAKER, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in an unmodified loamy soil. *Phytopathology*, St. Paul, 74: 862-863, 1984.

WILKINSON, V. & LUCAS, R.L. Effects of herbicides on the growth of soil fungi. *New Phytol.*, London, 68: 709-719, 1969a.

WILKINSON, V. & LUCAS, R.L. Influence of herbicides on the competitive ability of fungi to colonize plant residues. *New Phytol.*, London, 68: 701-708, 1969b.

WINDELS, C.E. Growth of *Penicillium oxalicum* as a biological seed treatment on pea seed in soil. *Phytopathology*, St. Paul, 71: 929-933, 1981.

WINDELS, C.E. & KOMMEDAHL, T. Rhizosphere effects of pea seed treatment with *Penicillium oxalicum*. *Phytopathology*, St. Paul, 72: 541-543, 1982.

WOOD, R.H.S. & TVEIT, M. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. *Bot. Rev.*, Lancaster, 21: 441-492, 1955.

WRIGHT, J.M. Biological control of a soilborne *Pythium* infection by seed inoculation. *Plant and Soil*, The Hague, 8: 132-150.

YDRINDRI, J.T. Avaliação de níveis de perdas por *S. sclerotiorum*, *Septoria glycines* e *Cercospora kikuchi*. *Resultados de Pesquisa de Soja (1974/85)*. EMBRAPA -CNPSO, Londrina-PR: p. 165-180, 1985.