

POTENCIAL ANTAGÔNICO DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* CONTRA  
*Verticillium dahliae* Kleb. EM BERINJELA  
(*Solanum melongena* L.)

MAISA PIMENTEL MARTINS  
Engenheira Florestal

ORIENTADOR: ITAMAR SOARES DE MELO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Outubro - 1988

M382p

Martins, Maisa Pimentel

Potencial antagônico de espécies de  
Trichoderma contra *Verticillium dahliae* Kleb.  
em berinjela (*Solanum melongena* L.). Piracicaba, 1988.

156p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia

1. Berinjela - Controle biológico. 2. Fungo fitopatogênico. 3. Microrganismo para controle biológico - Seleção. I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba

CDD 635.646

POTENCIAL ANTAGÔNICO DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* CONTRA  
*Verticillium dahliae* Kleb. EM BERINJELA  
(*Solanum melongena* L.)

MAISA PIMENTEL MARTINS

APROVADA EM: 14/12/1988

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Itamar Soares de Melo	CNPDA/EMBRAPA
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Rosa Maria Valdebenito Sanhueza	CPATB/EMBRAPA

  
Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

-Orientador-

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho e, em particular:

Departamento de Genética, Departamento de Fitopatologia, Departamento de Química da ESALQ e ao Departamento de Micologia da UFR - PE.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Prof. Dr. Itamar Soares de Melo.

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo.

Prof. Dr. Hiroshi Kimati.

Engº Agrº, Dr. Martin Homechin.

Engº Agrº, M.Sc. Irajá Ferreira Antunes.

Engº Agrº, M.Sc. José Sebastião Cunha Fernandes.

Engº Agrº, M.Sc. Cosme Damião Cruz.

Engº Agrº, M.Sc. Lilian Maria Arruda Bacchi.

Biol., M.Sc. Ana Maria R. Cassiollato.

Biol., Liliana Keiko Mitsunaga.

Engº Agrº Ila Rego Cardim.

Engº Agrº Walter H. Banja.

Eng. Ftal. Luís Eduardo Aranha Camargo.

Aos funcionários: Antônio de Pádua Gorga, Fernando Leopoldino, João Alcine, Rui Celso Ribeiro, João Escarme Gonzales e Pedro da Silva.

# Í N D Í C E

Página

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. <i>Verticillium dahliae</i> : sua importância na cultura de berinjela .....	4
2.2. Mecanismos de controle biológico de doença de plantas .....	9
2.3. Fatores que afetam os agentes de biocontrole. ....	17
2.4. O potencial antagonista de <i>Trichoderma</i> spp. no controle biológico .....	25
2.5. Estabelecimento e proliferação de <i>Trichoderma</i> spp. no solo e na rizosfera .....	34
2.6. Perspectivas no biocontrole .....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
3.1. Origem da cultivar e do híbrido de berinjela usados .....	42
3.2. Isolados de <i>V. dahliae</i> Kleb.....	42
3.3. Meios de cultura e soluções utilizadas.....	43
3.4. Isolamentos de <i>V. dahliae</i> .....	45
3.5. Preparo do inóculo de <i>V. dahliae</i> .....	46

	Página
3.6. Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	47
3.7. Preparo do inóculo de <i>Trichoderma</i> spp.....	47
3.8. Preparo das mudas de berinjela .....	49
3.9. Critérios de avaliação.....	50
3.10. Experimento I: Testes de laboratório com <i>Trichoderma</i> spp. x <i>V. dahliae</i> .....	51
3.10.1. Seleção de isolados com potencial para o controle de <i>V. dahliae</i> .....	51
3.10.2. Teste de antagonismo em confronta- ção direta .....	53
3.10.3. Teste de antibiose.....	54
3.10.4. Estudo sobre interação de hifas de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>V. dahliae</i> .....	55
3.10.5. Influência de pH e temperatura no crescimento e na produção de meta- bólitos de <i>T. koningii</i> e <i>T. viride</i>	56
3.10.6. Efeito de metabólitos voláteis no crescimento de <i>V. dahliae</i> Kleb.....	57
3.10.7. Teste de competição de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultu- ra.....	58
3.10.8. Teste de auto inibição por metabô- litos de <i>Trichoderma</i> spp.....	59
3.11. Experimento II: Interação entre <i>Trichoder-</i> <i>ma</i> spp. e <i>V. dahliae</i> em condições de casa de vegetação .....	60

	Página
3.11.1. Teste de antagonismo I: Infestação do solo com <i>V. dahliae</i> anterior a <i>Trichoderma</i> spp.....	60
3.11.2. Teste de antagonismo II: Infestação do solo com <i>V. dahliae</i> posterior a <i>Trichoderma</i> spp.....	62
3.11.3. Teste de antagonismo III: Infestação simultânea do solo com <i>V. dahliae</i> e <i>Trichoderma</i> spp.....	63
3.12. Experimento III: Influência de <i>T. koningii</i> e <i>T. viride</i> na germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas de berinjela.....	65
3.13. Experimento IV: Sobrevivência de <i>T. koningii</i> e <i>T. viride</i> .....	67
3.13.1. Na rizosfera de berinjela.....	67
3.13.2. No solo .....	68
3.14. Experimento V: Bioensaio em condições de campo.....	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
4.1. Experimento I: Testes de laboratório com <i>Trichoderma</i> spp. e <i>V. dahliae</i> .....	71
4.1.1. Seleção de isolados com potencial para o controle de <i>V. dahliae</i> .....	71
4.1.2. Teste de antagonismo com confrontação direta e antibiose .....	73

4.1.3. Interação de hifas de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>V. dahliae</i> .....	81
4.1.4. Influência de pH e temperatura no crescimento e na produção de metabólitos de <i>Trichoderma</i> spp.....	85
4.1.5. Efeito de metabólitos voláteis no crescimento de <i>V. dahliae</i> .....	92
4.1.6. Teste de competição e auto inibição de isolados de <i>T. koningii</i> e <i>T. viride</i> ...	95
4.2. Experimento II .....	100
4.2.1. Teste de antagonismo I: Infestação do solo com <i>V. dahliae</i> anterior a <i>Trichoderma</i> spp.....	100
4.2.2. Teste de antagonismo II: Infestação do solo com <i>V. dahliae</i> posterior à infestação com <i>Trichoderma</i> spp.....	105
4.2.3. Teste de antagonismo III: Infestação simultânea do solo com <i>V. dahliae</i> e <i>Trichoderma</i> spp.....	110
4.3. Experimento III .....	112
4.3.1. Influência de <i>T. viride</i> e <i>T. koningii</i> na germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas.....	112
4.4. Experimento IV.....	120
4.4.1. Sobrevivência de <i>T. koningii</i> e <i>T. viride</i> no solo.....	120

	Página
4.5. Experimento V.....	122
4.5.1. Bioensaio em condições de campo.....	122
5. CONCLUSÕES .....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	130
APÊNDICE .....	148

POTENCIAL ANTAGÔNICO DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* CONTRA  
*Verticillium dahliae* Kleb. EM BERINJELA  
(*Solanum melongena* L.)

Autora: MAÍSA PIMENTEL MARTINS

Orientador: Dr. ITAMAR SOARES DE MELO

**RESUMO**

Buscando meios alternativos para o controle da murcha verticilar causada por *V. dahliae* Kleb. elaborou-se este estudo que teve como objetivos verificar o potencial antagônico de espécies de *Trichoderma* no controle de *V. dahliae* *in vitro* para posterior emprego nos testes *in vivo* e em condições de campo; estudar a sobrevivência dos agentes de biocontrole em solo natural e autoclavado; verificar o potencial dos antagonistas na germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas. Os isolados de *T. koningii* (Tw6 e CNP311A); *T. viride* (T15P e Tal-1) e *T. harzianum* (CNP17 e TC11) foram eficientes na redução do inóculo de *V. dahliae* *in vitro*. A faixa ótima de temperatura para desenvolvimento e produção de metabólitos foi de 28°C e em relação aos pHs testados verificou-se que os antagonistas não mostraram comportamento diferencial quanto ao seu crescimento. Entretanto, a produção de metabólitos foi favorecida em pH 4,5. Os isola

dos de *T. koningii* e *T. viride* inibiram o crescimento de *V. dahliae* pela produção de metabólitos voláteis, além desses isolados serem também inibidos pelos próprios metabólitos. A germinação de sementes de berinjela foi favorecida pela presença de antagonistas em solo natural, apesar de concentrações mais altas do inóculo inibirem a emergência de plântulas. *T. koningii* (Tw6) proporcionou o maior tamanho de plantas e peso seco de plantas. Os isolados T15P, Tal-1; CNP311A e Tw6 sobreviveram em solo natural durante 210 dias. A quantidade de inóculo de *V. dahliae* foi drasticamente reduzida pelo isolado CNP17 (*T. harzianum*) e neste caso, o biocontrole pode ser efetivo em condições naturais de campo.

ANTAGONISTIC POTENTIAL OF *Trichoderma* SPECIES AGAINST

*Verticillium dahliae* Kleb. IN EGGPLANT

(*Solanum melongena* L.)

Author: MAISA PIMENTEL MARTINS

Adviser: DR. ITAMAR SOARES DE MELO

**SUMMARY**

The objective of the present study was to identify the potential of species of *Trichoderma* to control *Verticillium* wilt in eggplant. The following related points were considered: the antagonistic potential of *Trichoderma* species against *V. dahliae* in vitro and in vivo; survival of these species in natural and sterilized soils, and the effect of *Trichoderma* spp. on eggplant seedling emergency and growth. Under controlled conditions, in vitro, isolates Tw6 and CNP311A of *T. koningii*; T15P and Tal-1 of *T. viride* and CNP 17 and TC11 of *T. harzianum* were efficient in reducing *V. dahliae* inoculum. For fungus development and metabolites production, 28°C was the best temperature, among those tested. pH levels tested showed no apparent effect on isolate growth, although metabolite production had been enhanced at pH 4,5. Though the production of volatile antibiotics, *T. koningii* and *T. viride* inhibited *V. dahliae* growth, although their own growth had been also inhibited. Egg-

plant seedling emergence was enhanced by *Trichoderma* in natural soil, and inhibited at increasing spore concentration. *T.koningii* isolate Tw6, increased plant height and dry weight. Isolates T15P, Tal-1, CNP311A, and Tw6 survived in natural soil for 210 days. The inoculum amount of *V. dahliae* was reduced on the presence of *T. harzianum*, isolate CNP17, implying that biocontrol can be effective under natural conditions.

## 1. INTRODUÇÃO

A murcha verticilar causada por *Verticillium dahliae* Kleb. pode destruir campos inteiros de berinjela (*Solanum melangena* L.) em áreas altamente infestadas com o patógeno.

Os primeiros sintomas se manifestam na planta através da perda de cor das folhas basais, as quais se tornam amareladas e secas. O caráter unilateral da doença é frequente, onde pode necrosar apenas uma metade da folha, ou apenas uma folha ou um só ramo da planta. Ocasionalmente, a verdadeira murcha ocorre quando muitas folhas tornam-se flácidas simultaneamente, acompanhada pela perda de turgor nas raízes. Caracteristicamente, ocorre uma descoloração vascular nos tecidos afetados pelo patógeno.

Algumas medidas de controle têm sido tomadas, como uso de fungicidas, rotação de cultura e emprego de cultivares com certos níveis de resistência. Os fungicidas são efetivos exclusivamente em regiões de infestação recente e de baixa densidade de inóculo. Entretanto, os fumigantes de solo tornam-se inviáveis devido ao seu elevado custo e aos

possíveis efeitos adversos sobre o ambiente. A rotação de cultura pode não ser um meio efetivo na redução das perdas pela doença porque o patógeno possui uma ampla gama de hospedeiros, desde as espécies domesticadas até as ervas daninhas. Ademais, as cultivares comerciais de berinjela carecem de resistência à murcha causada por *V. dahliae*.

Esse patógeno pode persistir no solo durante muitos anos na forma de microesclerócios (WILHELM, 1954). Sob condições favoráveis, microesclerócios podem germinar e produzir conídios e hifas, as quais podem infectar as raízes. Entretanto, durante essa fase, o patógeno pode ser afetado pelas interações com a microflora. Assim, os fungos antagonistas residentes em solos, possuem alguns atributos que podem ser fatais ao patógeno, reduzindo o potencial de inóculo e conseqüentemente, causando um declínio na incidência da doença.

Dentre os fungos antagonistas, algumas espécies de *Trichoderma*, tais como *T. viride* (= *T. lignorum*), *T. koningii*, *T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* situam-se como um dos mais potentes e eficientes saprófitas de solo. Produzem enzimas e antibióticos que causam a degradação da parede celular de esclerócios, hifas e conídios de seus hospedeiros. Entretanto, o maior problema em se aplicar antagonistas no solo está na sua incapacidade de tornarem-se estabelecidos no ecossistema e superarem a resistência

da microflora do solo (SIVAN *et alii*, 1984). Apesar desses problemas, as pesquisas na área de controle biológico de patógenos de solo com a introdução de antagonistas têm significativamente aumentado e muitos progressos têm sido alcançados.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial de algumas espécies de *Trichoderma* para o controle da murcha causada por *V. dahliae* em berinjela, como:

A. Selecionar isolados de *Trichoderma* sp. em condições de laboratório.

B. Testar o potencial de isolados selecionados *in vitro* para controlar *V. dahliae* em condições de campo e de casa de vegetação.

C. Verificar a influência de *Trichoderma* spp. na germinação de sementes e desenvolvimento de plantas de berinjela.

D. Estudar a sobrevivência e proliferação dos antagonistas no solo e na rizosfera de berinjela.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Verticillium dahliae*: sua importância na cultura de berinjela

Muitas controversias vêm sendo mantidas sobre a validade das espécies *V. albo-atrum* e *V. dahliae*. Alguns autores consideram *V. albo-atrum* e *V. dahliae*, linhagens de uma única espécie: *V. albo-atrum* (VIEGAS, 1939; FORDYCE JR. & GREEN JR., 1964; SHMONTINA & GORLENKO, 1968).

Entretanto, estudos realizados através de testes serológicos demonstraram que cada espécie do fungo possui componentes antigênicos específicos. Evidentemente, existem diferenças significativas entre *V. albo-atrum* e *V. dahliae*, podendo ser consideradas espécies diferentes (TERANISHI *et alii*, 1973).

De acordo com BRUEHL (1986), os dois maiores patógenos da murcha verticilar são *V. albo-atrum*, que mostra colônias inicialmente claras (albo), tornando-se escuras (atrum) com a idade em cultura e *V. dahliae* que produz microesclerócios em abundância sobre a maioria dos meios.

Além do mais, *V. dahliae* é mais comum em regiões de temperatura mais alta, embora, ambas as espécies sejam encontradas em regiões de clima frio.

A murcha de *Verticillium* é uma séria doença em muitas culturas agronomicamente importantes, incluindo berinjela, tomate, batata e outras.

A rotação de cultura não tem sido recomendada como uma medida eficiente de controle porque a gama de hospedeiros do fungo é bastante ampla, incluindo plantas cultivadas e algumas ervas daninhas (SILVA & TOKESHI, 1979). Estas últimas, embora apresentando descoloração vascular, não mostram sintomas externos. Com isto estes autores concluíram que, *Verticillium* spp. pode sobreviver por extensos períodos em hospedeiros nativos durante os períodos de rotação de cultura.

A sobrevivência de *V. dahliae* no solo durante longos períodos é devida a sua estrutura de resistência conhecida como microesclerôcio (SCHREIBER & GREEN, 1962). Estas estruturas podem germinar repetidamente e produzir pequenos conídios no solo (FARLEY *et alii*, 1971). A esporulação pelos microesclerócios é alcançada através de suas próprias reservas. Assim, ciclos amenos de chuva e seca podem produzir repetidos cultivos de conídios, entretanto, eles declinam com a exaustão do microesclerôcio. Isto evidencia que, muitos dos microesclerócios que germinam durante o período

úmido perdem sua capacidade de suportar a seca quando o solo torna-se aerado durante períodos mais secos (BRUEL, 1986). A transformação de conídios em microesclerócios foi observada pela primeira vez por WILHELM (1954). Quando ocorre o secamento gradual nas pontas dos conídios, estes parecem inchar-se e germinam através de finos tubos germinativos, com a conseqüente formação de anastomose entre esses pequenos tubos. Assim, acrescenta o autor, essa massa de conídios pode transformar-se então, em um pequeno microesclerócio de coloração escura.

De acordo com PERRY & EVERT (1984), microesclerócios são compostos de células vivas e células mortas. Este autor cita o trabalho de Schanathorst<sup>1</sup> o qual diz que microesclerócio de *V. dahliae*, aparentemente, é formado como resultado do desenvolvimento saprofítico do patógeno e não durante a fase parasítica ativa do fungo. O autor acrescenta ainda que, microesclerócios foram encontrados em vários estádios de desenvolvimento dentro da epiderme, córtex e floema de raízes de batata.

Recentemente, KRIKUM & BERNIER (1987) reportaram que as espécies de gramíneas (trigo, cevada, centeio e outras) testadas foram capazes de manter *V. dahliae* no solo

---

<sup>1</sup> SCHNATHORST, W.C. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: Fungal wilt disease of plants. Edited by M.E.Mace, A.A. Bell, and C.E.Beckman. Academic Press; New York, pp.81-111, 1981

porque microesclerócios estavam presentes nas raízes de todas essas espécies. Desta maneira, constatou-se que microesclerócios são importantes fontes de inóculo primário (PERRY & EVERT, 1984).

Devido às dificuldades envolvidas nos estudos de colonização de fungos de raiz, a maioria deles é feita em casa de vegetação (GERIK & HUISMAN, 1985). Estes autores encontraram que a colonização de *V. dahliae* ocorre nos primeiros estádios de vida da raiz, próximo à ponta. Além disto, as áreas de formação de raízes laterais são zonas onde ocorrem extensivas disrupções de células e provavelmente, há liberação de nutrientes. Desta forma, comentam os autores, esses possíveis pontos de entrada para o sistema vascular do hospedeiro são, certamente, o próximo passo para a colonização do fungo.

Com auxílio de microscopia eletrônica, PERRY & EVERTY (1983) verificaram que a penetração de hifas ocorre diretamente através das células epidérmiais, aparentemente, ajudada pelas enzimas hidrolíticas. Sintomas de murcha foram primeiramente notados com 2 dias após as hifas serem encontradas em elementos do vaso na raiz.

As cultivares comerciais de berinjela são suscetíveis à murcha causada por *V. dahliae*. O híbrido F100 é o mais cultivado no Brasil por apresentar excelentes características agrônômicas, maior vigor e produtividade em condi-

ções adversas. No entanto, é extremamente suscetível ao patógeno. Já as introduções canadenses (RV-I, RV-II, RV-III e R-IV) mostram níveis mais altos de resistência a esse patógeno (MELLO, 1984).

## 2.2. Mecanismos de controle biológico de doenças de plantas

Os organismos antagonistas que têm potencial para interferir nos processos de vida de patógenos de plantas, segundo COOK & BAKER (1983) podem agir por antibiose, competição, parasitismo e predação. Antibiose é a inibição ou destruição de um organismo pelos produtos metabólicos de outro; competição entre microorganismos é, normalmente, por alimentos, espaço e oxigênio; parasitismo e predação de um microorganismo pelo outro são juntamente mais comuns.

O parasitismo é uma forma comum de simbiose entre muitos grupos de organismos e estabelece relações nutricionais que favorecem a existência do parasita (BARNETT, 1963). As atividades parasíticas que consomem outros parasitas de plantas superiores com o objetivo de biocontrole de doenças de plantas, foram denominadas hiperparasitismo ou para

aqueles parasitas de fungos, micoparasitismo (BARNETT, 1963; BOOSALIS, 1964; BARNETT & BINDER, 1973). O estudo das interações nutricionais entre fungo hospedeiro e fungo parasita (micoparasitismo) é similar àquele que ocorrem em plantas superiores (BARNETT *et alii*, 1979). Assim, os micoparasitas foram divididos em parasitas necrotróficos e biotróficos, terminologia esta proposta também para parasitas de plantas superiores (Thrower<sup>1</sup>, citado por BAKER, 1987a). Os parasitas necrotróficos (destrutivos) ao entrarem em contato com seu hospedeiro excretam uma substância tóxica, que mata a célula hospedeira, utilizando em seguida, os nutrientes que são liberados. A maioria dos micoparasitas são saprófitas e são caracterizados pelo rápido crescimento sobre diversos substratos (BARNETT, 1963).

Por outro lado, os parasitas biotróficos (ou balanceados) obtêm nutrientes de células hospedeiras vivas e não causam quase nenhum dano ao hospedeiro. Neste grupo pode-se incluir aqueles que têm sido denominados como parasitas obrigatórios (BARNETT & BINDER (1973). Segundo BARNETT (1963), o parasita pode viver inicialmente como um parasita biotrófico e por último destruir o protoplasma do hospedeiro como um parasita necrotrófico. Ayers & Adams, citados por BAKER (1987a) não endossaram a separação de

---

<sup>1</sup> THROWER, L.B. Terminology for plant parasites.

*Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 56:258-259, 1966.

<sup>2</sup> AYERS, W.A. & ADAMS, P.B. Mycoparasitism and its application to biological control of plant disease. *In*: Biological control in crop production. Ed. G.C.Papavizas. Tatowa, 1981.

parasitas biotróficos de necrotróficos, pois segundo eles, existem micoparasitas destrutivos que se comportam como biotróficos quando seu desenvolvimento é favorecido pela vida, ao invés da morte da estrutura do hospedeiro e, em muitos casos, a morte do hospedeiro pode não ser devido à excreção de substâncias tóxicas.

Diversos exemplos de micoparasitismo mostram promissor o controle biológico de doenças de fungos de solo. *Trichoderma* spp. são antagonistas ou hiperparasitas de muitos patógenos de plantas podendo efetivamente reduzir doenças causadas por esses fungos (PAPAVIZAS, 1985). De acordo com BARNETT & BINDER (1973), os micoparasitas necrotróficos são os mais comuns entre os fungos filamentosos na natureza.

Atualmente, a biologia celular de micoparasitas necrotróficos tem recebido considerável atenção. A parede celular de fungos patogênicos é composta de  $\beta$ -1,3-glucana e quitina e às vezes, dependendo do patógeno, a parede celular é composta de celulose. Isolados de *Trichoderma* spp. são capazes de crescer sobre a parede celular desses patógenos, utilizando-a como fonte de carbono. Estes antagonistas possuem sistemas enzimáticos capazes de degradar componentes da parede celular do hospedeiro através da produção de enzimas hidrolíticas como  $\beta$ -1,3-glucanase, celulase e quitinase (CHET & ELAD, 1983).

CHET & ELAD (1983) descrevem os passos que

levam ao parasitismo de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma* spp. os quais se iniciam com a detecção do hospedeiro pelo antagonista que, provavelmente, ocorre em resposta a presença de estímulos químicos liberados, por *R. solani*. Assim, quando se estabelece o contato entre os dois fungos, o antagonista tanto pode crescer paralelamente a seu hospedeiro como enrolar-se nele. O segundo passo, seria o reconhecimento e ligação do micoparasita ao seu hospedeiro, pois, foi detectada a presença de lectina sobre a parede celular de *R. solani*, a qual liga-se a um carboidrato sobre a parede celular de *Trichoderma* spp. O terceiro passo seria a ocasional degradação e lise da parede celular.

Interações entre *T. harzianum* e patógenos de plantas como *R. solani* e *Sclerotium rolfsii*, a nível celular, foram exhaustivamente demonstradas na literatura (CHED *et alii* (1983); BARAK *et alii* (1985) e outros. Hifas deste micoparasita podem enrolar-se fortemente ao redor da hifa hospedeira ou então, produzir estruturas semelhantes a apressórios que se aderem à parede do hospedeiro. O micoparasita digere partes da parede celular do fungo hospedeiro e penetra na sua hifa.

Mais recentemente, ELAD *et alii* (1987) revelaram, através de microscopia eletrônica, a presença de um material fibrilar depositado durante a interrelação de *T. harzianum* e *R. solani*. Aparentemente, este pode ser um polissac

carfideo originado da interação fúngica (CHET *et alii*, 1983).

Por outro lado, o micoparasitismo pode estimular fortemente a reprodução sexual do parasita, embora, o fator nutricional requerido para sua reprodução sexual não necessariamente seja um requisito básico para o parasitismo. Neste caso, o micoparasita pode parasitar algumas espécies de fungos sem a produção de esporos sexuais. Segundo BOOSALIS (1964), estes hospedeiros embora não possuam substâncias necessárias para a reprodução sexual, contêm certamente, alguns fatores que são imprescindíveis para efetivarem o parasitismo.

De acordo com ELAD *et alii* (1984), espécies de *Trichoderma* utilizam o conteúdo celular de esclerócios para seu crescimento e esporulação após a degradação da parede celular. O antagonismo durante a dormência do hospedeiro pode levar à destruição do inóculo do patógeno através do parasitismo, predação e competição dos propágulos.

A maioria de trabalhos encontrados na literatura descrevem as formas antagônicas de espécies de *Trichoderma* contra uma gama de patógenos. Entretanto, VAJNA (1985a) mostrou o parasitismo mútuo entre *Fusarium oxysporum* e *T. longibrachiatum* através de enrolamentos de hifas, sítios de penetração, formação de bainhas de proteção (reação de defesa de *T. longibrachiatum*), invasão de hifas e crescimento in

terno de *T. longibrachiatum* dentro de células de *F. oxysporum*. As atividades micoparasíticas bem como a produção de metabólitos tóxicos por *F. oxysporum* são comuns pois, este patógeno pode competir bem sucedidamente com outros fungos patogênicos de solo e saprófitas. Entretanto, as outras espécies como *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* foram parasitadas e destruídas por *F. oxysporum*.

Parasitismo mútuo similar a este foi constatado entre diferentes espécies de *Trichoderma* (VAJNA, 1985b). Através de um método simples de preparação de hifas para observações em microscópio de luz, pode-se verificar sítios de penetração, estruturas semelhantes a haustórios, crescimento interno de hifas e formação de bainhas de resistência entre *T. hamatum* e *T. pseudokoningii*. Segundo este autor, parasitismo mútuo pode ocorrer também na natureza. Isto sugere que a introdução de um dado isolado de *Trichoderma* no solo objetivando o controle biológico, pode sofrer interferência de espécies indígenas.

Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente, durante o processo de vida do antagonista. Por exemplo, *Gliocladium* spp. causa a morte e degradação de suas hifas hospedeiras pela secreção de antibióticos, além disto, estes antagonistas enrolam-se ao redor da hifa hospedeira e crescem sobre o conteúdo da célula morta. Desta forma, é conhecido também que antibiose e compe

tição se sobrepõem quando microorganismos em populações mistas obtêm nutrientes pela secreção de metabólitos desencorajando o crescimento de competidores (COOK & BAKER, 1983). Assim, a competição intra e inter específica entre organismos é um importante fator o qual determina a densidade de populações na natureza. Espécies relacionadas ou aquelas que preferem o mesmo nicho ecológico, normalmente, evitam a competição e ocupam diferentes áreas geográficas ou diferentes habitats na mesma área (Odum<sup>1</sup>, citado por SCHROTH & HANCOCK, 1981).

Espécies de *Trichoderma* produzem antibióticos de amplo espectro e têm alta capacidade competitiva. Assim, o vigoroso e competitivo hábito de crescimento de *T. viride* é a evidência de sua natureza fisiologicamente avançada, fato este que pode explicar o controle de doenças no solo (DUTTA, 1981). Em geral, organismos produtores de antibióticos tendem a ser tolerantes a eles (BRUEL, 1986).

Houve um substancial interesse por parte de pesquisadores, após a descoberta da penicilina, no estudo de antagonistas de patógenos de planta (BAKER, 1987b). Já em 1948, E. Grossard e outros demonstraram que os antibióticos

---

<sup>1</sup> ODUM, E.P. Fundamentals of Ecology. Philadelphia, London: W.B. Saunders, 384 pp. 1953.

foram produzidos no solo por *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Streptomyces* spp. Este autor acredita que os antibióticos produzidos em contato direto entre microorganismos, embora sejam produzidos continuamente e em baixa concentração, podem estar menos sujeitos a decomposição biótica.

Muitos isolados de *Trichoderma* spp. são antagonistas a uma série de fungos, produzindo antibióticos voláteis e não voláteis (DENNIS & WEBSTER, 1971a,b; RAI *et alii*, 1980 e CAMPOROTA, 1985). A capacidade para produzir tais substâncias varia entre isolados da mesma espécie, bem como entre isolados de diferentes espécies (DENNIS & WEBSTER, 1971a).

Conforme PAPAIVIZAS (1985), as técnicas usadas inicialmente, para obtenção e caracterização de metabólitos tóxicos produzidos por *Trichoderma* spp. foram muito simplistas. Assim, a clarificação da taxonomia do gênero *Trichoderma* por RIFAI (1969) e a introdução de novas técnicas de produção de metabólitos usadas na indústria microbiana, auxiliaram os estudos de DENNIS & WEBSTER (1971a) mostrando que *Trichoderma* spp. produzem antibióticos diferentes de gliotoxina e viridina. Estes autores mostraram que outros antibióticos, tais como trichodermina foram produzidos por *T. viride* e *T. polysporum* e antibióticos pepticos foram produzidos por *T. hamatum*. Entretanto, gliotoxina e viridina podem ter sido produzidos, embora, em pequenas quantidades. PAPAIVIZAS *et alii*

(1982) induziram mutação em *T. harzianum* e os novos biotipos produziram dois metabólitos não identificados, sendo um termo-instável e o outro termo-estável.

A produção de metabólitos tóxicos por *Trichoderma* spp. foi observada por WEINDLING (1934) que concluiu que o princípio letal foi excretado por intermédio de hifas jovens e o seu efeito fungicida foi mais eficiente após dois dias da germinação dos conídios.

De acordo com PAPAIVIZAS (1985), espécies de *Trichoderma* e *Gliocladium* além de serem boas produtoras de metabólitos tóxicos podem produzir também várias enzimas, tais como as exo e endoglucanase, celobiose e quitinase. Desta maneira, COOK & BAKER (1983) relatam que antibiose, competição, micoparasitismo necrotrófico e predação podem resultar em lise e derramamento do conteúdo celular do hospedeiro no ambiente. Entretanto, PAPAIVIZAS (1985) comenta que, apesar dos intensos esforços no estudo dos mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* e *Gliocladium*, não se sabe ainda seu significado ecológico na natureza. Apesar dos antibióticos representarem um importante papel no antagonismo, a competição é um fator que tem sido muito considerado em condições naturais (CHET & HENNIS, 1985).

### 2.3. Fatores que afetam os agentes de biocontrole

BOOSALIS (1963) cita alguns fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o parasitismo. Dentre os fatores intrínsecos, está a suscetibilidade do hospedeiro durante certos estádios de desenvolvimento. Também em alguns casos, o hospedeiro pode resistir à infecção através da formação de bainhas de proteção. Estas estruturas são capazes de encapsular a hifa parasita. O tamanho da hifa hospedeira pode atuar como uma barreira física para a penetração (DENNIS & WEBSTER, 1971c).

Além destes, BAKER (1987a) considera que a variabilidade na produção de enzimas hidrolíticas leva sobremaneira à especificidade entre parasita e hospedeiro. Segundo este autor, os níveis de produção de enzimas se correlacionam com a capacidade de cada estirpe controlar um determinado patógeno. Por exemplo, isolados de *T. harzianum* diferiram no nível de enzimas hidrolíticas produzidas quando micélio de *S. rolfsii*, *R. solani* e *P. aplanidermatum* estavam presentes no solo. De acordo com CHET *et alii* (1967) este fenômeno está correlacionado com a capacidade de isolados de *Trichoderma* controlarem os respectivos patógenos no solo.

Ao contrário dos pesticidas usados em controle químico, a atividade de agentes de biocontrole é bastante

influenciada pelos fatores extrínsecos no ambiente (BAKER, 1987b).

Dentre os fatores extrínsecos considerados em afetar o parasitismo está a nutrição como um dos mais importantes fatores, pois, tanto a quantidade como a qualidade de nutrientes influenciam os sistemas fisiológicos e bioquímicos do hospedeiro. De acordo com BOOSALIS (1963), o nível de carboidratos, por exemplo dextrose, aumenta a quantidade de parasitismo pelo incremento na suscetibilidade do hospedeiro e que, o tipo de carboidrato também afeta o parasitismo. De acordo com STACK *et alii* (1987), fontes de carbono e nitrogênio afetam o crescimento de fungos e a relação C:N afeta o padrão de ramificação e a taxa de alongação de hifas. Também, a suscetibilidade é afetada pela taxa de carbono e nitrogênio no meio dependendo do organismo. De acordo com AUBE & GAGNON (1969), *T. viride* prefere certas fontes e quantidades de carbono e nitrogênio para uma máxima esporulação e crescimento e não existe correlação entre esporulação e peso seco de cultura, quantidade de carbono no meio e taxa de C:N. Conforme WATANABE *et alii* (1987), existe um efeito sinérgico sobre o controle biológico, com a aplicação de fertilizantes nitrogenados e *T. hamatum*.

Temperatura, segundo BOOSALIS (1963), tem mostrado afetar o grau de parasitismo em alguns casos, entretanto em outros, a severidade do parasitismo não foi afetada pe

las trocas de temperatura. A temperatura ótima para parasitismo de hiperparasitas necrotróficos é de 25° a 30°C.

*T. pseudokoningii* foi usado para controlar podridão em maçãs causada por *Botrytes cinerea* por TRONSMO (1983). Houve redução na quantidade de doença quando foi feita a infecção artificial, entretanto, o mesmo não ocorreu em condições naturais. Conforme esse autor, a razão para o insucesso atribuído ao ensaio de campo foi devido às baixas temperaturas durante o florescimento, desfavorecendo, desta forma, o crescimento do antagonista. De acordo com JOHNSON *et alii* (1987), *Trichoderma* spp. tem tido pouco êxito no controle de doenças que são mais severas sob condições de temperatura mais baixa. Consequentemente, *T. hamatum* controlou tombamento causado por *Pythium* spp. em temperatura na faixa de 17°-30°C, mas não controlou a doença em 12°C (HARMAN *et alii*, 1981). Espécies de *Trichoderma* tolerantes ao frio podem ser efetivas no controle de doenças que causam murcha ou tombamento (JOHNSON *et alii*, 1987), pois, doenças causadas por fungos de solo são frequentemente mais severas à 20°C ou abaixo disto. Entretanto, o biocontrole pode ser inefetivo em temperaturas mais altas, como 37°C (HARMAN *et alii*, 1981).

As preferências ecológicas de espécies de

*Trichoderma* foram discutidas por Danielson & Davey<sup>1</sup> citados por PAPAIVIZAS (1985). Certas estirpes de *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* são adaptadas a condições de maior umidade; *T. viride* e *T. polysporum* são restritos às áreas onde prevalecem temperaturas baixas, enquanto que, *T. harzianum* é mais comum em regiões quentes. *T. hamatum* e *T. koningii* são amplamente distribuídos em áreas de condições climáticas diversas.

Outro fator que, certamente, pode otimizar a atividade de agentes de biocontrole é o pH do solo (BAKER, 1986). O pH ótimo para crescimento de *T. koningii* e *T. harzianum* foi de 4,5 (NELSON & NASH, 1988). Da mesma maneira, *T. harzianum* foi mais efetivo no controle de *R. solani* em solos com pH igual a 3,5 (MARSHALL, 1982).

Desta forma, já é conhecido que *Trichoderma* spp. desenvolve-se melhor em condições ambientais ácidas, devendo a melhoria na germinação de seus propágulos (CHET & BAKER, 1981; HARMAN & TAYLOR, 1988).

Solos supressivos com baixo pH mostraram uma quantidade maior de propágulos ( $8 \times 10^5$  propágulos/grama de solo) enquanto que, solos com pH 8,1 continham apenas  $10^2$  pro

<sup>1</sup> DANIELSON, R.M. & DAVEY, C.B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, New York, 5:485-94, 1973.

págulos/grama de solo (CHET & BAKER, 1981).

A supressividade a *R. solani* em monocultura de rabanete foi alcançada mais rapidamente em solos alcalinos que em solos ácidos (LIU & BAKER, 1980). Além disto, os autores comentam que houve um aumento na sobrevivência de *Trichoderma* spp. em solos mais úmidos em comparação com solos mais secos.

Como as espécies de *Trichoderma* são boas competidoras e saprófitas, torna-se possível aumentar a atividade destes agentes, pela incorporação de resíduos de plantas no solo (PAPAVIZAS, 1985). Assim, o antagonista pode ser capaz de aumentar sua atividade saprofítica seletivamente através da produção de enzimas disponíveis para o biocontrole de patógeno (BAKER, 1987a). O autor cita um exemplo: após a incorporação de celulose no solo, seletivamente, houve um aumento na densidade populacional de *T. harzianum*, favorecendo assim a supressividade de *R. solani* no solo.

De acordo com NELSON *et alii* (1988), a qualidade da base alimentar é muito mais importante que os níveis populacionais de *Trichoderma* para as atividades de controle biológico. Reese & Mandels<sup>1</sup> citados por NELSON *et alii*

---

<sup>1</sup>

REESE, E.T. & MANDELS, M.  $\beta$ -D-1,3 glucanase in fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 5:173-85, 1959.

(1988), encontraram que *T. viride* produz  $\beta$ -1,3 glucanase quando cresce sobre substratos como amido, celulose, manitol e laminarina. Os autores comentam que, as atividades de biocontrole aumentaram sobre *Pythium* spp. quando *T. harzianum* também cresceu sobre amido, celulose, manitol e outros.

HADAR *et alii* (1979) encontraram que quando *T. harzianum* foi aplicado ao solo crescendo em farelo de trigo, os resultados contra *R. solani* foram muito otimistas.

A proliferação e o subsequente estabelecimento de agentes de biocontrole no solo dependem da idade e da forma com que foram adicionados em relação à base alimentar. Conforme LEWIS & PAPAIVIZAS (1984 e 1985), as populações de *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamatum* e outras espécies de antagonistas aumentaram drasticamente quando o inóculo foi adicionado ao solo como hifas jovens. Assim, com o rápido crescimento e desenvolvimento dos agentes favorecidos pela base alimentar disponível, houve um considerável decréscimo na população de patógenos que se encontravam nessas vizinhanças. Ainda, comentam estes autores, que a idade do inóculo foi crítica para a sua máxima proliferação no solo. As preparações miceliais com 1 a 3 dias de idade aumentaram  $10^3$  vezes (em unidades formadoras de colônias/g) em uma semana de inoculação e de  $10^4$  vezes para  $10^8$  unidades formadoras de colônias/g em três semanas de incubação. Após seis semanas de incubação houve decréscimo na densidade das populações, inde -

pendentemente da natureza inicial do inóculo.

As preparações miceliais usadas por LEWIS & PAPAVIDAS (1984 e 1985) obtiveram uma mais rápida colonização do substrato e conseqüentemente, melhoraram a proliferação e eficiência dos agentes de biocontrole no solo. Ao contrário, as preparações de conídios foram inefetivas em estimular o aumento das populações dos antagonistas nas primeiras semanas de incubação pois, conídios estão mais sujeitos a fungistase do solo.

A incorporação de substratos ao solo, por um lado, pode estimular a produção de propágulos de *Trichoderma* spp. mas, por outro lado, o antagonista pode não possuir um sistema enzimático capaz de destruir o patógeno (HARMAN *et alii*, 1981). Por exemplo, a aplicação de turfa sobre sementes de ervilha não teve efeito na eficiência de *T. hamatum* no sentido de controlar doenças de plântulas, porém, houve um estímulo na produção de propágulos do antagonista no solo. Celulose também não teve influência sobre a incidência de doença (HARMAN *et alii*, 1981), pois, este substrato pode ser degradado por patógenos como *R. solani* e *Pythium* spp. (ALEXANDER, 1977).

Conforme LEWIS & PAPAVIDAS (1987), uma das estratégias importantes para maximizar a eficiência do biocontrole trata-se da ocasião em que o inóculo de *Trichoderma* é adicionado ao solo em relação ao inóculo do patógeno.

É provável que, sob condições naturais, o patógeno esteja sempre presente no solo quando os agentes de biocontrole são incorporados ao solo. Estes autores relatam que houve uma redução completa na sobrevivência de *R. solani* quando preparações miceliais de *T. hamatum* foram adicionadas no solo ao mesmo tempo ou uma semana após a adição do patógeno; uma redução de 50% na sobrevivência quando o antagonista foi adicionado no solo 2 a 4 semanas após o patógeno e não houve redução quando adicionado ao solo com 1, 2 ou 4 semanas antes do patógeno.

A densidade populacional do antagonista suficiente para requerer a supressividade em solos 'conducivos', já foi determinada em alguns trabalhos, como por exemplo LIU & BAKER (1980); CHET & BAKER, (1981) e outros mais. Entretanto, McFADDEN & SUTTON (1975) observaram que altas densidades de populações de *Trichoderma* spp. foram patogênicas às plântulas de milho. Além disto, NOL & HENIS (1987) encontraram que altas concentrações de inóculo de *T. hamatum*, em meio de cultura, contribuíram com o autotropismo de fialosporos.

Desta maneira, HADAR *et alii* (1984) acreditam que para que o agente de biocontrole possa ser capaz de suprimir determinado patógeno outros fatores devem estar envolvidos, além do grande número de propágulos de efetivos antagonistas.

Conforme MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986), alguns fatores como a identificação de antagonistas superiores, o sistema de multiplicação e a maneira pela qual o agente de biocontrole é aplicado, são de substancial importância na eficácia do controle de doenças. BAKER (1987a) acredita que o sucesso no biocontrole depende também da população do patógeno.

Embora diferentes dos produtos químicos usados frequentemente, para controle de doenças de plantas, os agentes de biocontrole sofrem interações com o ambiente afetando sobretudo o seu desempenho. Assim, os micoparasitas devem possuir requerimentos ambientais específicos para as atividades de controle de doenças. Consequentemente, eles devem ser aplicados em climas adequados para maximizar o potencial antagônico (BAKER, 1987a).

#### **2.4. O potencial antagonista de *Trichoderma* spp. no controle biológico**

Recentemente, as pesquisas que envolvem espécies de *Trichoderma* têm registrado uma nova fase devido às facilidades de isolamento e quantificação de propágulos em meios de cultura (PAPAVIZAS, 1981; MARTIN, 1987), ao desenvolvimento de novas técnicas para estudo da sobrevivência e proliferação no solo e na rizosfera (CHAO *et alii*, 1986;

AHMAD & BACKER, 1987a), e com a indução de novos biotipos resistentes a fungicidas (MOYTY *et alii*, 1982; PAPAVIDAS, 1982; AHMAD & BACKER, 1987a). Grandes progressos têm sido alcançados também, nos estudos de produção de metabólitos e suas interações com mecanismos de ação no biocontrole (DENNIS & WEBSTER, 1971a; CHET & ELAD, 1983).

Mesmo assim, o uso rotineiro de *Trichoderma* como agente de controle de doenças ainda é bastante limitado. Dentre outras causas, PAPAVIDAS (1985) acredita que este fato se deve, principalmente, a sua especificidade pois, uma estirpe de *Trichoderma* pode potencialmente controlar apenas uma doença na maioria das vezes.

Além disto, SCHROTH & HANCOCK (1981) acreditam que, para que haja eficácia no biocontrole, a planta deve ser suscetível ao patógeno durante um curto período de tempo e o agente causal não pode ser um vigoroso habitante do solo. Possivelmente, as doenças que causam murchas vasculares podem ser mais difíceis de controlar porque a infecção ocorre por toda a extensão da planta e ademais, o patógeno pode infectar vários sítios ao longo das raízes. Com isto, estes autores concluíram que a natureza do patógeno é a principal responsável pelo sucesso no biocontrole.

Comparado com outros microorganismos, as populações de patógenos de plantas são, normalmente, em número mais reduzido e são menos competitivos por espaço e por

nutrientes disponíveis. Entretanto, eles podem escapar dessa competição e passar a colonizar os tecidos de seus hospedeiros. Todavia, durante certos estágios de seu ciclo de vida, os patógenos estão suscetíveis às interações com a micologia saprofítica do solo (BETTIGL, 1987).

Os fungos antagonistas, os quais vivem saprofiticamente no solo, provavelmente, produzem algumas substâncias antibióticas que inibem o crescimento normal de propágulos de patógenos no solo, e o crescimento saprofítico dos antagonistas supera o crescimento do patógeno, consequentemente, reduzem o potencial de inóculo causando uma redução na incidência da doença (DUTTA, 1981a). Este autor encontrou que *T. viride*, aplicado em tomate através da imersão de raízes em suspensão de conídios reduziu consideravelmente, o potencial do inóculo de *Verticillium albo-atrum*, embora não tivesse eliminado o patógeno do solo e também, não impediu a infecção do patógeno ao hospedeiro.

JORDAN & TARR (1978) empregaram *T. viride* em um solo previamente infestado com *T. dahliae* e puderam constatar uma significativa redução na incidência da doença, além de um considerável aumento no tamanho de plantas de morangueiro.

Em experimentos realizados em condições de

nutrientes disponíveis. Entretanto, eles podem escapar dessa competição e passar a colonizar os tecidos de seus hospedeiros. Todavia, durante certos estágios de seu ciclo de vida, os patógenos estão suscetíveis às interações com a micologia saprofítica do solo (BETTIOL, 1987).

Os fungos antagonistas, os quais vivem saprofiticamente no solo, provavelmente, produzem algumas substâncias antibióticas que inibem o crescimento normal de propágulos de patógenos no solo, e o crescimento saprofítico dos antagonistas supera o crescimento do patógeno, consequentemente, reduzem o potencial de inóculo causando uma redução na incidência da doença (DUTTA, 1981a). Este autor encontrou que *T. viride*, aplicado em tomate através da imersão de raízes em suspensão de conídios reduziu consideravelmente, o potencial do inóculo de *Verticillium albo-atrum*, embora não tivesse eliminado o patógeno do solo e também, não impediu a infecção do patógeno ao hospedeiro.

JORDAN & TARR (1978) empregaram *T. viride* em um solo previamente infestado com *V. dahliae* e puderam constatar significativa redução na incidência da doença, além de um considerável aumento no tamanho de plantas de morangueiro,

Em experimentos realizados em condições de

campo, MELO (1984) mostrou que *T. viride* controlou *V. dahliae* em cultivo de berinjela, após a infestação do solo com o patógeno e com o antagonista.

O controle de *V. dahliae* através de agentes de biocontrole (*T. viride*) foi alcançado pela primeira vez na Rússia, por Brimistru & Shteinberg<sup>1</sup>, tanto em culturas de algodão como em berinjela (MAROIS, 1982).

CATANI *et alii* (1967) mostraram que *T. lignorum* e outros antagonistas foram eficientes no controle de *V. dahliae* apenas no início do ciclo da cultura de berinjela.

MAROIS (1982) isolou trinta e quatro linhagens de fungos e apenas seis deles reduziram a incidência da murcha verticilar de berinjela. Os seis isolados testados no campo foram *Aspergillus alutaceus*, *Gliocladium virens*, *Paecilomyces lilacinus*, *Talaromyces flavus*, *Trichoderma harzianum* e *T. viride*. Os resultados de campo mostraram que *P. lilacinus*, *A. alutaceus* e *T. viride* reduziram a incidência da murcha verticilar, enquanto que *Talaromyces flavus*, além de ter reduzido consideravelmente a in-

---

<sup>1</sup> BRIMISTRU, L.O. & SHTEINBERG, M.E. Study of rhizosphere mycoflora of eggplants as affected by the application of *Trichoderma lignorum* Tzv. Akad. Yank hold, SSR, Ser. Biol. Khim, Nank 1978:87-88, 1978.

cidência da doença, aumentou o rendimento em peso e em número de frutos.

*T. flavus* (= *P. vermiculatum*) tem demonstrado ocupar a rizosfera de batata, algodão, berinjela (MAROIS *et alii*, 1984) e tomate (DUTTA, 1981a); e conseqüentemente, reduz a viabilidade de microesclerócio de *V. dahliae*. Os mecanismos postulados para a perda da viabilidade de microesclerócios incluem antibiose, micoparasitismo e competição (FRAVEL *et alii*, 1987).

Outro agente causal de murcha vascular em cultivos economicamente importantes é *Fusarium oxysporum*. Muitas tentativas vêm sendo feitas para controlar *Fusarium* spp. pelos meios biológicos (SIVAN & CHET, 1986).

MAROIS *et alii* (1981) foram os primeiros a demonstrar o controle biológico da podridão da coroa em tomate causada por *Fusarium* spp. através do uso de *T. harzianum*. Entretanto, eles aplicaram uma mistura de isolados de *T. harzianum*, *Penicillium fumiculosum* e *Aspergillus ochraceus* em um campo fumigado com brometo de metila. Estes antagonistas reduziram a incidência da doença mas não afetaram o rendimento de frutos. Posteriormente, SIVAN *et alii* (1987), demonstraram o efeito benéfico de *T. harzianum* tanto no sentido de reduzir a incidência desta doença como também, melhorar o rendimento de frutos. De acordo com este último autor, a efetividade de *T. harzianum* em reduzir as populações de *F. oxysporum* da raiz

indicou que o antagonista foi um efetivo competidor na rizosfera, protegendo assim, a ponta de raízes mais jovens.

*T. harzianum* foi também isolado da rizosfera de algodão e mostrou ser efetivo no controle de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* e *F. roseum* de algodão, melão e trigo, respectivamente, em condições de casa de vegetação e campo (SIVAN & CHET, 1986).

Podridão de raízes e tombamento causados, respectivamente, por *F. solani* f. sp. *pisi* e *P. ultimum* foram estudados por dois anos em condições de campo. Durante esse período, sementes de ervilha de uma cultivar altamente suscetível a ambos os patógenos e linhas melhoradas para resistência a ambos os patógenos foram tratadas com fungicidas e/ou esporos de *Trichoderma* spp. No primeiro ano, o rendimento da linhagem resistente não foi afetado pelo tratamento das sementes, entretanto, o rendimento da cultivar suscetível foi superior quando as sementes foram tratadas com metalaxyl e esporos de *T. harzianum*. No segundo ano, as sementes tratadas com *T. vishide* mostraram excelentes resultados, tanto da cultivar suscetível como das linhagens resistentes de ervilha. Ademais, a severidade de *P. ultimum* foi reduzida, porém, a podridão de raízes causada por *F. solani* f. sp. não foi controlada. (KRAFT & PAPAVIDAS, 1983).

De acordo com MELO (1984), para se alcançar maiores êxitos com agentes de biocontrole, deve-se lançar

mão de hospedeiros com certo grau de resistência ao patógeno em estudo, pois usando-se hospedeiros suscetíveis, o controle da doença pode não ser efetivo apenas com emprego de potentes antagonistas.

Desta maneira, o emprego de *Trichoderma* spp. aliado a algumas práticas culturais como rotação de cultura, pasteurização de solos, uso de fungicidas e variedades resistentes pode apresentar melhores resultados do que quando qualquer um dos componentes é usado individualmente (ELAD *et alii*, 1984; PAPAIVIZAS, 1985 e outros).

O controle biológico de fungos patogênicos que produzem esclerócios tem tido sucesso com o emprego de algumas espécies de *Trichoderma* (HENIS *et alii* (1984). ELAD *et alii* (1984) reportaram a capacidade de *T. harzianum* controlar *Sclerotium rolfsii*, através da produção de quitinase e  $\beta(1,3)$ -glucanase no interior de esclerócios atacados durante o parasitismo. Embora estas estruturas sejam substancialmente protegidas da degeneração biológica e química, através de pigmentos semelhantes à melanina na sua camada externa (CHET & HENIS, 1967).

SANTOS & DHINGRA (1982) mostraram que alguns isolados de *T. koningii*, *T. pseudokoningii* e *T. harzianum* parasitaram esclerócio de *S. sclerotiorum*. Entretanto, *T. viride* não antagonizou esse patógeno. Este resultado discrepante pode ser atribuído a variação na agressividade deste isolado em particular.

Segundo BAKER & COOK (1983) "o controle biológico de esclerócios através de antagonistas, teoricamente, é mais viável porque os esclerócios representam um grande alvo comparado com outros propágulos, devendo assim serem mais vulneráveis ao ataque por hiperparasitas. Além disto, a destruição dos esclerócios ocorre, geralmente, na superfície do solo".

WHIPPS (1987) mostrou que isolados de *T. harzianum* cresceram através do tecido de planta e significativamente diminuíram a produção de esclerócios de *S. sclerotiorum*. Evidentemente que este não é o primeiro relato sobre a colonização de tecidos de plantas por *T. harzianum*. CONWAY (1983) relatou a ocorrência de podridão em maçãs, durante estocagem, causada por *T. harzianum*, após o ferimento de frutos.

Além da exploração do potencial de espécies de *Trichoderma* para o controle de doenças causadas por fungos de solo, alguns estudos têm revelado o potencial destes antagonistas na melhoria da germinação de sementes e no aumento do crescimento de plantas (CHANG *et alii*, 1986; WINDAN, 1986). A adição de *T. harzianum* e *T. koningii* em solo autoclavado aumentou a taxa de emergência de plântulas de tomate e fumo em relação à testemunha. WINDAN *et alii* (1986) acreditam que este fato se deve à produção de um fator de crescimento por *Trichoderma* spp. que aumenta a taxa de germinação de sementes e peso seco de plantas; e não somente devido ao controle de patógenos menores.

## 2.5. Estabelecimento e proliferação de *Trichoderma* spp. no solo e na rizosfera

A população microbiana na rizosfera é, certamente, mais extensa que a encontrada na massa do solo (BRUEL, 1986). Todos os nutrientes e água necessários para as plantas passam através da rizosfera (ROVIRA *et alii*, 1981). Desta maneira, a rizosfera é relativamente mais estável e produz continuamente, uma limitada taxa de alimento (BRUEL, 1986). Entretanto, segundo este autor, em solos com alto teor de matéria orgânica, a massa do solo é mais rica em microorganismos, portanto, esses resíduos orgânicos efêmeros são rapidamente explorados.

A abundância de *Trichoderma* em vários solos aliado a sua capacidade de degradar vários substratos orgânicos no solo, sua versatilidade metabólica e sua resistência a inibidores microbiais, sugere que eles podem sobreviver em muitos nichos ecológicos dependendo das condições predominantes e do genótipo do agente envolvido (PAPAVIZAS, 1985).

Em estudos sobre a sobrevivência de conídios de *T. harzianum* no solo, PAPAVIZAS (1981) mostrou que alguns conídios podem sobreviver por mais que quatro meses sem uma base alimentar, dependendo, certamente, do isolado usado. Entretanto, muitos conídios foram, provavelmente, lisados sem germinar ou se germinaram em resposta a alguns

nutrientes liberados houve, subsequentemente, lise na ausência de bases adequadas o suficiente para sustentar o crescimento e esporulação do fungo.

Conforme LEVIS & PAPAVIDAS (1984), a importância ecológica de clamidosporos é superior em relação a sobrevivência de conídios no solo. Estes autores verificaram que isolados de *Trichoderma* produziram clamidosporos rapidamente e em grande número em solo natural e em matéria orgânica, após a introdução dos fungos no solo na forma de conídios.

De acordo com Lookwood<sup>1</sup> citado por PAPAVIDAS (1985), quando substratos orgânicos são adicionados ao solo ocorre uma reversão na fungistase, sendo mais pronunciada em solos ácidos que em solos alcalinos. Ainda, comenta o autor, parece existir uma relação entre tipo ou tamanho de propágulos de *Trichoderma* e sua sensibilidade à fungistase. Assim, frequentemente, conídios são mais sensíveis à fungistase que clamidosporos (que são maiores) e hifas são menos sensíveis que conídios.

NELSON *et alii* (1983) encontraram que a pro

---

LOOKWOOD, J.L. Fungistasis in soil. *Biol. Rev.*, 52:1-43. 1977.

liferação de *Trichoderma* no solo é extremamente influenciada pelo grau de decomposição da matéria orgânica, pois, populações de *Trichoderma* não se alteram em resposta a compostos verdes, porém, aumentam substancialmente em resposta a compostos maduros. Além disto, PAPAIVIZAS (1985) comenta que substratos orgânicos podem também ser colonizados mais rapidamente pelos fungos patogênico ou saprofíticos possuindo maior capacidade competitiva saprofítica que os antagonistas.

Consequentemente, comenta PAPAIVIZAS (1985), a colonização primária de um substrato por *Trichoderma* antes da adição ao solo é uma das maneiras de superar a colonização secundária da base alimentar pelos microorganismos do solo e aumentar as chances do estabelecimento e proliferação do antagonista.

De acordo com PAPAIVIZAS (1981), *Trichoderma* spp. necessita de uma base alimentar adequada para estabelecer-se no solo e na rizosfera para maior efetividade do controle biológico de doenças de raiz.

O termo rizosfera foi clarificado por Katznelson<sup>1</sup> em 1965, citado por BRUEL (1986), o qual refere-se àquela fina camada de solo aderida às raízes. De acordo com

---

<sup>1</sup> KATZNELSON, H. Nature and importance of the rhizosphere. In: *Ecology of Soil Plant Pathogens*. Ed. W. C. Snyder and K.F. Baker. Univ. of California Press. Berkeley. 1965.

ROVIRA *et alii* (1981), a rizosfera é aquela zona de solo ao redor das raízes, na qual os microorganismos são afetados pelos compostos orgânicos liberados pelas raízes das plantas.

O rizoplano ou a superfície de raiz suporta relativamente uma alta atividade biológica e reflete mais sensivelmente que a rizosfera, o efeito da raiz sobre a microflora e microfauna do solo (BRUEL, 1986).

Conforme Bowen & Foster<sup>1</sup>, o maior crescimento de microrganismo sobre o rizoplano ocorre nos encaixes entre as células da epiderme (BRUEL, 1986). Este último autor acrescenta que, a maior quantidade de exudação ocorre ao longo das junções das células e que, organismos produtores de antibióticos e tolerantes a antibióticos são favorecidos por esta fonte contínua de alimento. De acordo com BOWEN & ROVIRA (1976) a capacidade de translocação de muitos fungos permite seu crescimento sobre áreas onde a exudação é mais baixa. Esta propriedade de translocação, comentam estes autores, permite a eles o escape de bactérias antagonistas.

CHAO *et alii* (1986) encontraram que, na rizosfera, as populações de bactérias e de fungos podem escapar

---

<sup>1</sup> BOWEN, G.D. & FOSTER, R.C. *Soil factors in crop production in a semi arid environment*. Ed. J. S. Russel and E.L. Queensland. Univ. Press. Australia. 1978.

da competição pela colonização em diferentes nichos e/ou pelo mesmo grau de separação espacial dentro da rizosfera. Consequentemente, comentam estes autores, combinações bem sucedidas de bactérias e fungos podem melhorar o controle de patógenos causadores de podridão de sementes e raízes.

Segundo ROVIRA *et alii* (1981) a ponta da raiz é isenta de fungos e a colonização lateral ocorre do solo para a raiz. Assim, as espécies iniciais na zona acima da ponta da raiz são denominadas as colonizadoras "casuais", como por exemplo: *Fusarium* spp., *Cylindrocladium radicumicola*, *Gliocladium* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma viride*.

Entretanto, PAPAVIDAS (1985) comenta que, geralmente, populações de *Trichoderma* adicionadas ao solo são incapazes de proliferar na rizosfera de plantas, possivelmente, devido a falta de nutrientes adequados, a presença de substâncias tóxicas na exudação da raiz, presença de antagonistas ou microorganismos competindo na rizosfera ou no rizopiano. Alguns solos com baixos níveis de ferro são supressivos a *Trichoderma* spp. devido as atividades de *Pseudomonas* spp. e seus siderosporos (HADAR *et alii*, 1984). Estes autores comentam ainda que, os isolados de *Trichoderma* nativos podem ser mais adaptados ao solo do que aqueles isolados introduzidos e consequentemente, podem melhor coexistir com a microflora nativa do solo.

Embora efetivo em reduzir a incidência de doenças, *Trichoderma* spp. frequentemente, falha em estabelecer-se na rizosfera (PAPAVIZAS, 1981; CHAO *et alii*, 1986), talvez porque estes organismos sejam pobres colonizadores da superfície de raízes (TAYLOR & PARKINSON, 1961) ou porque eles são incapazes de serem transportados pelas raízes através do perfil do solo (CHAO *et alii*, 1986). Se *Trichoderma* spp. não é capaz de se multiplicar ao longo da superfície da raiz, a supressão de patógenos é apenas daqueles que causam podridão de sementes e doenças em plântulas, mas não daqueles que causam doenças em raízes (PAPAVIZAS, 1981; 1985).

CHAO *et alii* (1986) verificaram que quando sementes tratadas com *T. harzianum* foram plantadas em solo esterilizado os propágulos foram encontrados no solo e não na rizosfera, sugerindo que mesmo sob condições favoráveis a colonização do antagonista ocorre, geralmente, no solo ao invés da superfície de raízes.

Baseado neste enfoque, AHMAD & BAKER (1987a), induziram mutação em isolados de *T. harzianum* na tentativa de encontrar novos biotipos com potencial para colonizar rizosfera. Os mutantes obtidos mostraram-se tolerantes ao benomyl e foram capazes de colonizar a rizosfera de várias espécies de plantas. Entretanto, a razão pela qual tais mutantes foram competitivos na rizosfera foi explicada, posteriormente, por AHMAD & BAKER (1987b). Segundo estes autores, a capacidade de colonizar as raízes, provavelmente, deve estar relacionada com o aumento na atividade de produção de enzimas, tais como celulase, que resultam em uma maior capacida-

de saprofítica para obter substratos (celulose) sobre o rizoplano ou rizosfera.

AHMED & BAKER (1987a) acreditam que, se o novo biótipo possuir uma elevada capacidade de degradação de celulose, provavelmente o seu crescimento no solo acompanhará o crescimento das raízes, tornando-o um competente saprófita na rizosfera de plantas.

## 2.6. Perspectivas no biocontrole

Desde que os agentes de biocontrole foram reconhecidos como responsáveis pela supressividade em determinados solos, pesquisadores de vários países têm se interessado pela exploração desses organismos (BAKER, 1987b). Entretanto, apesar de décadas de intensivos estudos, poucos organismos têm obtido a eficiência de outros tipos de medidas de controle (BAKER, 1986).

Assim, estratégias para promover a efetividade de isolados devem ser empregadas, mas, torna-se importante conhecer antes quais as características que poderão ser manipuladas para tornar o biocontrole mais efetivo (BAKER, 1986). Também, o que se espera de um microorganismo deve, certamente, ser aplicável em seus limites ecológicos (KENERLEY & STACK, 1987).

Estes últimos citam algumas características necessárias para que um antagonista venha a reduzir a densidade de inóculo de patógenos de plantas que formam esclerócios:

A. capacidade para afetar adversamente, a germinação e viabilidade de propágulos;

- B. capacidade para crescer através do solo;
- C. possuir boas atividades em condições ambientais adversas;
- D. sobrevivência e potencial reprodutivo.

Estas quatro características listadas para agentes de biocontrole podem ser quantificadas e incorporadas em um programa designado a selecionar estirpes efetivas. Esta lista, certamente que iria depender da tarefa requerida para a eficácia do controle, mas existem boas razões para programas de seleção serem baseados em mais que uma característica. Diversas características quando expressas individualmente podem não ser eficazes, entretanto, a combinação delas pode render consideráveis níveis de controle. Como as características são quantitativas, elas são certamente aditivas no efeito. Desta maneira, a identificação de quais as características que são mais importantes ou desejáveis no controle de um patógeno de planta por um antagonista deve ser elucidada antes da extensiva manipulação genética. Este conjunto de informações poderia ser incorporado dentro de programas de melhoramento de estirpes utilizando fusão de protoplastos, plasmídeos, tecnologia de transformação de DNA exógeno (KENERLEY & STACK, 1987), mutação (BAKER, 1986 e 1987a) e parassexualidade.

PAPAVIZAS (1985) considera também como prioridades na pesquisa de biocontrole, além da manipulação genética para melhorar o nível de controle, os seguintes aspectos: desenvolvimento de tecnologia de fermentação e de sistemas de dispersão do antagonista, desenvolvimento de modelos computadorizados para o entendimento dos efeitos do microambiente sobre a sobrevivência e proliferação de antagonista no

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biocontrole de Doenças de Plantas, na casa de vegetação e no campo experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP (Piracicaba, SP.) no período de junho/86 a outubro/88.

Também, no Departamento de Fitopatologia foram conduzidos alguns bioensaios em condições de casa de vegetação.

#### 3.1. Origem da cultivar e híbrido de berinjela usados

Para os experimentos realizados em casa de vegetação foram empregadas a introdução RV-III (moderadamente resistente à *Verticillium* spp.) e o híbrido F<sub>100</sub> (suscetível ao patógeno) que é produto de cruzamentos entre as cultivares Florida Market e Campineira. A introdução RV-III é proveniente do Canadá e foi multiplicada na Estação Experimental da Agroceres, em Betim - MG.

#### 3.2. Isolados de *V. dahliae*

Utilizaram-se três isolados de *V. dahliae*,

sendo IM<sub>1</sub> (procedente de Piracicaba, SP.), IM<sub>2</sub> (procedente de Campinas, SP.) e IM<sub>3</sub> (procedente de Betim, MG.), onde berinjela foi o hospedeiro comum.

### 3.3. Meios de cultura e soluções utilizadas

#### 3.3.1. Meio de ágar-água

ágar . . . . .	20,0 g
sulfato de estreptomicina . . .	25 µg
água destilada . . . . .	1000 ml

#### 3.3.2. Meio de aveia

aveia . . . . .	60,0 g
ágar . . . . .	18,0 g
água destilada . . . . .	1000 ml

#### 3.3.3. Meio de extrato de malte

malte . . . . .	20,0 g
ágar . . . . .	20,0 g
dextrose . . . . .	20,0 g
peptona . . . . .	10,0 g
água destilada . . . . .	1000 ml

#### 3.3.4. Meio de BDA

batata . . . . .	200,0 g
dextrose . . . . .	20,0 g
ágar . . . . .	20,0 g
água destilada . . . . .	1000 ml

3.3.5. Meio de Martín (MARTIN, 1950) modificado para *Trichoderma* (HOMECHIN, 1987).

Ágar . . . . .	20,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0,5 g
Peptona . . . . .	5,0 g
Dextrose . . . . .	10,0 g
Rose bengal . . . . .	0,033g*
Agrimicin 100 . . . . .	0,18 g*
PCNB . . . . .	0,20 g *
Água . . . . .	1000 ml

\* modificações introduzidas

3.3.6. Solução salina (0,85%)

Cloreto de sódio . . . . .	8,5 g
água destilada . . . . .	1000 ml

3.3.7. Solução nutritiva completa (SARRUGE, 1975)

Soluções estoques	Quantidade(/litro)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	1 ml
$\text{KNO}_3$ . . . . .	5 ml
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . . . . .	5 ml
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	2 ml
Micronutrientes. . . . .	1 ml
$\text{H}_3\text{BO}_3$ . . . . .	2,86 g

MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O . . . . .	1,81 g
ZnCl <sub>2</sub> . . . . .	0,10 g
CuCl <sub>2</sub> . . . . .	0,04 g
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O . . . . .	0,02 g
FeEDTA . . . . .	1 ml.

### 3.4. Isolamentos de *V. dahliae*

Plantas de berinjela com sintomas típicos de murcha foram cortadas em pedaços de aproximadamente 5 cm sendo primeiramente, flambados e então, submetidos a uma assepsia superficial com solução de hipoclorito de sódio à 2% (2 água:1 hipoclorito) durante aproximadamente 3 minutos. Em seguida, o material foi lavado em água destilada esterilizada, por 3 vezes consecutivas, e fez-se então, a excisão da casca.

Com auxílio de uma lâmina foram extraídos pequenos fragmentos de tecido do caule e transferidos para placas de Petri contendo agar-água.

As placas de Petri com os fragmentos de tecido foram levadas para incubação no escuro, em 26-27°C e as colônias obtidas foram repicadas em placas de Petri, contendo meio de aveia. As culturas de *V. dahliae* foram posteriormente transferidas para frascos contendo água destilada esterilizada a 10°C, conforme proposto por CASTELLANI (1937).

### 3.5. Preparo do inóculo de *V. dahliae*

3.5.1. Para aqueles experimentos realizados em laboratório, o inóculo foi sempre multiplicado em placas de Petri (90 mm) contendo 30 ml de meio de aveia. A partir do estoque, retirou-se uma alíquota da suspensão de conídios e depois transferiu-se para placas contendo meio de aveia. Com auxílio de alça de Drigalsk o inóculo foi regularmente espalhado na superfície do meio. As placas foram vedadas com uma camada de plástico fino e em seguida, levadas para câmara de incubação a  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 10-12 dias.

Discos de meio de cultura contendo micélio e conídios foram extirpados do meio através de um cortador de metal com diâmetro de 1 cm.

3.5.2. Para aqueles experimentos que exigiram maior quantidade de inóculo, empregou-se o milho pipoca como substrato:

A. Frascos com capacidade para 500 ml tiveram 1/3 de seu volume ocupado com milho pipoca, juntando-se água destilada até 1,0 cm além do nível do milho. Os frascos foram autoclavados durante 60 minutos, à  $120^{\circ}\text{C}$ . Alíquotas da suspensão de conídios foram transferidas para os frascos. A incubação ocorreu no escuro, a  $25 - 26^{\circ}\text{C}$ , durante 30 dias. Feito isto, efetuou-se a avaliação da concentração de conídios com auxílio de um hemacitômetro, após a filtração do fungo em quatro

camadas de gase. A seguir, adicionou-se água de torneira para ajustar até a concentração desejada.

B. Sacos de polipropileno (30 x 25 cm), contendo 300 ml de milho pipoca acrescidos com 200 ml de água destilada autoclavados por 60 minutos, a 120°C, receberam através de uma seringa plástica de 20 ml, uma suspensão de 5 ml de conídios proveniente do estoque de fundos. A concentração de  $10^4$  conídios/ml foi determinada através da câmara de Newbayer, após a suspensão de conídios ter sido filtrada em quatro camadas de gase.

### 3.6. Isolados de *Trichoderma* spp.

Foram testados 47 isolados de diferentes espécies de *Trichoderma*, procedentes de várias regiões do Brasil para determinar sua capacidade de antagonizar *V. dahliae*.

Estes isolados foram estocados conforme o método proposto por CASTELLANI (1937).

A Tabela 1 mostra a relação dos isolados de várias espécies de *Trichoderma* empregados nos ensaios.

### 3.7. Preparo do inóculo de *Trichoderma* spp.

3.7.1. Para os testes realizados em condições de laboratório, discos de meio de agar contendo micélio e conídios (discos de a.m.c.), armazenados em frascos com água destilada esterilizada foram transferidos para placas de Petri contendo meio de aveia e incubados por três dias em temperatura ambiente, sob regime de luz constante. O inóculo a ser repicado foi retirado, preferencialmente das bordas da colônia

Tabela 1 - Isolados de *Trichoderma* spp. empregados nos testes de antagonismo

Isolados	Procedência	Tipo cultura
Tw5	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
Tw6	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
Tw8	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
Tw10	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
Tw11	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
Tw14	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
Tw16	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
CNP17	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
CNP47	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
CNP311A	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
CNP424	Cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR)	-
TC11	Piracicaba (SP)	-
TAP	Piracicaba (SP)	-
T32	Piracicaba (SP)	-
T218	Piracicaba (SP)	-
T329	Piracicaba (SP)	-
T362	Piracicaba (SP)	-
T410	Piracicaba (SP)	-
FY413	Mutante-Biobrãs (MG)	Mutante celulolítico
Tal-1	Mogi-das-Cruzes (SP)	Alface
Tal-3	Mogi-das-Cruzes (SP)	Alface
Tal-4	Mogi-das-Cruzes (SP)	Alface
Tal-5	Mogi-das-Cruzes (SP)	Alface
Tal-6	Mogi-das-Cruzes (SP)	Alface
Tal-8	Mogi-das-Cruzes (SP)	Alface
Tal-9	Mogi-das-Cruzes (SP)	Alface
Tal-10	Mogi-das-Cruzes (SP)	Alface
H-1	Piracicaba (SP)	Berinjela
D-1	Anhembi (SP)	Pimentão
D-7	Anhembi (SP)	Pimentão
Ti	-	-
T2P	Cedido p/ Departº Micologia da U.F.P.- Recife	
T4P	Cedido p/ Departº Micologia da U.F.P.- Recife	
T10P	Cedido p/ Departº Micologia da U.F.P.- Recife	
T15P	Cedidp p/ Departº Micologia da U.F.P.- Recife	
T17P	Cedido p/ Departº Micologia da U.F.P.- Recife	
TIV	-	-
TV	-	-
TVII	-	-
TBII	-	-
TBIII	-	-
TRIP	-	-
TC	-	-
TH15	-	-
MII	-	-
TISE	-	-
IG-9 ( <i>T. viride</i> )	Piracicaba (SP)	Berinjela

através de um cortador de metal com 1 cm de diâmetro. Este procedimento padrão serviu a todos os testes.

**3.7.2.** Para os testes realizados em condições de casa de vegetação e de campo empregou-se milho pipoca como substrato para desenvolvimento de *Trichoderma* spp. A metodologia foi basicamente a mesma descrita para *V. dahliae* conforme mostra o item 3.5.2.B, mudando-se apenas a técnica de repicagem do fungo, que ao invés da injeção de suspensão de conídios, abriu-se os sacos de polipropileno e adicionou-se 6 discos de agar contendo micélio e conídios que cresceram conforme as condições descritas acima. Este material, em seguida, foi incubado na presença de luz fluorescente à temperatura ambiente, durante 14 dias.

**3.7.3.** Grãos de arroz empalhados foram também usados como substrato, preparados conforme metodologia descrita acima, naqueles experimentos onde foi avaliada a influência de *Trichoderma* spp. na germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas

### 3.8. Preparo de mudas de berinjela

Sementes do híbrido F<sub>100</sub> e da cultivar RV-III foram, separadamente, colocadas em um becker (1000 ml) com

aproximadamente 800 ml de água de torneira, para selecionar as sementes viáveis (fundo) das sementes inviáveis (superfície). Em seguida, efetuou-se a assepsia superficial das sementes com hipoclorito de sódio a 1% (1 hipoclorito:5 água destilada esterilizada) por 3 minutos.

As sementes foram lavadas por 3 vezes e colocadas para secar à temperatura ambiente, sobre papel de filtro.

A semeadura foi feita em caixas de isopor (Plantâgio) contendo a seguinte mistura: 1 solo:1 areia:1 es-  
terço.

As adubações foram feitas com solução nutritiva completa e também com solução de sulfato de amônia (1:10) durante a fase de desenvolvimento das plântulas.

As mudas foram transplantadas tanto para os vasos como para o campo, com 15-20 cm de comprimento.

Em todos os experimentos de casa de vegetação empregou-se F100 e RV-III, entretanto, o ensaio de campo foi executado somente com o híbrido.

### 3.9. Critérios de avaliação

3.9.1. Para os testes de antagonismo em confrontação direta, a porcentagem de colonização de *Trichoderma* spp. foi determinada segundo o critério de CAMPOROTA (1985), sendo:

$$\% C = \frac{DT \times 100}{DE} \quad \text{onde,}$$

DT = é a distância (cm) percorrida sobre o eixo que liga os dois explantes e,

DE = é a distância que separa os dois explantes (aproximadamente 4,0 cm).

3.9.2. Para os testes realizados em condições de casa de vegetação a reação do hospedeiro foi avaliada pela frequência de plantas infectadas, observando-se os sintomas externos (murcha e amarelecimento de folhas) e internos (escurecimento dos vasos).

### 3.10. Experimento 1: Testes de laboratório com *Trichoderma* spp. x *V. dahliae*

#### 3.10.1. Seleção de isolados com potencial para o controle de *V. dahliae*

Os 47 isolados de *Trichoderma* spp. da Tabela 1 foram testados contra o isolado IM<sub>2</sub> através do teste de culturas pareadas, conforme BELL *et alii* (1982), onde discos de a.m.c. de *V. dahliae*, foram colocados em placas de Petri (90 mm) com BDA, a uma distância de aproximadamente 2,0 cm de seus bordos.

Esse material foi incubado durante 10 dias em temperatura ambiente, na ausência de luz até que as co-

lônias atingissem o tamanho médio de 4,0 cm de diâmetro.

A seguir, foi feita a repicagem de *Trichoderma* spp. nas placas em posição oposta à colônia do patógeno e assim, as colônias foram incubadas durante 5 dias, na presença de luz fluorescente à temperatura ambiente.

As avaliações foram feitas baseando-se no critério de BELL *et alii* (1982), onde usou-se uma escala de notas variando de 1 a 5, na qual: o valor 1 foi atribuído quando *Trichoderma* sp. invadiu completamente o patógeno e colonizou todo o substrato; 2, quando o antagonista invadiu pelos menos 2/3 da superfície do meio; 3, quando o antagonista e o patógeno colonizaram ambos a metade da superfície do meio; 4, o patógeno colonizou no mínimo 2/3 da superfície do meio e este parece se opor ao antagonista; e finalmente, o valor 5, quando o patógeno invadiu completamente o antagonista e ocupou toda a superfície do meio.

Cada tratamento teve 3 repetições e o delineamento usado foi inteiramente casualizado.

Os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados a partir deste teste, foram aqueles que receberam nota 1 e em alguns casos, os que receberam nota 2.

### 3.10.2. Teste de antagonismo em confrontação direta

Dentre os isolados de *Trichoderma* spp. selecionou-se 20 isolados, os quais apresentaram os melhores resultados de acordo com o critério de notas desenvolvido por BELL *et alii* (1982). Esses antagonistas selecionados foram taxonomicamente classificados pelo Departamento de Micologia, da Universidade Federal de Pernambuco e a partir daqui, empregados na maioria dos testes. Sendo eles: *T. viride* Pers. ex S.F. Gray (Tal-1, T15P); *T. aureo-viride* Rifai (Tal-4, Tal-6, Tal-9, Tal-10, Tw16, TH15, T410, T218); *T. koningii* (Tw6; CNP311A); *T. pseudokoningii* Rifai (Tw14; TV; T15E; T1V; T10P); *T. harzianum* Rifai (CNP17; TC11; Tw5).

A metodologia descrita aqui corresponde basicamente a mesma empregada anteriormente, substituindo-se apenas o meio de cultura BDA pelo meio de extrato de malte (pH 6,0).

O critério de avaliação usado aqui foi descrito no item 3.9.1. e o período de crescimento de *Trichoderma* em placas de Petri foi de 3 dias, no escuro, a 27°C.

O procedimento estatístico obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os tratamentos constaram de culturas pareadas de 20 isolados de *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*, além do controle com o antagonista na ausência do patógeno e também, do controle com apenas *V. dahliae*.

### 3.10.3. Teste de antibiose

Este método consiste em se cobrir assepticamente a superfície do meio de extrato de malte (pH 6,5) com discos de papel celofane (9,0 cm de diâmetro). A seguir, discos de agar contendo micélios e conídios de *Trichoderma* spp. foram colocados no centro, sobre a superfície do papel celofane (DENNIS & WEBSTER, 1971a).

As colônias foram então, incubadas por 48 horas, à temperatura ambiente, na presença de luz fluorescente contínua.

Em seguida, efetuaram-se medições do diâmetro médio das colônias e finalmente, retirou-se o papel celofane juntamente com a colônia do antagonista.

As placas foram invertidas e receberam 30 ml de clorofórmio cada, na sua parte inferior. A posição original das placas foi recuperada após a evaporação total do produto. A seguir, adicionou-se uma alíquota de 1 ml de uma suspensão de conídios de *V. dahliae* sobre o meio, espalhando uniformemente o inóculo com auxílio de uma alça de Drigalsk. As placas foram levadas para câmara de incubação a 25°C, na ausência de luz.

As avaliações foram tomadas através do diâmetro médio do halo formado, após 3 dias, pois conforme DENNIS *et alii* (1970a) as substâncias voláteis podem se perder com

períodos mais longos de exposição.

Cada placa de Petri (90 mm) conteve rigorosamente 30 ml de meio de extrato no seu conteúdo, em todos os ensaios que usou-se o referido meio.

Além do mais, estes testes foram repetidos com os três isolados de *V. dahliae* (IM<sub>1</sub>; IM<sub>2</sub>; IM<sub>3</sub>) e o delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado, com 3 repetições. Este teste foi repetido duas vezes no tempo.

#### 3.10.4. Estudo sobre interação de hifas de *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*

*V. dahliae* cresceu em meio de BDA e em meio de extrato de malte o tempo suficiente para ocupar uma parte da lâmina de vidro que fora disposta anteriormente na posição frontal do inóculo. As colônias foram incubadas a 25-26°C, na ausência de luz, durante 8-10 dias.

A seguir, semeou-se um disco de (a.m.c.) do antagonista na placa e, assim que ocorreu o encontro das hifas sobre a lâmina, estas foram retiradas e coradas com lactofenol, disposto antecipadamente sobre a lâmina, para efetuar as observações microscópicas.

Os isolados de *Trichoderma* spp. usados foram Tw6; CNP311-A; Tal-1; T15P; Tw16; TC11; CNP-17; Tal-6; Tal-9; T15E para IM<sub>1</sub>. Entretanto, para IM<sub>2</sub> apenas T1V e para IM<sub>3</sub>: TH15, TV; Tal-1; Tw5; T410; Tal-9; Tal-10; Tw6; Tw16; T218.

### 3.10.5. Influência de pH e temperatura no crescimento e na produção de metabólitos de *T. konin-gii* e *T. viride*

Foram empregados quatro isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram os melhores resultados nos testes antibiose (item 3.10.3) devido ao maior tamanho dos halos de inibição: (CNP311A, Tw6) e *T. viride* (Tal-1 e T15P).

A metodologia usada foi a mesma descrita anteriormente no item 3.10.3, ou seja, a técnica do papel celofane proposta por DENNIS & WEBSTER, 1971a).

Para tanto foram empregados três níveis de pH: 4,5; 5,5 e 6,5 em cinco diferentes temperaturas: 13°, 18°, 23°, 28° e 32° ± 1°C e o isolado IM1 de *V. dahliae* na concentração de 10<sup>4</sup> conídios/ml.

Após a semeadura do antagonista nas placas de Petri, as colônias foram incubadas nas referidas temperaturas em estufa NK SYSTEM, na ausência de luz. Após o período de incubação de *Trichoderma* spp. (48 horas), as colônias foram retiradas das placas de Petri e adicionou-se 0,12 ml da suspensão de conídios de *V. dahliae* IM<sub>1</sub> (10<sup>4</sup> conídios/ml) sobre o meio.

As avaliações foram feitas através da tomada

do diâmetro médio das colônias de *Trichoderma* spp. antes da retirada da membrana de celofane, e também, através do diâmetro médio do halo produzido.

O delineamento usado foi inteiramente casualizado com 3 repetições. Este teste foi repetido duas vezes no tempo.

### 3.10.6. Efeito de metabólitos voláteis no crescimento de *V. dahliae*

Para testar o efeito de metabólitos voláteis de *T. viride* (Tal-1; T15P) e *T. koningii* (CNP311A, Tw6) sobre o crescimento de *V. dahliae* (IM<sub>1</sub>), posicionou-se tampas de placas de Petri (90 mm) umas sobre as outras, após se ter vertido meio de extrato de malte em cada uma delas. Assim, na extremidade inferior semeou-se o antagonista e na outra, o patógeno, ambos na forma de disco de a.m.c. As tampas foram vedadas lateralmente com uma membrana plástica e em seguida, esse material foi incubado em temperatura ambiente sob luz fluorescente contínua.

A testemunha recebeu um disco de micélio de *V. dahliae* na extremidade inferior e outro na extremidade superior da placa.

As avaliações foram feitas após 7 dias de crescimento dos fungos, onde foram tomadas medidas do diâmetro médio da colônia de *V. dahliae*.

O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com 4 repetições.

Este teste foi repetido duas vezes no tempo.

### 3.10.7. Teste de competição de isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura

O objetivo deste bioensaio foi verificar se ocorre inibição do crescimento das colônias quando dois isolados de *Trichoderma* spp. ocupam o mesmo substrato.

*T. koningii* (CNP311A, Tw16) e *T. viride* (T15P e Tal-1) foram arranjadas em forma dialética e a metodologia usada foi a seguinte: placas de Petri (90 mm) com aproximadamente 30 ml de meio de extrato de malte (pH = 6,0) tiveram dois discos de a.m.c. dispostos em posição oposta um ao outro, separados 4,5 cm entre si.

O material foi incubado durante 96 horas, no escuro, a 27°C.

Os tratamentos foram comparados com o controle, o qual cresceu isoladamente em placa de Petri, correspondendo a cada isolado separadamente. Cada tratamento foi repetido 4 vezes.

As medidas do raio de crescimento foram tomadas após o confronto das colônias em intervalos de 24 horas, totalizando quatro avaliações.

### 3.10.8. Teste de auto inibição por metabólitos de *Trichoderma* spp.

O objetivo deste bioensaio foi complementar o teste descrito anteriormente (item 3.10.7) e detectar boas combinações de isolados para emprego de misturas de isolados em testes posteriores em condições de casa de vegetação.

Para tanto foram feitas combinações dialélicas entre *T.koningii* (CNP311A; Tw6) e *T. viride* (Tal-1; T15P) em placas de Petri contendo meio de extrato de malte (30 ml) cobertas assepticamente com papel celofane. Em cada placa foi colocado um disco de micélio na posição central e, incubou-se as colônias durante 48 horas, no escuro, a uma temperatura de 27°C. O pH do meio de cultura foi de 6,5.

A seguir, retirou-se a membrana de celofane juntamente com a colônia de *Trichoderma* spp. e, outro disco de micélio de *Trichoderma* spp. foi colocado novamente, no centro de cada placa. Esse material foi novamente incubado nas mesmas condições descritas anteriormente.

As avaliações foram feitas através da tomada do diâmetro médio da colônia que cresceu no meio acrescido com metabólitos de *Trichoderma* spp. após 3 dias.

Os tratamentos corresponderam a todas as combinações possíveis entre os quatro isolados, inclusive combinações de metabólitos e crescimento de colônias com seus próprios isolados.

O delineamento empregado foi em blocos casualizados com quatro repetições.

### 3.11. Experimento 11: Interação entre *Trichoderma* spp. e *V. dahliae* em condições de casa de vegetação

#### 3.11.1. Teste de antagonismo I: Infestação do solo com *V. dahliae* anterior a *Trichoderma* spp.

Vasos plásticos com capacidade para 5 kg de solo tiveram seu volume ocupado com uma mistura contendo 2:1 de solo e esterco, anteriormente, autoclavada por 60 minutos (120°C). O inóculo (IM<sub>1</sub> e IM<sub>3</sub>) foi misturado ao substrato previamente umedecido. A cada 30 kg de substrato (mistura de solo) foram empregados aproximadamente 1000 ml da suspensão de conídios (10<sup>5</sup> conídios/ml), sendo então, manualmente homogeneizado ao solo.

Os isolados de *Trichoderma* spp. usados foram preparados em frascos de vidro (500 ml), os quais continham 300 ml ocupados por torta de filtro Oliver e infestados com 3 discos de micélio e conídio (1,0 cm). A incubação das colônias se deu na presença de luz, em temperatura ambiente, durante 30 dias.

Foram empregados quatro isolados de *Trichoderma* spp.: CNP311A, Tw6 (*T. koningii*) e Tal-1; T15P (*T. viride*) selecionados pelo teste de antibiose (item 3.10.3).

Assim, seguindo a infestação do solo com IM<sub>1</sub> e também com IM<sub>3</sub> separadamente efetuou-se outra infestação, porém, empregando-se 300 ml de torta de filtro Oliver pré-colonizada com *Trichoderma* spp. Adicionaram-se também 100 ml de melação a 2% ao solo nos vasos.

Finalmente, efetuou-se o transplante das mudas de berinjela, sendo 4 plantas por vaso.

As irrigações foram feitas diariamente.

A temperatura média em condições de casa de vegetação foi 24°C no período de julho a setembro/87.

As avaliações foram iniciadas a partir do 30º dia após o transplante das mudas e foram feitas através da contagem do número de plantas com sintoma de murcha verticilar.

O delineamento usado foi em blocos ao acaso, com 4 repetições e os tratamentos usados foram *Trichoderma* spp. x *V. dahliae*, controle com *V. dahliae*, controle com *Trichoderma* spp. e o tratamento em branco.

Fez-se necessária a aplicação do inseticida CARTAP no ensaio, devido ao aparecimento de moscas minadoras (*Liriomyza* sp.) nas folhas.

Visando complementar este estudo, foram feitos isolamentos do solo para verificar a sobrevivência de *Trichoderma* spp., após 72 dias da infestação do solo com os antagonistas.

### 3.11.2. Teste de antagonismo II: Infestação do solo com *V. dahliae* posterior a *Trichoderma* spp.

Neste caso, usaram-se vasos plásticos (5 kg) contendo 3 camadas diferentes de substrato, sendo a primeira camada constituída de areia + torta de filtro Oliver pré-colonizada com *Trichoderma*, na relação 1:2; a segunda de solo + torta de filtro Oliver e, por último, areia novamente. Frascos de 500 ml contendo torta de filtro pré-colonizada com *Trichoderma* foram usados em cada vaso, além da adição de 20 ml de melação a 2 %. O preparo do inóculo do antagonista foi exatamente como descrito anteriormente, alterando-se apenas a sua quantidade sendo usado neste último 400 ml em cada vaso. A análise do solo encontra-se na Tabela 10 (Apêndice).

A infestação do solo dos vasos com o patógeno somente foi feita no 14º dia após o transplante das mudas, onde foram empregados 20 ml de inóculo ( $4,5 \times 10^5$  conídios/ml) por planta, de cada isolado de *V. dahliae* (IM<sub>1</sub> e IM<sub>3</sub>), que cresceram em milho pipoca (item 3.5.2.A).

Trinta dias após a infestação do solo com os isolados de *Trichoderma* spp., adicionou-se mais 200 ml de torta de filtro (pré colonizada com o antagonista + melação a 2%).

O delineamento experimental usado foi em blocos ao acaso com 5 repetições. Além dos tratamentos com *Trichoderma*

*choderma* spp. x *V. dahliae*, das testemunhas usando apenas o patógeno ou apenas o antagonista, usou-se também o tratam<sup>o</sup> químico com benomyl (35g/100 ml de água + TWEEN 80 à 3%) no 7º dia após a inoculação com os isolados (M<sub>1</sub> e IM<sub>3</sub>). O tratamento em branco foi usado para comparações com os outros tratamentos. Cada parcela experimental (vaso) teve 4 plantas.

As avaliações foram iniciadas a partir do 30º dia, após a infestação do solo com o patógeno, através da contagem do número de plantas com sintomas típicos de murcha.

Os isolados de *Trichoderma* usados foram: Tw6, CNP311A (*T. koningii*), T15P, Tal-1 (*T. viride*).

Este ensaio foi executado no período de agosto a novembro/87. Nesta fase a temperatura média foi de 28°C.

As irrigações foram feitas diariamente com água de torneira.

Fez-se necessária algumas aplicações do acaricida NEORON.

Visando a complementação deste estudo, foram feitos isolamentos do solo, para verificar a sobrevivência das populações de *Trichoderma* spp., após um período de 75 dias.

### 3.11.3. Teste de antagonismo III: Infestação simultânea do solo com *V. dahliae* e *Trichoderma* spp.

Os antagonistas testados foram: *T. harzianum*

(TCII, CNP17), *T. koningii* (CNP311A, Tw6) e *T. viride* (Tal-1, T15P), sendo estes os isolados que melhores resultados apresentaram no teste de antibiose (3.10.3).

O isolado mais patogênico de *V. dahliae* (IM<sub>1</sub>) foi reisolado de plantas doentes e usado aqui neste teste.

Após a preparação do substrato - milho pipoca, (item 3.5.2.B) foram injectados 5ml de uma suspensão de conídios ( $10^4$  conídios/ml) através de uma seringa plástica (com capacidade para 20 ml), perfurando os sacos de polipropileno na sua parte superior, com a agulha. O substrato foi homogeneizado e incubado durante 7 dias, à 26°C, no escuro. Em seguida, os sacos de polipropileno foram novamente abertos na sua extremidade superior, em ambiente asséptico, e receberam 6 discos de a.m.c. de *Trichoderma* spp., além da adição de 5 ml de água destilada esterilizada nesse recipiente, para manter a umidade.

O material após 15 dias de incubação, no escuro, a 28°C, foi preparado para a segunda fase do ensaio, onde os sacos de polipropileno foram abertos e seu conteúdo depositado em baldes (15 litros) e homogeneizado manualmente. Isto foi feito separadamente, para cada tratamento.

Vasos plásticos com capacidade para 2kg tiveram 2/3 de seu conteúdo ocupado com uma mistura de terra+areia+esterco em partes iguais. Em seguida, adicionaram-se 100 ml de inóculo em

cada vaso e cobriu-se novamente, com a mistura de terra e efetuou-se o transplante das mudas de berinjela RVIII e F100 para os vasos. A análise do solo está na Tabela 10 (Apêndice).

O delineamento usado foi em blocos ao acaso com nove repetições por tratamento. Os tratamentos foram *Trichoderma* spp. x *V. dahliae*, testemunha com apenas o patógeno e o tratamento em branco. Cada vaso teve 4 plantas, sendo 36 plantas no total por tratamento.

As avaliações iniciaram-se 30 dias após o transplante das mudas, através da contagem do número de plantas com sintomas típicos de murcha.

Este ensaio foi instalado no período de junho a setembro/88 e a temperatura média foi de 21°C.

### 3.12. Experimento III: Influência de *T. koningii* e *T. viride* na germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas de berinjela

Vasos plásticos com capacidade para 1 kg tiveram metade do seu volume ocupado com uma mistura de solo + areia + esterco. Em seguida, foram acrescentados 100 ml de substrato colonizado com *Trichoderma* spp. em cada vaso, preparado conforme o item 3.7.3., com exceção do controle que recebeu o substrato sem o fungo. O inóculo nos vasos foi coberto com mais 300 ml da mistura de solo

e efetuou-se no dia seguinte a semeadura de berinjela (20 sementes/vaso). O preparo das sementes foi descrito no item 3.8. As sementes foram cobertas com uma fina camada da mistura de solo. A análise do solo está na Tabela 10 (Apêndice).

Além dos isolados de *Trichoderma* usados separadamente, sendo Tw6, CNP311A, Ta1-1 e T15P, foi usada uma mistura dos isolados de *T. viride* (Ta1-1 + T15P) que melhores resultados apresentaram nos testes de competição de *Trichoderma* spp. em meio de cultura e no teste de auto inibição por metabólitos de *T. viride* e *T. koningii* (itens 3.10.7 e 3.10.8, respectivamente). O ensaio foi instalado em telado usando dois tipos de solo: autoclavado durante 90 minutos, a 120°C e solo natural.

O delineamento experimental aqui empregado foi em blocos ao acaso arranjado em parcelas subdivididas, com 6 repetições/tratamento, onde as parcelas foram as sementes de berinjela (F100 e RV111) e as subparcelas de isolados de *Trichoderma* spp.

As avaliações foram feitas 6 dias após a semeadura de berinjela, em intervalos regulares de 2 dias, através da contagem do número de plântulas. Após a 5.<sup>a</sup> avaliação, efetuou-se o desbaste das plântulas, restando apenas uma plântula/vaso para que, posteriormente, fossem tomadas medidas de altura e peso da matéria seca (apenas parte aérea), no intuito de avaliar a influência desses antagonistas no desenvolvimento de plantas.

As avaliações de altura e de peso seco de plantas foram efetuadas com 43 dias após a semeadura de berinjela.

Este ensaio foi executado de março a abril/88 e a temperatura média foi de 31°C.

Foi feita uma aplicação com solução nutritiva completa na proporção de 70 ml de solução/vaso, após o desbaste das mudas nos vasos.

Os estudos da sobrevivência de populações dos antagonistas, aqui empregados, foram feitos através de isolamentos de solo dos vasos, conforme fora descrito no item posterior (item 3.13.2).

### 3.13. Experimento IV: sobrevivência de *T. koningii* e *T. viride*

#### 3.13.1. Na rizosfera de berinjela

Para o teste de antagonismo (itens 3.11.1 e 2) as plantas foram retiradas dos vasos e a parte de solo agregada as raízes foi depositada em outros recipientes. O material foi coletado de todos os vasos e o conjunto das sub amostras (4 e 5, respectivamente) foi misturado e homogeneizado manualmente. Esta coleta de solo foi feita para cada isolado de *Trichoderma* spp., separadamente.

O solo foi colocado para secar à sombra durante 72 horas e em seguida peneirado.

Após a preparação do solo, retiraram-se 10 gramas de solo, que foram suspensos em 90 ml de água destilada mais ágar a 2% (esterilizados). Após agitação manual, foram feitas diluições em série até a diluição  $10^{-3}$  confídios/g de solo.

Placas de Petri (90mm) contendo aproximadamente 20 ml de meio de Martin modificado para *Trichoderma* sp. (HOMECHIN, 1987) tiveram uma alíquota (0,12ml) da diluição<sup>3</sup> regularmente distribuída sobre a superfície do meio, através de alça de Drigalsk.

Em seguida, levou-se este material para câmara incubadora, a uma temperatura de 27°C, durante 5 dias, na ausência de luz. Avaliou-se o número de unidades formadoras de colonias.

### 3.13.2. No solo

Este estudo teve início com a montagem do teste de influência de *T. koningii* e *T. viride* na germinação de sementes e desenvolvimento de plantas, conforme metodologia descrita no ítem 3.13.

Foram retiradas de 70 a 90 gramas de solo de cada vaso escolhidos aleatoriamente em três vasos por tratamento. Esta amostragem foi feita apenas nos vasos que continham o híbrido de berinjela (F100).

Após a secagem das amostras à temperatura ambiente e à sombra, estas foram homogeneizadas e peneiradas.

Em seguida, pesaram-se 10 gramas de solo e adicionou-as em frascos (500 ml), contendo 90 ml de água destilada mais ágar a 2% esterilizado. As diluições usadas foram  $10^{-5}$  e  $10^{-3}$  cfídios/g de solo, sendo estas semeadas, em meio de Martin modificado para *Trichoderma* sp. (HOMECHIN, 1987). O material foi incubado a  $27^{\circ}\text{C}$ , no escuro, durante 5 dias.

O primeiro isolamento foi feito no dia seguinte da infestação do solo com o antagonista, onde o fungo começava a aparecer na superfície do solo dos vasos. A seguir, os isolamentos foram feitos com 10, 37, 79, 145 e 210 dias após a semeadura. A temperatura média foi de  $27^{\circ}\text{C}$

Avaliou-se o número de unidades formadoras de colônias.

O delineamento experimental usado em condições de laboratório foi em blocos ao acaso, com 4 repetições.

### 3.14. Experimento V: Controle biológico em condições naturais de campo

Foram empregados três isolados do antagonista, sendo *T. viride* (Tal-1) ; *T. koningii* (CNP311A) e *T. harzianum* (CNP17); o isolado mais patogênico de *V. dahliae*, IM<sub>1</sub>, e, o híbrido F100 de berinjela.

Na área experimental, as covas com aproximadamente 15 cm de profundidade receberam

30-35 ml de inóculo de *V. dahliae* preparado conforme descrito no item 3.5.2.8. e em seguida, adicionaram-se 300 ml de inóculo do antagonista, preparados conforme consta no item 3.7.2.

As mudas de berinjela foram plantadas a seguir. As irrigações foram feitas diariamente.

O espaçamento entre linhas foi de 1,20 m e dentro de linhas de 40,0 cm.

Foram usados os seguintes tratamentos: *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*, apenas o patógeno e o tratamento em branco sem nenhum dos dois fungos.

As avaliações foram feitas a partir do 53º dia do plantio em intervalos de 7 dias, através da contagem de número de plantas doentes. A última avaliação foi feita no 109º dia.

O delineamento experimental usado foi em blocos ao acaso com 5 repetições e 10 plantas/parcela.

A análise do solo detectou o pH 4,45.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimento 1: Testes de laboratório com *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*

#### 4.1.1. Seleção de isolados com potencial para o controle de *V. dahliae*

Conforme consta na Tabela 2, os isolados de *Trichoderma* aos quais foram atribuídas notas iguais a 1 e com algumas exceções, aqueles que receberam nota 2, foram selecionados para o uso nos demais testes. Esses isolados que receberam nota 2 foram aqueles que produziram metabólitos deixando o meio de BDA com coloração amarela intensa. Assim, foram selecionados 20 isolados, entre eles: *T. viride* (Ta1-1; T15P); *T. koningii* (Tw6; CNP311A); *T. harzianum* (CNP17; TC11; Tw5); *T. pseudokoningii* (Tw14; TV; TISE; TIV; T10P) e *T. aureo-viride* (Ta1-9; Ta1-6; TH-15; Ta1-4; Ta1-10; Tw16; T410; T218). O isolado TIV não foi testado neste estudo. A maioria dos antagonistas cresceu sobre as colônias de *V. dahliae* e posteriormente, esporulou abundantemente sobre o fungo hospedeiro. Embora não tivesse quantificado, este fato coincide com o relatado por BOOSALIS (1964), onde determinados hospedeiros podem es-

Tabela 2 - Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial para o controle de *V. dahliae*

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Notas <sup>1</sup>	Isolados de <i>Trichoderma</i>	Notas
Tw16	1*	Tw5	1*
Tw11	2	T362	2
Tw6	1*	T410	2*
TC11	1*	T10P	2*
M11	2	Tw14	1*
CNP17	1*	TAP	3
Tw8	2	CNP424	2
T15E	1*	Ta16	2*
IG-9	3	T17P	2
Tw10	2	T329	2
CNP311A	1*	TC	3
CNP47	2	TH15	1*
T15P	1*	Ta1-9	1*
TRIP	2	D-1	2
T32	2	Ti	2
T2P	2	Ta1-1	1*
Ta1-5	2	Ta1-8	3
H-1	3	TAP	3
T218	1*	TB111	3
FY413	3	TB11	2
Ta1-3	2	TIV	1*
D-7	2	TV	1*
Ta1-10	1*	TV11	3
		Ta1-4	1*

<sup>1</sup> Valores médios de notas de 3 repetições de acordo com o critério de BELL *et alii* (1982)

\* Seleção de isolados de *Trichoderma* spp.

timular a reprodução sexual de seus parasitas.

#### 4.1.2. Teste de antagonismo com confrontação direta e antibiose

A análise de variância do teste de antagonismo em confrontação direta apresentada na Tabela 1 do Apêndice, detectou pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos, ao nível de 1% de probabilidade. Os dados foram analisados individualmente para cada isolado de *V. dahliae* porque os ensaios foram instalados em épocas distintas.

Pelo teste de Tukey (Tabela 3) verificou-se que, selecionar novamente antagonistas por este método para emprego em condições de campo, já que é impraticável testar todos eles, não poderia ser possível pois, a maioria dos tratamentos não diferiram entre si. A Figura 1 ilustra através de gráfico, o comportamento médio dos antagonistas testados contra os três isolados de *V. dahliae*. As variações entre os micoparasitas seriam de pequena magnitude, pois já havia sido efetuada uma seleção prévia baseada nos mesmos parâmetros desta, diferindo, portanto, o critério de avaliação do teste.

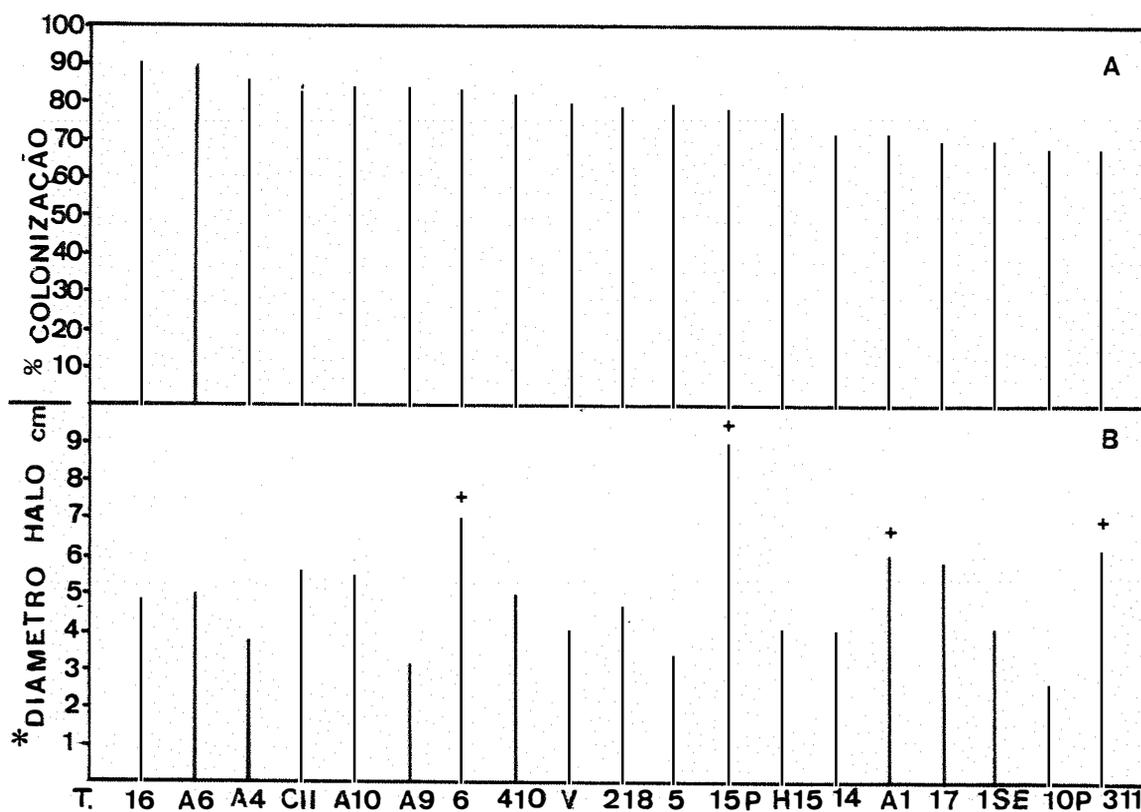
Pode-se observar ainda que o desempenho de *Trichoderma* spp. foi relativamente semelhante em relação a IM<sub>1</sub> e IM<sub>2</sub>. Por exemplo: Tw16, Tal-6, Tal-4, Tal-10, Tal-9, T410, T218, CNP17, TH-15, TV, Tw6, Tw5, T15P apresentaram os melhores resultados quanto à porcentagem de colonização para

Tabela 3 - Teste de antagonismo em confrontação direta entre *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Porcentagem média de colonização <sup>1</sup>		
	IM <sub>1</sub>	IM <sub>2</sub>	IM <sub>3</sub>
Tw16	100,00 a	100,00 a	74,74 bc
Taf-6	94,44 ab	99,24 a	80,61 ab
Taf-4	93,33 abc	96,31 a	69,45 bcd
Taf-1	89,53 abc	57,42 c	69,27 bcd
Taf-10	82,74 abc	91,49 abc	77,98 ab
TISE-	72,70 abc	61,66 bc	69,83 bcd
Taf-9	80,48 abc	91,11 abc	81,96 ab
T410	79,98 abc	87,06 abc	81,51 ab
TH-15	79,39 abc	77,35 abc	77,59 bc
TV	76,67 abc	76,65 abc	87,50 ab
Tw6	75,72 abc	94,08 abc	80,56 ab
T10P	74,53 abc	60,72 abc	60,48 cd
T15P	74,45 abc	84,21 abc	79,20 ab
CNP17	74,40 abc	84,28 abc	53,31 d
T218	73,81 abc	86,86 abc	77,99 ab
Tw5	73,61 abc	83,33 abc	82,30 ab
TC11	72,70 abc	83,25 abc	98,65 a
CNP311A	64,25 bc	65,53 abc	75,63 bc
Tw4	61,33 c	85,16 abc	71,38 bc
TV	-	-	-

<sup>1</sup> Valores originais médios de 3 repetições obtidos através da porcentagem de colonização (%C), segundo CAMPOROTA(1985). Médias de três isolados de *V. dahliae*.

As letras iguais indicam que os contrastes de médias não foram significativos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (D.M.S. = 1,728; 2,112 e 1,054, respectivamente).



Isolados de *Trichoderma* spp.

Figura 1 - Valores médios de 3 isolados de *V. dahliae* (IM<sub>1</sub>, IM<sub>2</sub> e IM<sub>3</sub>) com 3 repetições cada. A) Teste de antagonismo em confrontação direta sendo que as avaliações foram feitas através da porcentagem de colonização (%C) segundo CAMPOROTA (1985). B) Teste de antibiose. Medidas de diâmetro de halo (cm). O sinal (+) representa a seleção de isolados de *Trichoderma*.

os dois isolados testados. Entretanto, em relação a IM<sub>3</sub>, o mesmo não ocorreu, provavelmente, devido aos fatores ambientais, pois, na época em que o ensaio foi instalado, a temperatura ambiente foi relativamente mais baixa do que durante as outras épocas. Não foram realizados testes estatísticos para avaliar o nível de agressividade de isolados de *V. dahliae in vitro*, mas, provavelmente, além dos fatores extrínsecos que colaboraram para que houvesse uma maior variação no comportamento de *Trichoderma* spp. em relação a IM<sub>3</sub>, está o genótipo do organismo. Da mesma maneira, BELL (1982) e CAMPOROTA (1985) encontraram que os isolados de *R. solani* testados diferiram em relação a sua suscetibilidade ao antagonismo de espécies de *Trichoderma*. A diversidade de espécies de fungos é o resultado das mudanças nas populações do hospedeiro, segundo HANSEN (1987).

Quanto ao teste de antibiose verificou-se que a produção de metabólitos tóxicos variou amplamente entre diferentes espécies e dentro de cada espécie de *Trichoderma*. Estes dados confirmam os encontrados por DENNIS & WEBSTER, (1971a).

Esses metabólitos podem ser de natureza voláteis e/ou não voláteis. Principalmente, devido à sua natureza volátil, fez-se necessária a imediata repicagem de *V. dahliae* no meio de cultura.

Os resultados deste ensaio e respectivas mé-

dias encontram-se na Tabela 4 e a análise de variância (Tabela 2 do Apêndice) detectou pelo menos um contraste significativo entre os isolados de *Trichoderma* spp. testados ( $p < 0,05$ ) em relação ao diâmetro médio do halo produzido. A variação entre isolados foi ampla em relação ao diâmetro médio de colônia de *Trichoderma* spp. Também, foi observada uma associação entre diâmetro médio de colônia e diâmetro médio do halo produzido. O isolado T15P (*T. viride*) mostrou-se excelente produtor de antibiótico visto que quando suas colônias apresentavam diâmetro médio de 4,35 cm ocorria a completa inibição de qualquer um dos isolados de *V. dahliae* e, mesmo após passado algum tempo da avaliação (3 dias), o patógeno esteve ausente no meio de cultura. Entretanto, o isolado Tw6 (*T. koningii*) após a avaliação, já mostrava algum desenvolvimento de colônias de *V. dahliae* mesmo no centro do halo de inibição, embora, tivesse apresentado a segunda maior média na maioria dos testes com IM<sub>1</sub> e IM<sub>3</sub> (Tabela 4).

Devido aos mesmos motivos mencionados anteriormente, em relação à inconveniência de se efetuar análise estatística englobando os três isolados de *V. dahliae* contra os 20 isolados de *Trichoderma* spp., partiu-se então, para a análise estatística de cada isolado de *V. dahliae* separadamente.

A partir deste ensaio foi possível detectar os melhores produtores de metabólitos em meio de cultura.

## de colônia e de halo de inibição (cm)

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Testador IM <sub>1</sub>		Testador IM <sub>2</sub>		Testador IM <sub>3</sub>	
	Colônia	Halo	Colônia	Halo	Colônia	Halo
T15P	4,90 i	9,00 a	5,83 g	9,00a	4,35 gh	9,00a
CNP17	7,15 bc	7,02 ab	6,97 cde	6,28 bc	5,58 def	4,03 efg
Tw6	9,00a	7,01 ab	9,00a	6,83 b	8,50a	7,00 b
TC11	6,87 bcd	5,68 bc	7,48 bc	5,80 bcde	6,32 cde	5,16 de
Ta16	6,98 bc	4,55 bcd	7,92 bc	5,40 bcdef	6,85 bc	4,85 def
T410	6,67 bcdef	4,52 bcde	7,32 c	5,67 bcde	6,92 bc	5,22 de
CNP311A	6,62 bcdefg	4,52 bcde	7,28 c	6,78 b	7,68ab	7,25ab
Ta1-1	5,88 efgh	4,45 bcde	6,03 fg	6,70 bc	6,17 cde	6,48 bcd
Ta1-10	6,97 bc	4,42 bcde	7,40 c	5,97 bcd	7,67ab	5,77 bcde
T218	7,15 bc	3,92 cde	8,45	4,67 defgh	6,90 bc	5,52 cde
TV	5,98 bcdefg	3,85 cde	6,15 defg	5,22 cdefgh	5,62 def	4,06 efg
Tw14	5,67 ghi	3,15 cde	5,95 fg	5,21 efghi	4,62 fgh	3,38 fgh
TH15	6,65 bcdef	3,07 cde	6,95 def	4,35 efghi	6,40 cde	4,77 def
TISE	6,82 bcde	2,50 def	6,90 def	3,20 hi	6,35 cde	4,05 efg
Tw16	6,88 bcd	2,40 def	6,90 def	2,98 i	6,88 bc	4,92 def
Ta1-4	6,27 bcdefg	1,92 def	7,07 bc	4,41 efghi	6,62 bcd	5,08 def
T10P	5,30 hi	1,73 def	5,50 g	3,37 hi	4,17 h	2,72 gh
Ta1-9	7,22 b	1,55 def	7,60 bc	3,73 ghi	7,05 bc	5,08 def
Tw5	5,93 defg	1,52 ef	7,30 c	4,00 fghi	6,40 cde	4,58 ef
TIV	5,71 fghi	0,01 f	7,00 cde	0,75 j	5,32 efg	1,68 h

As letras iguais indicam que os contrastes de médias não foram significativos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com D.M.S. = 0,92; 3,01; 1,02; 1,52; 1,13; 2,06, respectivamente.

A Figura 1 ilustra isto, e pode-se verificar que além dos isolados T15P; Tw6; Tal-1 e CNP311A outros isolados, tais como CNP17 e TC11, também se mostraram eficientes, embora não tivessem sido usados em todos os testes.

Para os quatro isolados selecionados para uso nos testes de casa de vegetação (T15P e Tal-1 = *T. viride*; Tw6 e CNP311A = *T. koningii*) empregou-se como parâmetros de seleção, o potencial para produção de metabólitos aliado à velocidade para colonizar o substrato (meio de cultura); e também, o uso de pelo menos dois isolados pertencentes à mesma espécie. A Figura 2 mostra o halo produzido pelo isolado Tal-1.

Desta forma, o antagonista que apresentou melhor capacidade para colonizar o substrato foi Tw6, que também produziu um dos maiores halos de inibição em relação a todos os isolados de *V. dahliae* testados. O outro isolado CNP311A pertencente à mesma espécie (*T. koningii*) apresentou bom comportamento, embora quantitativamente inferior a Tw6, mostrou-se qualitativamente superior em relação a estabilidade de seus metabólitos produzidos. O isolado T15P (*T. viride*) foi por excelência o melhor produtor de metabólitos, embora não tivesse alcançado boa capacidade para colonizar o substrato. Entretanto, este último parâmetro não foi considerado tão importante neste caso, devido ao fato de que o diâmetro do halo de inibição do isolado T15p foi considerado maior que o diâmetro de sua colônia. O outro isolado de *T. viride*



Figura 2 - Teste de antibiose em meio de extrato de malte. Esquerda: *V. dahliae* (controle). Direita: halo de inibição na posição central da placa de Petri formado por *T. viride* (Tal-1), que cresceu durante 48 horas, sobre papel celofane.

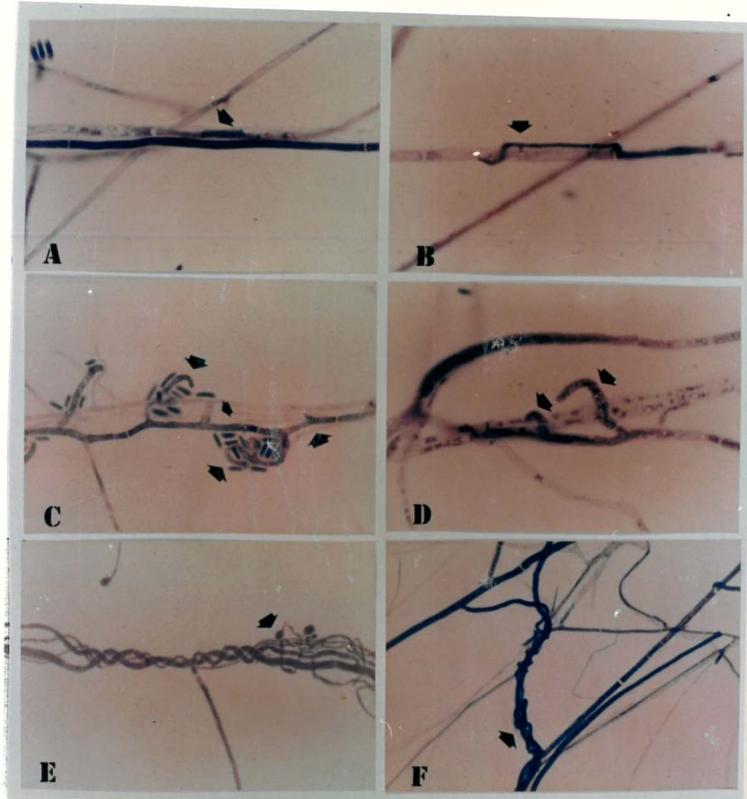


Figura 3 - Interação de hifas de *Trichoderma* spp. (coradas de azul intenso) e *V. dahliae* (coradas de azul brando). A) crescimento em contato íntimo de *T. pseudokoningii* (TIV) e IM<sub>2</sub> (x100), (B) idem ao anterior porém, a ponta da hifa de TIV enrola-se sobre IM<sub>2</sub>; a seta mostra o início da formação de um gancho (x100); (C) crescimento em contato íntimo de *T. aureo-viride* (Tw16) e IM<sub>3</sub>, formação de ganchos e rede (abaixo) de hifas (x100), formação de ganchos por TVI sobre hifas de IM<sub>2</sub> (x100); D) ganchos de *Trichoderma* spp. que se projetam sobre hifas hospedeiras (x 100); E) enrolamento de hifas de *T. koningii* (Tw6), a seta mostra um clamidosporo (x 40); F) enrolamento de hifas de *T. aureo-viride* (T218) sobre IM<sub>3</sub>, a seta mostra parte da hifa de IM<sub>3</sub> (x 40).

Tal-1, pode ser selecionado devido à sua rapidez em colonizar o substrato e também, devido a intensa produção de metabólitos.

Os outros isolados, os quais apresentaram diâmetro médio de colônia acima da média, por outro lado, mostram ineficiente atividade para produção de metabólitos, como por exemplo: Tal-9, TISE, Tw5 e TIV.

#### 4.1.3. Interação de hifas de *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*

Para os estudos de interação entre hifas dos dois fungos foram feitas observações microscópicas através de montagens de lâminas em culturas pareadas (Figura 3). A Tabela 5 esquematiza os tipos de parasitismo que ocorreram entre *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*.

O crescimento paralelo de hifas de *Trichoderma* spp. e *V. dahliae* foi relativamente comum para a maioria dos isolados testados. Desse crescimento, normalmente verificou-se a formação de estruturas semelhantes a ganchos, em direção aos feixes de hifas do hospedeiro (Figura 3-BCD). A formação de estruturas semelhantes as redes de hifas que cercam os conídios de *V. dahliae* (Figura 3-C) foram comuns a muitos antagonistas. A intensiva fragmentação de hifas do hospedeiro foi frequentemente observada. DENNIS & WEBSTER (1971c) observaram que a vacuolação e lise de hifas

Tabela 5 - Estudo sobre interação de hifas de *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Tipos de Parasitismo (IM <sub>3</sub> )					
	Enrolamento	Contato íntimo	Lise	Vacúolos	Rede	Ganchos
Tw6	+	+	+	0	0	0
Tal-10	+	0	0	0	+	0
TH15	0	+	0	0	+	0
Tal-1	0	0	0	0	0	0
TV	0	+	0	0	0	0
T218	+	+	0	0	0	0
Tal-4	0	0	0	0	+	0
Tw5	0	0	0	0	+	0
T410	+	0	0	0	0	+
Tal-9	0	+	0	0	0	+
Tw16	0	+	0	0	+	+
TIV*	+	+	0	0	0	+

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Tipos de Parasitismo (IM <sub>1</sub> )					
	Enrolamento	Contato íntimo	Lise	Vacúolos	Rede	Ganchos
TISE	+	+	+	0	0	+
Tw6	0	+	0	0	+	+
Tal-1	0	+	0	0	+	+
T15P	0	+	+	0	+	+
CNP311A	0	+	0	0	+	+
Tw16	+	+	+	+	+	+
TC11	0	+	+	0	0	+
CNP17	+	0	+	+	0	+
Tal-6	0	+	+	+	0	+
Tal-9	0	+	+	+	0	+

+ Presença de parasitismo

0 Ausência de parasitismo

(\*) Isolado TIV, na presença de hifas de IM<sub>2</sub>

ocorre frequentemente devido à produção de antibióticos por *Trichoderma* sp. Além disto, é possível que o efeito desses antibióticos sobre o hospedeiro seja mais acentuado com o crescimento paralelo das hifas. Verificou-se também alguns enrolamentos de hifas (Figura 3-EF), inclusive enrolamento de hifas do antagonista sem a presença do hospedeiro (Figura 3-E). Entretanto, DENNIS & WEBSTER (1971c) relataram que o enrolamento de hifas de *Trichoderma* sp. ocorre apenas em razão a uma resposta quimiotrópica e não como um casual contato de hifas.

Desta maneira, é possível que espécies de *Trichoderma* obtenham nutrientes das células de seus hospedeiros através da ação de seus metabólitos tóxicos e/ou pela atividade enzimática. As enzimas hidrolíticas produzidas por *Trichoderma* sp. além de degradar hifas de uma gama de fungos patogênicos podem também destruir estruturas de resistência, como esclerócios, que possuem rígidas camadas de melanina (ELAD *et alii*, 1984).

Este estudo foi desenvolvido em dois substratos e em várias épocas. Tanto que o objetivo não foi definitivamente efetuar comparações entre diferentes substratos ou até mesmo sequenciar em etapas o micoparasitismo. O objetivo foi verificar se ocorre ou não a interferência de hifas de *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*. Desta forma, sugere-se a continuidade deste estudo, padronizando o substrato e se-

quenciando os passos que levam ao micoparasitismo de hifas e em microesclerócios de *V. dahliae*, em microscopia eletrônica. De acordo com BOOSALIS (1963) a quantidade e qualidade de nutrientes são fatores importantes na eficiência dos micoparasitas.

#### 4.1.4. Influência de pH e temperatura no crescimento e na produção de metabólitos de *Trichoderma* spp.

Serão discutidos primeiramente, os dados relativos ao crescimento de *T. viride* (Tal-1, T15P) e de *T. koningii* (Tw6 e CNP311A) os quais foram obtidos pelo diâmetro médio de colônia, crescendo sobre membrana de celofane em meio de extrato de malte. Este meio foi usado nos testes de antagonismo e antibiose porque é rico em nutrientes e assim, pode suportar o crescimento dos fungos conjuntamente.

Os resultados deste teste estão na Tabela 3 do Apêndice e a análise de variância detectou pelo menos um contraste significativo entre as temperaturas (13<sup>o</sup>; 18<sup>o</sup> e 23<sup>o</sup>) e entre os isolados (Tal-1 e T15P; Tw6 e CNP311A). A interação significativa ( $p < 0,01$ ) de pH x isolado detectou que existe comportamento diferencial em relação a resposta ao pH frente aos isolados testados. Também, a interação sig-

nificativa ( $p < 0,01$ ) de isolado x temperatura detectou comportamento diferencial de isolados em resposta a diferentes temperaturas.

Embora o teste tenha sido executado em 5 níveis de temperatura ( $13^{\circ}$ ,  $18^{\circ}$ ,  $23^{\circ}$ ,  $28^{\circ}$  e  $32^{\circ}\text{C}$ ), houve necessidade de excluir as temperaturas acima de  $23^{\circ}\text{C}$  para as análises estatísticas porque o isolado Tw6 não apresentou variações no diâmetro médio das colônias em  $28^{\circ}$  e  $32^{\circ}\text{C}$ , nos três níveis de pH. A Figura 4 ilustra o comportamento desses isolados frente aos 5 níveis de temperatura e 3 níveis de pH.

Pelo teste de Tukey (Figura 5-A) verificou-se que o isolado Tw6 apresentou o melhor crescimento e CNP311A, T15P e Tal-1 não diferiram estatisticamente entre si. Quanto às temperaturas testadas (Figura 5-B) pode-se observar que, à medida que se elevou a temperatura, houve melhoria significativa no desempenho dos isolados, sendo  $28^{\circ}\text{C}$  o melhor nível para a maioria dos antagonistas (Figura 4). Foi observado um decréscimo no crescimento na maioria dos isolados em  $32^{\circ}\text{C}$ , em todos os pHs testados; embora, Tw6 não tenha sido afetado por temperaturas mais altas (Figura 4). O melhor desempenho deste isolado (Tw6), pelas análises estatísticas, se deu a  $23^{\circ}\text{C}$  e pH 5,5, embora, os níveis de pH 4,5 e 5,5 não tivessem diferido significativamente entre si. Para o isolado CNP311A, Tal-1 e T15P, não houveram diferenças significativas em relação aos níveis de pH testados (Figura 5.C).

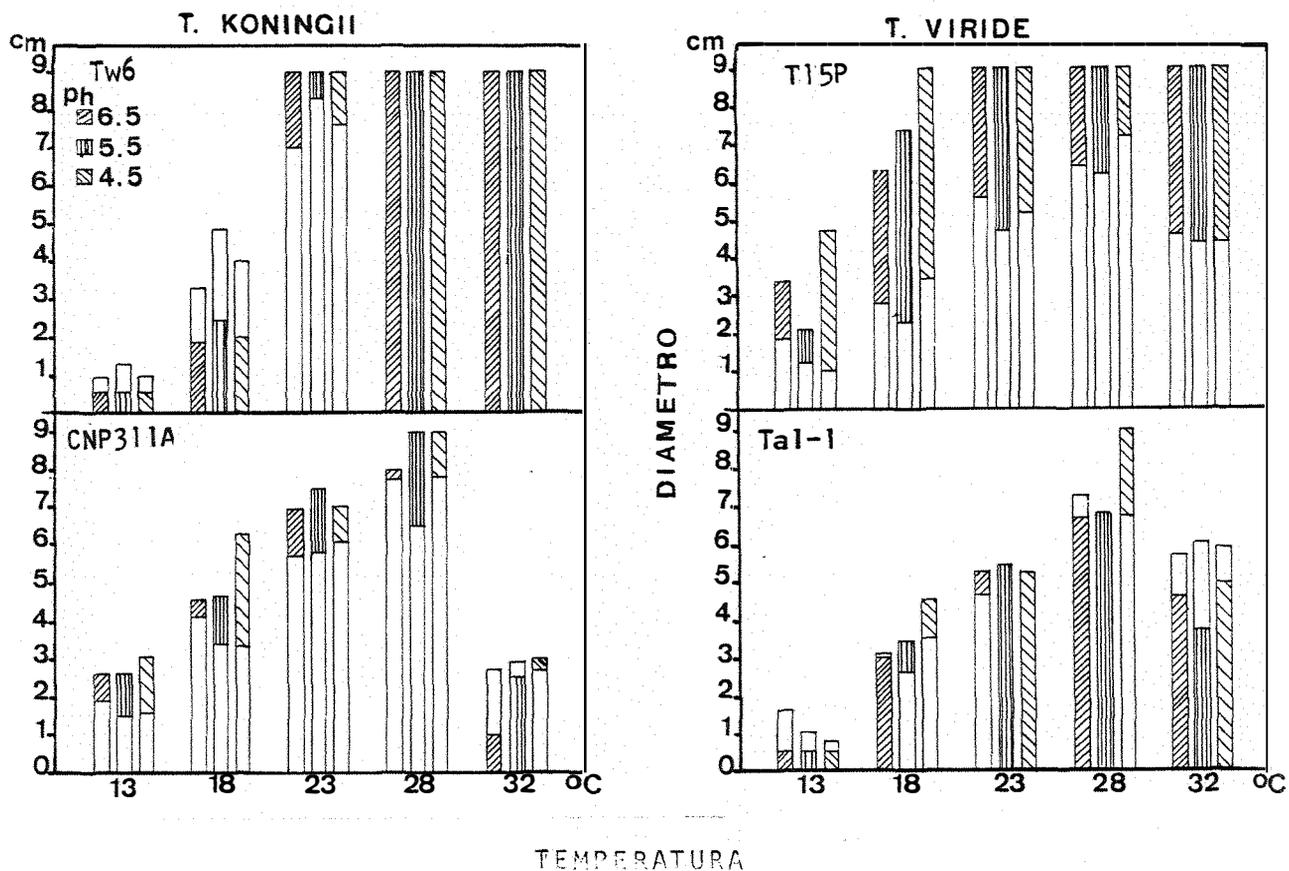


Figura 4 - Influência de temperatura e pH no desenvolvimento e na produção de metabólitos por *Trichoderma* spp. As partes das colunas vazias indicam os valores médios dos diâmetros dos halos de inibição e as partes das colunas achuradas indicam os valores médios dos diâmetros da colônia. Colunas totalmente achuradas indicam que o diâmetro médio do halo foi exatamente igual ao diâmetro médio da colônia.

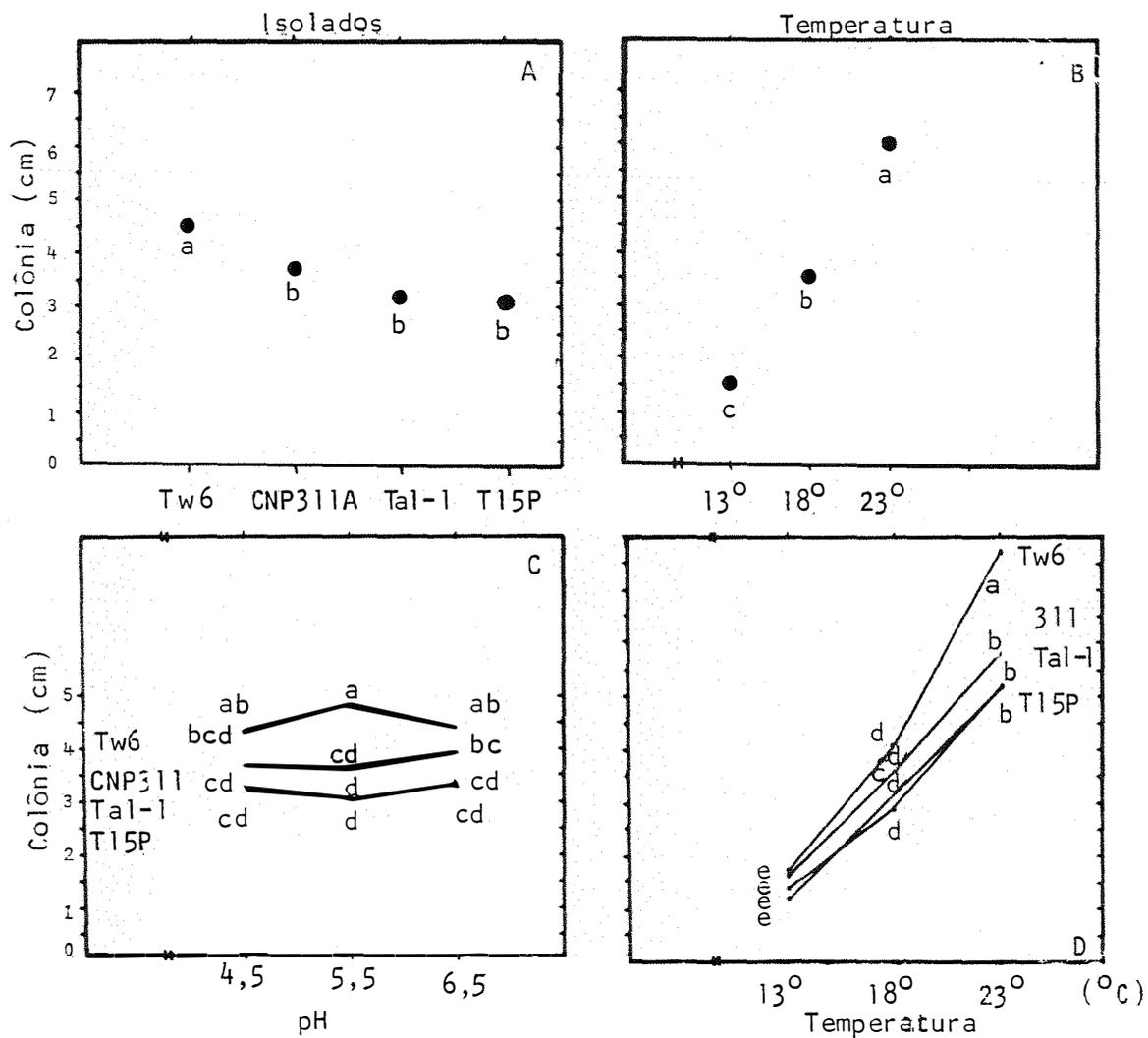


Figura 5 - Teste de influência de pH e temperatura no crescimento e produção de metabólitos de *T. koningii* e *T. viride*.  
 • Letras iguais indicam que os contrastes de médias não foram significativos no nível de 5% de probabilidade ( $\Delta=0,59$ ;  $\Delta=0,49$ ;  $\Delta=0,72$  e  $\Delta=0,72$ , respectivamente). A) Média dos isolados; B) Média das temperaturas; C) Interação de pH e isolados; D) Interação de temperatura e isolados.

De modo geral, pode-se observar que os isolados de *T. viride* comportaram-se de maneira semelhante em relação aos pHs e temperaturas testados. Entretanto, o mesmo não pode ser dito para os isolados de *T. koningii*, pois, Tw6 foi responsável pela significância da interação de isolados x temperatura (Figura 5-C). A partir de 18°C houve um elevado acréscimo no crescimento deste isolado em relação a CNP311A. O mesmo ocorreu em relação ao pH 5,5. A espécie *T. koningii*, segundo Danielson & Davey, citados por PAPAVIDAS (1985), é amplamente distribuída em áreas de condições climáticas diversas e a espécie *T. viride* prevalece em áreas de temperaturas baixas.

As análises estatísticas referentes à produção de metabólitos não puderam ser efetuadas para aqueles isolados que não apresentaram variação de dados em alguns tratamentos. Entretanto, a Figura 4 ilustra os resultados através do histograma, onde foram agrupados todos os tratamentos. As colunas achuradas mostram o crescimento das colônias de *Trichoderma* spp. e as vazias, mostram o diâmetro do halo de inibição. Aquelas colunas completamente achuradas, como no caso de Tw6 (28°C e 32°C), indicam que a produção de metabólitos e o crescimento das colônias atingiram o mesmo tamanho. Aquelas colunas nas quais as partes achuradas estão posicionadas no topo das colunas significam que a produção de metabólitos ultrapassou o limite do crescimento das colônias. Isto pode ser observado com T15P em todas as temperaturas e pHs testados.

As análises estatísticas foram representadas na Tabela 4 do Apêndice e o teste de Tukey foi representado na Figura 6 em forma de gráfico, para os isolados Tal-1 e CNP311A, os quais foram analisados e representados, separadamente. Para o isolado Tal-1 de *T. viride*, as análises estatísticas foram efetuadas a partir de 18°C porque abaixo deste valor, os dados não variaram em nenhum dos níveis de pH. Assim, detectou-se para Tal-1, que a interação foi significativa ( $p < 0,01$ ) entre pH e temperatura, indicando que existe um comportamento diferencial em resposta aos pHs testados quando este isolado foi avaliado nas várias temperaturas e vice-versa. Pode-se observar pela Figura 6-C que Tal-1 apresentou uma maior produção de metabólitos quando cresceu a 28°C em pH 4,5. Os extremos de temperatura (18° e 32°C) não foram significativos pelo teste de Tukey (Figura 6-A), e Tal-1 foi mais eficiente em pH 4,5.

Com relação a CNP311A, a temperatura ótima para produção de metabólitos foi 28°C e o pH 4,5 foi o mais eficiente, embora este não tivesse diferido estatisticamente do pH 5,5. Não houve interação entre pH x temperatura, como pode ser observado pela Tabela 4 do Apêndice.

De modo geral, pode-se observar que a temperatura ótima para crescimento e conseqüente produção de metabólitos foi de 28°C. Estes dados confirmam com os encontrados por BOOSALIS (1963), que relata uma maior efi-

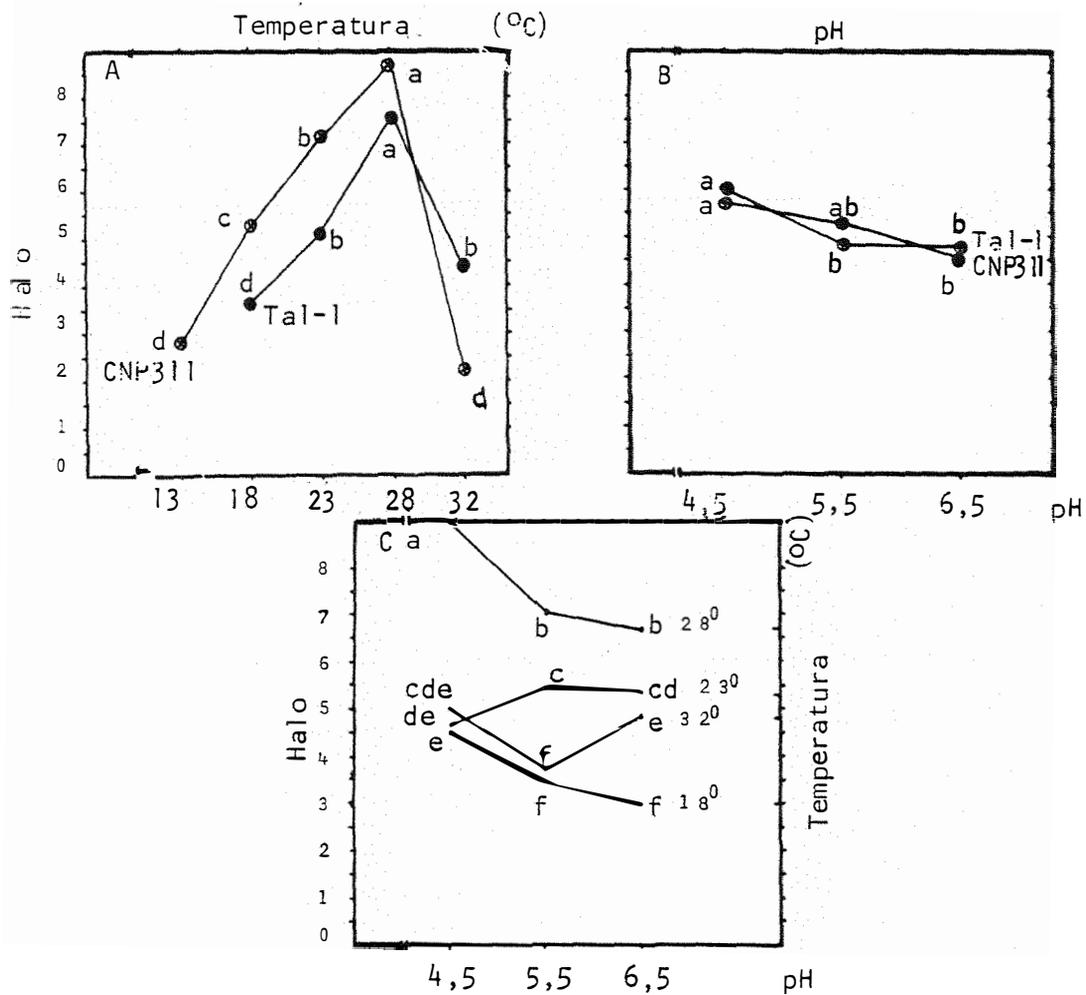


Figura 6 - Valores médios relativos ao teste de influência de temperatura e pH no crescimento e produção de metabólitos por *T. viride* (Tal-1) e *T. koningii* (CNP311A). A) Influência da temperatura na produção de metabólitos de Tal-1 (●) e de CNP311A (⊕) com  $\Delta=0,60$  e  $\Delta=1,04$ , respectivamente. B) Influência de pH em Tal-1 e CNP311A com  $\Delta=0,50$  e  $\Delta=0,78$ , respectivamente. C) Interação de pH x T em Tal-1, com  $\Delta=0,74$ , onde  $p < 0,05$ .

ciência de hiperparasitas necrotróficos, nas faixas de temperatura de 25<sup>o</sup> a 30<sup>o</sup>C. Entretanto, isolados de *Trichoderma* capazes de crescer em temperaturas baixas podem ser efetivos na supressão de doenças que são mais severas em baixas temperaturas (JOHNSON *et alii*, 1987). *V. dahliae* desenvolve-se em condições de 12<sup>o</sup> a 30<sup>o</sup>C (BRUEL, 1986). Desta forma, o isolado T15P, o qual mostrou ser o maior produtor de metabólitos poderia ser eficiente no controle deste patógeno, em condições de temperaturas mais amenas.

Em relação ao pH, sabe-se que *V. dahliae* pode crescer em uma ampla faixa de solos ácidos e alcalinos (DUTTA, 1981). Entretanto, *Trichoderma* spp. mostra uma preferência para hiperparasitar, produzir metabólitos e/ou crescer em condições mais ácidas. Assim, no presente estudo não foram detectadas diferenças marcantes na produção média de metabólitos e no crescimento médio dos antagonistas em pHs de 6,5; 5,5 e 4,5 (Figura 4). Parece que os efeitos de temperatura foram muito mais pronunciados no desempenho dos antagonistas do que os efeitos de pH.

#### 4.1.5. Efeito de metabólitos voláteis no crescimento de *V. dahliae*

A análise de variância sobre a influência de antibióticos voláteis no crescimento de *V. dahliae* apresentada na Tabela 5 do Apêndice detectou pelo menos um contraste

significativo entre os tratamentos, ao nível de 1% de probabilidade.

Através dos resultados apresentados na Tabela 6 verificou-se que todos os isolados testados produziram metabólitos voláteis.

Tabela 6 - Influência de metabólitos voláteis no crescimento de *V. dahliae*. Dados do diâmetro médio das colônias de *V. dahliae* (cm).

Isolados	Diâmetro (cm) <sup>1</sup>
Controle	2,70a
Tw6	1,50 b
CNP311A	1,53 b
T15P	1,45 b
Tal-1	1,48 b

<sup>1</sup> Médias de 4 repetições de dados originais. As letras iguais indicam que os contrastes não foram significativos pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (D.M.S. = 0,779).

Em contraste com os intensivos estudos sobre a produção de antibióticos não voláteis por espécies de *Trichoderma* (DENNIS & WEBSTER, 1971a; CAMPOROTA, 1985 e outros) poucos trabalhos têm sido conduzidos sobre a produção de antibióticos voláteis (SIMON *et alii*, 1988).

Isolados de *T. viride* e *T. koningii* foram eficientes produtores de metabólitos voláteis em meio de cultura contra vários fungos patogênicos (DENNIS & WEBSTER, 1971a).

De acordo com estes autores, os antibióticos voláteis atuam sobre os fungos suscetíveis através da inibição do seu crescimento micelial. Exatamente como foi demonstrado na Tabela 6, as colônias de *V. dahliae* tornaram-se frequentemente reduzidas na presença dos isolados de *Trichoderma*.

Os antagonistas testados aqui mostraram ser efetivos produtores tanto de metabólitos voláteis como de não voláteis. Entretanto, DENNIS & WEBSTER (1971b) acreditam que aqueles isolados que mostram capacidade para produção de antibióticos não voláteis nem sempre produzem antibióticos voláteis.

Para testar o efeito de metabólitos voláteis de *T. viride*, BHARAT *et alii* (1980) colocaram *Aspergillus* spp. para crescer na presença do antagonista, onde a sua metodologia foi semelhante à usada aqui. Entretanto, os autores semearam apenas uma colônia de *Aspergillus* spp. na placa testemunha, enquanto que neste ensaio foram semeados dois discos de a.m.c. de *V. dahliae* em cada uma das extremidades da placa. Isto para não incorrer no erro de superestimar a ação dos produtos voláteis liberados por *Trichoderma* spp., onde a presença de apenas um fungo como testemunha pode ser favorecido pela maior disponibilidade de oxigênio no micro-ambiente em relação aos outros tratamentos com *Trichoderma* e *V. dahliae*. De acordo com COOK & BAKER (1983) a competição por nutrientes, espaço e oxigênio frequentemente ocorre entre fungos.

As substâncias voláteis produzidas podem ser: acetaldeído, n-propanol; propionaldeído, acetona e outras. Entretanto, assim como ocorre com a produção de metabólitos não voláteis, isolados de *Trichoderma* produzem mais do que um metabólito volátil (DENNIS & WEBSTER, 1971a, b).

#### 4.1.6. Teste de competição e auto inibição de isolados de *T. koningii* e *T. viride* em meio de cultura

Os valores médios de comprimento do raio de colônia de *Trichoderma* spp. estão na Tabela 7, os quais mostram que em 48 horas os isolados testados já se confrontavam em meio de cultura. Entretanto, em 96 horas de exposição observou-se que os isolados de *T. viride* (Tal-1, T15P) sempre avançavam sobre as colônias dos isolados de *T. koningii*. Na combinação de CNP311A/Tw6 verificou-se que Tw6 avançou sobre a colônia de CNP311A. Nenhum dos isolados testados cresceu sobre *T. viride*, nem mesmo quando Tal-1/T15P cresceram juntos, na mesma placa de Petri.

Na zona de contato das colônias provavelmente deveria estar ocorrendo algum tipo de micoparasitismo entre estes hiperparasitas, pois VAJNA (1985b) detectou, através de observações microscópicas, que alguns isolados de *Trichoderma* hiperparasitavam os outros e que hiperparasitismo mútuo também pode ocorrer.

Tabela 7 - Teste de competição de isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura. Medidas do raio da colônia (cm).

Tratamentos	Médias	
	48 horas	96 horas
A) Tal-1	(3,15)	(3,15) <sup>1</sup>
B) Tal-1/Tal-1	(2,23) (2,20)	(2,23) (2,20) <sup>2</sup>
C) Tw6	(5,90)	(5,90) <sup>1</sup>
D) Tw6/Tw6	(2,10) (2,10)	(2,10) (2,10) <sup>2</sup>
E) T15P	(2,83)	(2,83) <sup>1</sup>
F) T15P/T15P	(2,16) (2,18)	(2,16) (2,18) <sup>2</sup>
G) CNP311A	(4,13)	(4,13) <sup>1</sup>
H) CNP311A/311A	(2,53) (2,25)	(2,53) (2,25) <sup>3</sup>
I) Tal-1/T15P	(2,30) (2,15)	(2,30) (2,35) <sup>1</sup>
J) Tw6/Tal-1	(2,55) (1,30)	(2,56) (3,65) <sup>3</sup>
L) T15P/CNP311A	(1,60) (2,63)	(2,83) (2,75) <sup>3</sup>
M) CNP311A/Tal-1	(2,53) (2,10)	(2,65) (3,56) <sup>3</sup>
N) CNP311A/Tw6	(1,80) (1,48)	(1,95) (2,63) <sup>3</sup>
O) Tw6/T15P	(3,23) (1,18)	(3,30) (3,30) <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Valores médios da testemunha com apenas um isolado/placa, em 4 repetições.

<sup>2</sup> Valores médios da testemunha com dois isolados/placa, em 4 repetições.

<sup>3</sup> Valores médios dos tratamentos combinados um a um. O valor que antecede a barra corresponde ao raio de crescimento do primeiro isolado e, o valor posterior a barra corresponde ao raio de crescimento do segundo isolado dentro da mesma placa, em 4 repetições.

Assim, como o objetivo deste teste foi avaliar a melhor combinação de isolados para posterior emprego em testes *in vivo*, escolheram-se as combinações de *T. viride*, as quais cresceram tão bem quanto suas respectivas testemunhas (Tal-1/Tal-1 e T15P/T15P).

No ensaio de auto-inibição por metabólitos que é a complementação do teste de competição, a análise de variancia detectou pelo menos um contraste significativo (Tabela 6 do Apêndice) entre os pares de isolados testados, ao nível de 1% de probabilidade.

A Tabela 8 mostra que ocorreu uma inibição de crescimento quando os isolados foram expostos aos seus próprios metabólitos em relação à testemunha.

O isolado CNP311A, além de ser inibido por seus metabólitos (CNP311A/CNP311A), foi também inibido porém, mais fortemente por T15P, Tal-1e, principalmente, por Tw6.

Para o isolado Tw6, o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) detectou diferenças significativas entre todos os contrastes quando comparados com a testemunha. No entanto, os metabólitos produzidos pelo próprio Tw6 e também, por CNP311A proporcionaram o mesmo diâmetro médio de colônia em Tw6. O mesmo não ocorreu com Tal-1 e T15P pois, Tw6 foi fortemente inibido pelos metabólitos liberados por estes isolados de *T. viride*.

Tabela 8 - Teste de auto inibição por metabólitos de *T. koningii* e *T. viride*.

Tratamentos		Médias <sup>1</sup>
Metabólitos	Colônia	
*0	Tw6	9,00 a
0	CNP311A	6,68 b
0	Tal-1	6,43 bc
Tw6	Tw6	6,08 bc
0	T15P	5,90 bcd
CNP311A	Tw6	5,36 bcde
CNP311A	CNP311A	5,28 cde
CNP311A	Tal-1	5,21 cde
Tal-1	Tal-1	5,09 def
Tal-1	T15P	4,69 defg
CNP311A	T15P	4,54 efgh
T15P	T15P	3,76 fgh
T15P	Tal-1	3,74 fgh
Tal-1	Tw6	3,34 ghi
Tw6	T15P	3,08 hi
T15P	CNP311A	3,04 hi
Tal-1	CNP311A	2,69 hij
Tw6	Tal-1	2,65 ij
T15P	Tw6	2,01 ij
Tw6	CNP311A	1,66 ij

<sup>1</sup> Valores médios de 4 repetições obtidos através do diâmetro médio da colônia de *Trichoderma* spp.

Letras iguais indicam que os contrastes de médias não foram significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (D.M.S. = 3,01).

\* 0 zero (0) significa que o isolado cresceu sem nenhum metabólito presente no meio (testemunha).

Quanto aos isolados de *T. koningii* uma redução mais drástica no diâmetro médio de colônias ocorreu quando o isolado Tw6 foi exposto aos metabólitos produzidos por CNP311A do que quando ocorreu o inverso; embora no teste de competição (Tabela 7) o isolado Tw6 tivesse avançado sobre a colônia de CNP311A, após 96 horas de crescimento.

Em relação aos isolados de *T. viride*, o teste de Tukey detectou diferenças significativas em quase todos os tratamentos (exceto na presença de metabólitos de CNP311A), quando comparados com a testemunha, no tocante à redução do crescimento de Tal-1, inclusive na presença de metabólitos produzidos por T15P. Quanto a este último, observou-se que houve uma redução no seu crescimento quando cresceu sobre seus próprios metabólitos, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o isolado T15P não diferiu da sua testemunha quando cresceu sobre os metabólitos de Tal-1 e CNP311A. Desta maneira, pode-se concluir que os metabólitos produzidos por T15P parecem ser mais potentes que os produzidos por Tal-1.

Constatou-se pelo teste de competição (Tabela 7) que não ocorreu crescimento de colônias de Tal-1 sobre T15P e vice-versa. Assim, a melhor combinação de antagonistas para emprego nos testes *in vivo* foi dos isolados Tal-1/T15P de *T. viride*.

## 4.2. Experimento II

### 4.2.1. Teste de antagonismo I: Infestação do solo com *V. dahliae* anterior a *Trichoderma* spp.

Os resultados e análises estatísticas pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), estão representados na Tabela 9. Para tanto foram efetuadas comparações entre cada tratamento (patógeno + antagonista) e o controle (patógeno) através de tabelas de contingência 2x2.

O isolado IM<sub>1</sub> de *V. dahliae* mostrou ser mais patogênico que IM<sub>3</sub> em relação ao híbrido F100 e a RVIII. Desta maneira, não houve eficiência de nenhum dos antagonistas testados quando o isolado IM<sub>1</sub> estava presente. Inclusive, em RVIII, observou-se que em todos os tratamentos com os fungos antagonistas ocorreu um número maior de plantas doentes do que em relação ao controle. Entretanto, o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) não detectou diferenças significativas entre esses tratamentos ( $p < 0,05$ ). Situações semelhantes ocorreram nos tratamentos envolvendo RVIII e IM<sub>3</sub>. Entretanto, a incidência de doença, neste caso, foi relativamente reduzida. Por outro lado, Tal-I foi capaz de reduzir a incidência da doença quando o isolado IM<sub>3</sub> estava presente no solo e o hospedeiro testado foi o híbrido F100. A Figura 7 ilustra a variação que ocorreu na quantidade da doença em relação aos hospedeiros testados quando infestou-se o solo com IM<sub>1</sub> e IM<sub>3</sub>.

A capacidade de agentes de biocontrole serem efetivos no controle de doenças de plantas pode estar limi-

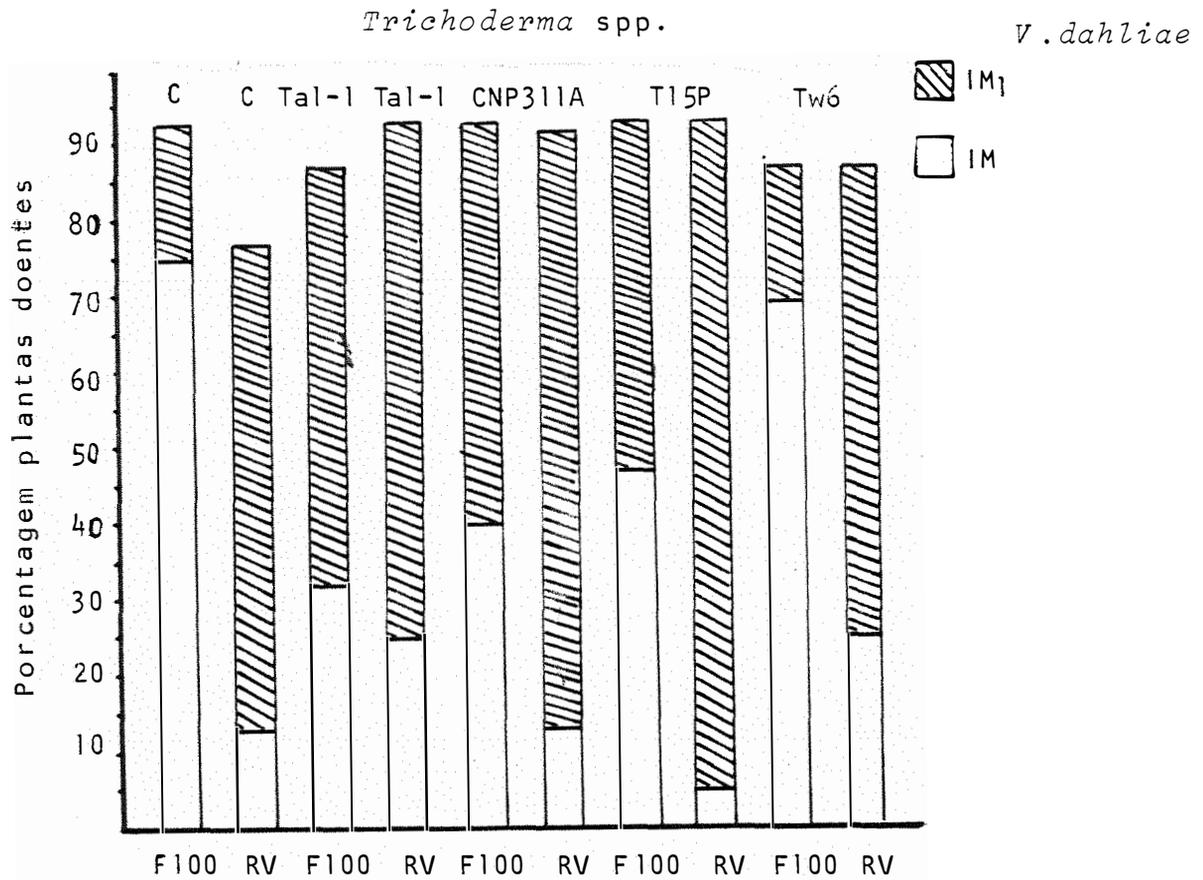
Tabela 9 - Valores e significância do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) relativo ao teste de antagonismo (1) - Infestação do solo com *V. dahliae* anterior a *Trichoderma* spp. Dados em porcentagem de plantas doentes. Piracicaba, SP. 1988.

Tratamentos	% de plantas doentes <sup>1</sup>			
	F100		RVIII	
	IM <sub>1</sub>	IM <sub>3</sub>	IM <sub>1</sub>	IM <sub>3</sub>
Controle	93,0	75,0	77,0	13,0
CNP311A	93,0 <sup>ns</sup>	40,0 <sup>ns</sup>	92,0 <sup>ns</sup>	13,0 <sup>ns</sup>
T15P	93,0 <sup>ns</sup>	47,0 <sup>ns</sup>	97,0 <sup>ns</sup>	6,0 <sup>ns</sup>
Tw6	87,0 <sup>ns</sup>	69,0 <sup>ns</sup>	87,0 <sup>ns</sup>	25,0 <sup>ns</sup>
Tal-1	87,0 <sup>ns</sup>	32,0*	93,0 <sup>ns</sup>	25,0 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup> Valores percentuais de 4 repetições.

ns: não significativos a 5% de probabilidade pelo teste do  $\chi^2$ , com GL = 1

\*: significativo a 1% de probabilidade



### Berinjela

Figura 7 - Infestação do solo com *V. dahliae* anterior a *Trichoderma* spp. As colunas vazias mostram a quantidade de doença obtida com o isolado IM<sub>3</sub> e, as colunas achuradas representam a quantidade de doença total obtida com o isolado IM<sub>1</sub>. Os isolados de *Trichoderma* spp. (Tal-1, Tw6, CNP311A e T15P) e o controle estão representados acima das colunas; os tipos de plantas de berinjela (F100 e RVIIII) abaixo.

tado a vários fatores, tais como: sobrevivência no solo e na rizosfera, pH, temperatura, agressividade do patógeno, suscetibilidade do hospedeiro, umidade, qualidade da base alimentar, entre outros. De acordo com NELSON *et alii* (1988) a capacidade de isolados de *Trichoderma* produzirem enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, celulase e quitinase pode ser estimulada quando eles crescem sobre substratos adequados. Além do mais, o grau de decomposição do substrato é significativamente importante no desempenho do antagonista (NELSON *et alii*, 1983). De acordo com o autor, *Trichoderma* sp., de modo geral, mostra preferência para desenvolver-se em substratos mais decompostos. Desta maneira, o substrato empregado neste estudo, tratou-se de bagacilho de cana-de-açúcar, já em um grau avançado de decomposição.

Os antagonistas empregados aqui foram capazes de sobreviver no solo e na rizosfera, conforme pode ser verificado na Tabela 11. Entretanto, o biocontrole em geral não foi bem sucedido. A temperatura média (24°C) durante o período pelo qual o ensaio foi instalado favoreceu ao antagonistas, pois de acordo com JOHNSON *et alii* (1987), *T. viride* e *T. koningii* crescem bem em temperaturas baixas, embora a faixa ótima de crescimento seja de 25°C a 30°C (BOOSALIS, 1963). Além do mais, o teste de influência de pH e temperatura (Figura 4) mostrou que a partir de 13°C a maioria dos antagonistas pode crescer razoavelmente. Entretanto, *V. dahliae* parece ser mais favorecido em temperaturas mais amenas propiciando um

aumento na severidade da doença. Este provavelmente, pode ser um fator que contribuiu para a ineficiência do biocontrole. Além do mais, o fato de se infestar o solo com o patógeno é uma forma de expor drasticamente os tecidos da planta hospedeira ao patógeno, pois, com o transplante das mudas, partes de pelos radiculares e raízes secundárias são rompidas. Desta maneira, a penetração do patógeno pode ser favorecida pela ausência de barreiras físicas no hospedeiro.

Além destes fatores citados acima como prováveis responsáveis pela ineficiência dos agentes de biocontrole, a qualidade da base alimentar tem grande influência entre eles, pois apesar do grau avançado de decomposição do bagacilho, o qual favorece os fungos antagonistas, este pode não ter sido suficientemente adequado para a produção de enzimas líticas pelo micoparasitista. Conforme AKHTAR (1977), bagaço de cana é pobre em nitrogênio, embora, rico em carboidratos, não suportando a atividade antagonista de *T. viride* tão bem como outros tipos de substratos. Em contrapartida TOKESHI *et alii* (1980) e MELO (1984) obtiveram bons níveis de controle de doenças através do uso de torta de filtro Oliver, como substrato para crescimento de *Trichoderma* spp..

Os resultados e análises de variância do ensaio sobre sobrevivência de *Trichoderma* spp. na rizosfera estão na Tabela 11. O teste F (Tabela 9 do Apêndice) não

detectou contrastes significativos em relação a nenhum dos tratamentos, embora os antagonistas tivessem sido capazes de sobreviver tanto na rizosfera do híbrido F100 como de RVIII.

#### 4.2.2. Teste de antagonismo II - Infestação do solo com *V. dahliae* posterior à infestação com *Trichoderma* spp.

Pode-se observar pela Tabela 10 e Figura 8 que a incidência da doença nesse ensaio foi menor que a do ensaio anterior, como ilustra a Figura 7. Provavelmente, isto pode ter ocorrido devido as modificações na metodologia de inoculação. Tratou-se entretanto, de uma situação a qual normalmente, não ocorre na natureza, pois as covas foram infestadas com *V. dahliae* após o transplante das mudas. Em condições naturais, as mudas são transplantadas para o campo, e o inóculo já se encontra presente no local de plantio.

Entretanto, como os níveis de controle foram baixos no primeiro ensaio, alguns pontos foram questionados como por exemplo: a infestação do solo com o patógeno anteriormente favorece o antagonismo devido aos danos causados nas raízes e exposição de tecidos no momento do transplante das mudas, favorecendo assim, a penetração do patógeno. PERRY & EVERT (1983) verificaram que a germinação dos propágulos do fungo no solo ocorreu após 2 dias da infestação. Desta maneira, se o mesmo ocorre na rizosfera de berinjela, possivelmente, os danos causados pelo patógeno seriam elevados, mesmo na

Tabela 10 - Valores e significâncias do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) relativo ao teste de antagonismo (II): Infestação do solo com *V. dahliae* posterior a *Trichoderma* spp. Dados em porcentagem de plantas doentes. Piracicaba, SP. 1988.

Tratamentos	% de plantas doentes			
	F100		RV-III	
	IM <sub>1</sub>	IM <sub>3</sub>	IM <sub>1</sub>	IM <sub>3</sub>
Tw6	45,0 <sup>ns</sup>	15,0 <sup>ns</sup>	30,0 <sup>ns</sup>	5,0 <sup>ns</sup>
Tal-1	50,0 <sup>ns</sup>	35,0 <sup>ns</sup>	40,0 <sup>*</sup>	15,0 <sup>ns</sup>
CNP311A	40,0 <sup>ns</sup>	45,0	25,0 <sup>ns</sup>	25,0 <sup>ns</sup>
T15P	30,0 <sup>ns</sup>	55,0	20,0 <sup>ns</sup>	5,0 <sup>ns</sup>
Controle	35,0	15,0	5,0	5,0

<sup>1</sup> Valores percentuais de 5 repetições.

ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de  $\chi^2$ , com GL-1.

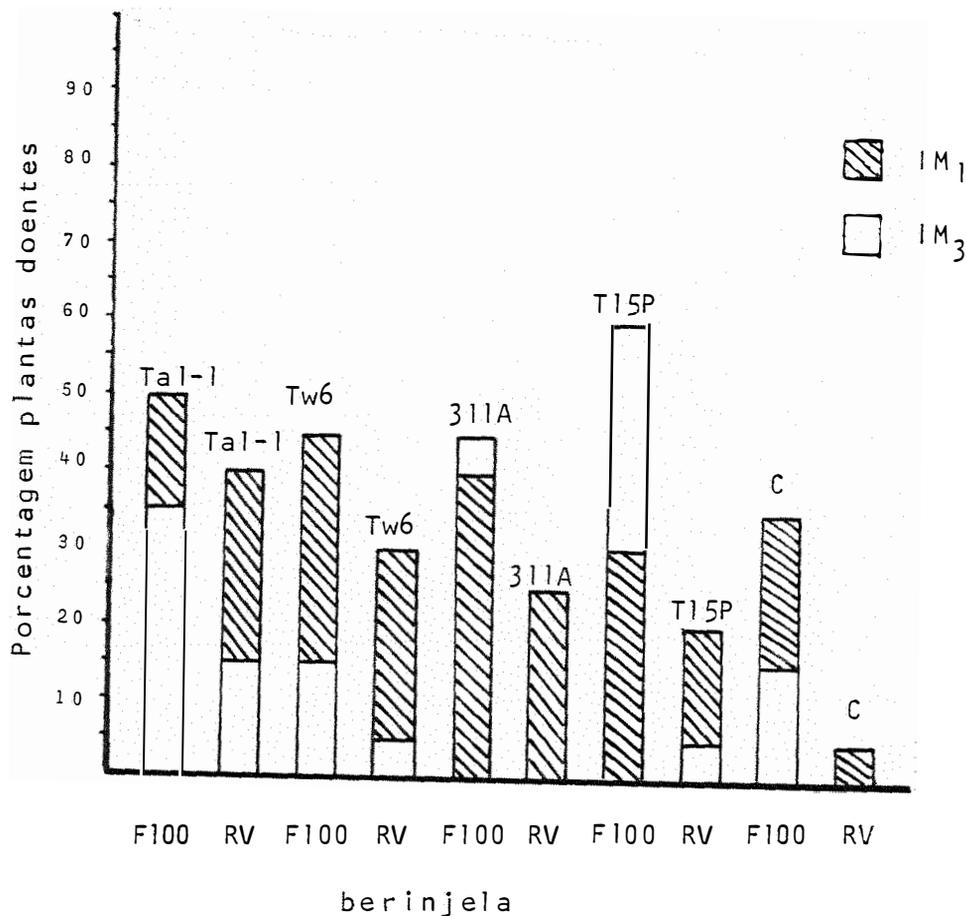
*Trichoderma* spp*V. dahliae*

Figura 8 - Infestação do solo com *V. dahliae* posterior a *Trichoderma* spp. As colunas vazias mostram a quantidade de doença obtida com o isolado IM<sub>3</sub> e, as colunas achuradas representam a quantidade de doença total obtida com o isolado IM<sub>1</sub>. Os isolados de *Trichoderma* spp. (Tal-1; Tw6; CNP311A e T15P) e o controle estão representados acima das colunas; os tipos de plantas de berinjela (F100 e RVIII) abaixo.

presença de antagonistas. Inclusive, explorando uma base alimentar que poderia não estar favorecendo a produção de enzimas líticas e/ou antibióticos, como a usada no caso. Outro aspecto também questionado foi a respeito dos isolados e espécies de *Trichoderma* selecionados através dos testes *in vitro*.

O teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi feito através de comparação do número total de plantas doentes em cada tratamento (GL=1). A Tabela 10 e Figura 8 expressam os valores de porcentagens totais de plantas doentes. Assim, o teste do  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ) detectou diferenças significativas entre o controle e *Trichoderma* spp. em dois casos: quando CNP311 e T15P foram testados contra IM<sub>3</sub>, com o hospedeiro F100 e o outro, quando Tal-1 foi testado com IM<sub>1</sub> em RV111.

O tratamento químico usado foi eficiente no controle da doença, pois apenas uma planta apresentou sintoma de murcha verticilar.

O insucesso do biocontrole neste ensaio não pode ser atribuído à ausência de antagonistas no solo, pois conforme a Tabela 9 do Apêndice, todos os isolados foram capazes de sobreviver na rizosfera de plantas, independente das cultivares utilizadas. O isolado Tal-1 apresentou a maior média (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ) embora não se conhecesse o número inicial de propágulos de *Trichoderma* spp. (Tabela 11).

Tabela 11 - Sobrevivência de *T. koningii* e *T. viride* na rizosfera de berinjela, após 30 e 47 dias, respectivamente.

Isolados	Ensaio I	Ensaio II <sup>1</sup>
Ta1	286 a	254 a
T15P	185 a	245 ab
CNP311A	248 a	199 ab
Tw6	256 a	101 b

. Dados originais de contagem do número de colônias na diluição de  $10^{-3}$  conídios/ml.

<sup>1</sup> Valores médios seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com D.M.S. = 0,141 e D.M.S. = 0,216, respectivamente.

#### 4.2.3. Teste de antagonismo III: Infestação simultânea do solo com *V. dahliae* e *Trichoderma* spp.

Os resultados obtidos neste ensaio mostraram diferenças marcantes entre os tratamentos, fato este que não justificou aplicar análises estatísticas para discriminar os respectivos tratamentos; além de que muitos destes assumiram valor zero (0), por não ter ocorrido doença. Aqueles tratamentos pelos quais as plantas não puderam ser infectadas por *V. dahliae* (IM<sub>1</sub>), pois os antagonistas foram eficientes no extermínio do patógeno foram: CNP17 e TCII (*T. harzianum*); Tal-1 e T15P (*T. viride*) e CNP311A (*T. koningii*). Entretanto, o isolado Tw6 foi eficiente apenas quando RVIII foi o hospedeiro. Pela Figura 9 pode-se observar que Tw6 não foi eficiente no extermínio de IM<sub>1</sub>, pois 26% das plantas foram infectadas. Este isolado mostrou instabilidade metabólica nos testes de antibiose, pois algumas horas após as avaliações do halo de inibição, ocorria o desenvolvimento de colônias do patógeno. Entretanto, essa instabilidade persistiu mesmo com a produção constante de metabólitos e isto pode ser claramente demonstrado quando a planta suscetível foi usada como hospedeira.

Este ensaio definitivamente simula o controle biológico da murcha verticilar em condições naturais, entretanto, pode-se verificar que se os antagonistas foram suficientemente capazes de reduzir a fonte de inóculo no solo e a cultivar apresentar um certo grau de resistência ao patóge

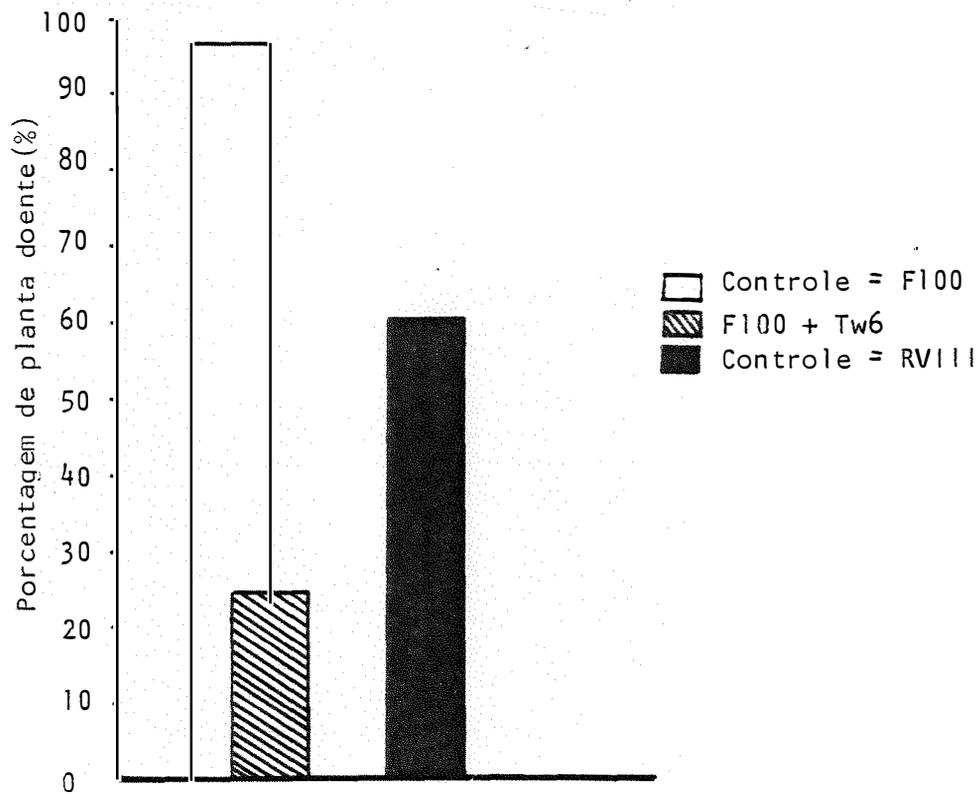


Figura 9 - Teste de antagonismo III. Infestação do solo com *V. dahliae* e *Trichoderma* spp. no solo. Dados em porcentagem de plantas doentes. Valores percentuais iguais a zero não foram ilustrados, sendo os referentes aos isolados T15P, Tal-1, CNP311A, CNP17 e TCII.

no, possivelmente o controle biológico será bem sucedido.

Ademais, pode-se observar pela Figura 9 que em relação à testemunha RV111, o tratamento híbrido F100 + Tw6 foi mais eficiente no sentido de reduzir o ataque por *V. dahliae*.

Os antagonistas aqui testados foram aqueles que produziram o maior diâmetro médio de halo. Entretanto, aqueles antagonistas que não produziram ou produziram pouco poderiam também ser testados para verificar se apenas o parasitismo de hifas é suficiente para exterminar *V. dahliae*.

#### 4.3. Experimento III

##### 4.3.1. Influência de *T. viride* e *T. koningii* na germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas

O ensaio conforme consta na Tabela 12 foi analisado pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) através de tabelas de contingência 2x2, onde foram comparados todos os tratamentos com o controle e entre si.

Os resultados obtidos em solo autoclavado e solo natural foram analisados separadamente.

Em solo autoclavado, considerando-se o híbrido F100, o teste do  $\chi^2$  não detectou diferenças significativas para as sementes tratadas com os isola-

Tabela 12 - Valores e significâncias do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) relativo ao teste de influência de isolados de *T. koningii* e *T. viride* na germinação de sementes. Dados em contagem de sementes germinadas. Piracicaba, SP. 1988.

- SOLO AUTOCLAVADO - F100 -

		C	Tw6	T15P	Tal-1	T15P/Tal-1	CNP311A
Tratamentos	Médias	118	109	33	98	81	114
C	118	-	ns	**	ns	**	ns
Tw6	109			**	*	**	ns
T15P	33				**	**	**
Tal-1	98					*	**
T15P/Tal-1	81						**
CNP311A	114						-

2/ - SOLO AUTOCLAVADO - RVIII -

		C	Tw6	T15P	Tal-1	T15P/Tal-1	CNP311A
Tratamentos	Médias	40	39	21	16	29	44
C	40	-	ns	**	**	ns	ns
Tw6	39			**	**	ns	ns
T15P	21				ns	ns	**
Tal-1	16					*	**
T15P/Tal-1	29						*
CNP311a	44						

3/ - SOLO NATURAL - F100 -

		C	Tw6	T15P	Tal-1	T15P/Tal-1	CNP311A
Tratamentos	Médias	13	92	113	118	98	101
C	13	-	**	**	**	**	**
Tw6	92			**	**	ns	ns
T15P	113				ns	**	*
Tal-1	118					**	**
T15P/Tal-1	98						ns
CNP311A	101						-

4/ - SOLO NATURAL - RVIII -

		C	Tw6	T15P	Tal-1	T15P/Tal-1	CNP311A
Tratamentos	Médias	13	37	18	46	37	39
C	13	-	**	ns	**	**	**
Tw6	17			**	ns	ns	ns
T15P	18			**	**	**	-
Tal-1	46					ns	ns
T15P/Tal-1	37						ns
CNP311A	39						-

dos Tw6, Tal-1 e CNP311A quando comparadas com o controle. Entretanto, o isolado T15P e a mistura de *T. viride* (Tal-1/T15P) reduziram a germinação de F100.

Quando os tratamentos foram comparados entre si, pode-se observar, que os isolados Tw6 e CNP311A (*T. koningii*) não diferiram entre si, mas que Tw6 foi significativamente superior ( $p < 0,01$ ) a T15P, a mistura e também, a Tal-1 ( $p < 0,05$ ).

Em geral, os isolados de *T. koningii* foram significativamente superiores aos isolados de *T. viride*, embora estes primeiros não tenham diferido do controle (Tabela 12.1).

Em relação à germinação de sementes da cultivar RVIII, o teste do  $\chi^2$  não detectou diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com Tw6, CNP311A e a mistura. Entretanto, T15P e Tal-1, ao contrário da sua mistura, foram significativamente inferiores ao controle, mostrando mais uma vez a influência negativa de *T. viride* na germinação de sementes. Quando os tratamentos Tw6 e CNP311A foram comparados entre si, as diferenças presentes não foram significativas. Também, o isolado T15P não diferiu estatisticamente de Tal-1 e da mistura. Entretanto, Tal-1 foi estatisticamente superior à mistura ( $p < 0,05$ ).

Em geral, *T. viride* e *T. koningii* não favoreceram a germinação das sementes em solo autoclavado (Figura 10 C-D). Um dos fatores responsáveis pode ter sido devido ao aumento do número de propágulos no solo, formando uma densa massa de micélio e

confídios, dificultando assim a emergência das plântulas. Pode-se observar pela Tabela 14 que em 10 dias, após o procedimento da sementeira, verificou-se que o índice de sobrevivência de Tal-1 e T15P teve um forte acréscimo. Entretanto, nesta fase os outros isolados, os quais desenvolvem-se mais rapidamente, já se encontravam em declínio no solo.

Em solo natural, foi observada uma melhoria na germinação de F100 e RVIII em relação ao controle, exceto quando RVIII foi tratada com T15P. (Figura 10 A.B).

Os isolados de *T. koningii* não diferiram estatisticamente entre si, pois ambos favoreceram a germinação das sementes, tanto para o híbrido F100 como para RVIII. O isolado Tal-1 foi superior em promover a germinação, a todos os demais, embora, pelo teste do  $\chi^2$  as diferenças entre eles não tenham sido significativas (Tabela 12.3). O genótipo da planta deve ser também considerado, pois T15P mostrou-se sempre incompatível com RVIII (Tabela 12.3.4).

Em geral, pode-se concluir que Tw6, CNP311A, Tal-1/T15P (mistura) e Tal-1 estimularam a germinação de RVIII, e todos os antagonistas testados favoreceram a germinação de F100 em solo natural. A mistura de isolados de *T. viride* não correspondeu às expectativas pois, na maioria das vezes, Tal-1 foi superior quando testado separadamente. No controle, o crescimento de organismos patogênicos foi favorecido pela adição do substrato apenas esterilizado.

De acordo com WINDHAM *et alii* (1986) *T. harzi* e *T. koningii* aumentaram significativamente a emergência

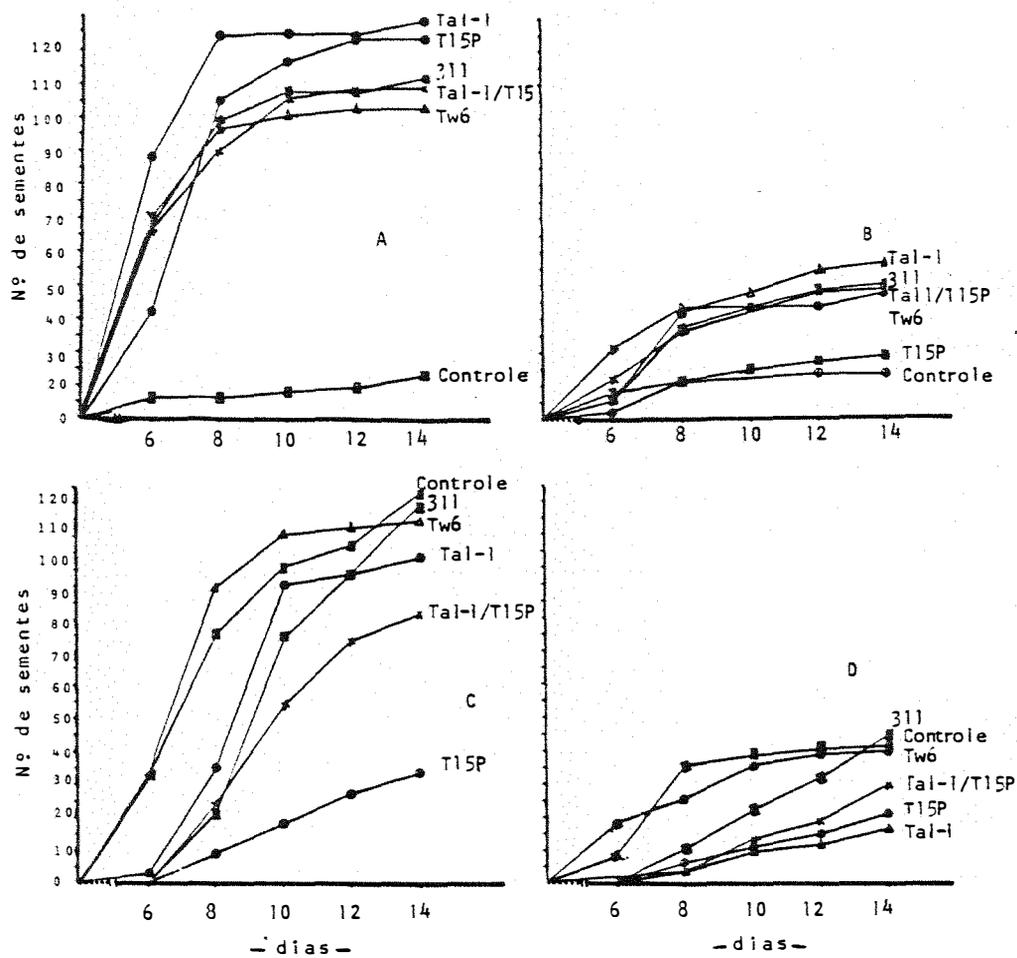


Figura 10 - Influência de *T. koningii* e *T. viride* na emergência de plântulas. (A) F100 e (B) RVIII em solo natural; (C) F100 e (D) RVIII em solo autoclavado.

de plântulas de tomateiro, fumo e rabanete tanto em condições axênicas como em condições gnotobióticas (rabanete).

Neste caso, os agentes de biocontrole puderam contribuir para a eficiência na germinação, predominantemente, devido ao controle de patógenos menores.

Além disto, esses agentes de biocontrole foram capazes de favorecer o crescimento de F100 e RVIII. Os resultados deste experimento e respectivas médias constam da Tabela 13. O delineamento em blocos ao acaso, arranjado em parcelas subdivididas (Tabelas 7 e 8 do Apêndice) foi analisado em fatorial para os tratamentos em solo autoclavado porque os quadrados médios dos resíduos da sub parcela tanto para altura de plantas como matéria seca foram menores e iguais, respectivamente, aos quadrados médios dos resíduos das parcelas (PIMENTEL GOMES, 1981).

Tabela 13 - Valores médios do Experimento III - Influência de *T. koningii* e *T. viride* no desenvolvimento de plantas em solo autoclavado e em solo natural.

Isolados	Peso matéria seca (g)		Altura (cm)	
	Solo autoclavado	Solo natural	Solo autoclavado	Solo natural
Tw6	2,14 a	2,73 a	33,24 a	37,41 a
CNP311A	1,56 ab	2,65 a	29,72 ab	36,72 ab
T15P	1,29 bc	1,95 b	24,93 b	35,31 bc
Ta1-1	1,19 bc	1,82 b	26,47 b	34,99 bc
Controle	1,13 bc	1,23 c	27,85 b	26,65 d
Ta1-1/T15P	0,93 c	2,14 b	26,75 b	34,99 c

. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (D.M.S. = 0,617; D.M.S. = 0,331; D.M.S. = 5,301 e D.M.S. = 2,165, respectivamente.

As análises de variância foram efetuadas apenas em 5 repetições (Tabelas 7 e 8 do Apêndice) porque a germinação das sementes na testemunha foi ineficiente em solo natural, sendo necessária a eliminação de um bloco (repetição).

A análise de variância da Tabela 7 do Apêndice detectou pelo menos um contraste significativo entre os isolados de *Trichoderma* spp. testados quanto à altura de plantas ( $p < 0,05$ ) e peso seco ( $p < 0,01$ ) em solo autoclavado. Não houve comportamento diferencial de isolados em relação a cultivar testada, tanto para altura como peso de matéria seca. O teste de Tukey detectou que apenas Tw6 diferiu estatisticamente do controle em relação à altura e peso seco.

A análise de variância para o experimento realizado em solo natural encontra-se na Tabela 8 do Apêndice, a qual detectou pelo menos um contraste significativo entre isolados ( $p < 0,05$ ) tanto para altura de planta como para peso de matéria seca e cultivares. Não houve comportamento diferencial de isolados quanto ao tipo de planta testado. Pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) todos os tratamentos diferiram do controle para altura e peso seco de plantas. Os isolados de *T.konin-*

*gii* foram superiores em relação aos demais. Pode-se verificar que as plantas cresceram melhor em solo natural do que em solo autoclavado. Provavelmente, deve ter ocorrido uma interação benéfica entre *Trichoderma* spp. e a microflora existente nesse solo.

Os isolados de *T. koningi*, especialmente Tw6, apresentaram os melhores resultados quanto à resposta ao ganho no crescimento de plantas induzido por agentes de biocontrole nos dois tipos de solo testados. *Trichoderma* spp. produz um fator de crescimento que aumenta a taxa de germinação de sementes e o crescimento de plantas (WINDHAM *et alii*, 1986).

A mistura de isolados de *T. viride* (Tal-1/T15P) não diferiu de Tal-1 e T15P, para altura de planta e peso seco em nenhum dos ensaios. Contudo, pelos resultados apresentados na Tabela 14, até o 210º dia, ainda foi possível recuperar os dois isolados de *T. viride*, embora o número de colônias de T15P foi menor do que Tal-1. Em solo autoclavado, *T. viride* não teve influência no desenvolvimento de plantas. Entretanto, em solo natural houve um acréscimo no desenvolvimento de plantas tratadas com *T. viride*.

Os isolados de *T. harzianum* avaliados e selecionados pelos testes de antibiose não foram testados sugerindo que estes isolados fossem empregados futuramente em

outros testes, visando estudar o potencial dessa espécie no crescimento de plantas de berinjela pois, CHUN *et alii* (1986) e WHINDHAM *et alii* (1986) obtiveram sucesso com o seu uso. Além do mais, *T. harzianum* apresentou bons resultados no controle da murcha verticilar em condições de casa de vegetação e de campo.

#### 4.4. Experimento IV

##### 4.4.1. Sobrevivência de *T. koningii* e *T. viride* no solo

Os resultados foram apresentados na Tabela 14 através da porcentagem de sobrevivência de propágulos dos antagonistas no solo.

Desta maneira, a porcentagem de sobrevivência foi encontrada através da relação entre o número de colônias detectadas no primeiro dia e o número de colônias detectadas em 10, 37, 79 e 210 dias. Observou-se uma diminuição acentuada na sobrevivência de *T. koningii* especialmente para o isolado Tw6 nos primeiros 10 dias após a infestação do solo nos dois tipos de solo estudados. Entretanto, esta concentração de inóculo foi suficiente para controlar patógenos menores no solo e aumentar a emergência de plantas, conforme ilustra a Figura 10. Os isolados de *T. viride*, nesta fase (10 dias) aumentaram sobremaneira o número de propágulos, especialmente, o isolado T15P, com 1639% em relação ao número original de propágulos. Provavelmente, a grande densidade de inóculo não favoreceu a emergência de plantas quando as sementes foram

Tabela 14 - Sobrevivência de *T. koningii* e *T. viride* após 210 dias no solo. Valores médios em porcentagem de sobrevivência no solo

Isolados	Dias	SOLO AUTOCLAVADO						SOLO NATURAL						
		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA/g DE SOLO						UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA/g DE SOLO						
		Diluição 10 <sup>-4</sup>			Diluição 10 <sup>-3</sup> *			Diluição 10 <sup>-5</sup>			Diluição 10 <sup>-3</sup> *			
1	10	37	79	145	210	210	1	10	37	79	145	210	210	
Tw6	100	26,5	1,10	0,55	9,37	1,93	83,0	100	2,29	0,0	1,63	0,0	0,32	13,0
T15P	100	1639,3	175,0	7,14	3,57	3,57	72,0	100	67,31	80,77	13,46	113,46	0,0	49,0
Tal-1	100	107,2	4,8	2,8	1,60	0,0	71,0	100	36,19	1,90	19,05	0,0	0,32	40,0
Tal- T15P	100	47,5	20,9	9,39	1,93	4,25	61,0	100	38,78	14,29	2,04	9,8	0,0	46,0
CNP311A	100	65,3	79,9	17,60	0,0	0,5	37,0	100	15,47	1,80	2,16	0,35	0,0	17,0

\* Valores médios referentes a diluição em série na concentração 10<sup>-3</sup> correspondem aos dados originais de contagens do número de colônias em meio de Martin modificado para *Trichoderma* sp. (HOMECHIN, 1987), em 4 repetições.

tratadas com T15P, em solo autoclavado. No entanto, em solo natural este isolado que apresentou percentuais mais baixos de unidades formadoras de colônias/g de solo foi o mais eficiente na emergência de plântulas.

No geral, as populações foram substancialmente reduzidas porém, o isolado Tw6 que apresentou os mais baixos percentuais de sobrevivência do ensaio, por outro lado, alcançou resultados mais positivos em termos de melhoria na germinação de sementes e no vigor das plântulas de berinjela.

Conforme PAPAVIDAS (1985), as espécies de *Trichoderma* podem sobreviver em muitos nichos ecológicos dependendo das condições predominantes e do potencial genético do organismo.

#### 4.5. Experimento V

##### 4.5.1. Bioensaio em condições de campo

Os isolados de *Trichoderma* spp. empregados neste estudo foram eficientes na redução do inóculo de *V. dahliae*, após 109 dias. A quantidade de doença foi de 5% (CNP17), 8% (CNP311A) e 13% (T15P) de acordo com a Figura 1.

Para que o biocontrole de patógenos seja bem sucedido torna-se necessário o favorecimento do antagonista através de vários fatores: substrato adequado para o desenvolvimento e ativação da produção de enzimas líticas

e/ou antibióticos, temperatura e pH, quantidade e idade do inóculo, modo de inoculação e genótipo do organismo.

Os isolados de *Trichoderma* testados foram superiores genotipicamente no tocante ao crescimento e produção de antibióticos em vários níveis de temperatura com exceção do isolado CNP17 (*T. harzianum*) que não foi empregado no teste anterior (item 4.1.4). JOHNSON *et alii* (1987) relataram que *T. harzianum* possui boa adaptação em regiões de clima quente. Os isolados CNP311A (*T. koningii*) e T15P (*T. viride*) apresentaram bons resultados em temperaturas baixas (13 e 18°C). Já que este ensaio foi instalado no inverno (julho) e deveria estender-se até a frutificação (dezembro) fez-se necessário estudar o desempenho desses isolados em uma ampla faixa de temperatura, sendo de 13 a 32°C. É conhecido que a incidência da murcha verticilar em berinjela é mais acentuada em temperaturas amenas, podendo estender também em temperaturas mais altas. Os isolados de *Trichoderma* testados foram capazes de crescer na mesma faixa de temperatura de *V. dahliae*, conforme foi descrito anteriormente.

Em geral, os efeitos de pH foram mais pronunciados na produção de metabólitos do que no desenvolvimento das colônias. De acordo com CHET & BAKER (1981), HARMAN & TAYLOR (1988), a germinação de propágulos de *Trichoderma* spp. é mais favorecida em condições ácidas

Quanto a *V. dahliae*, DUTTA (1981b) observou que, em condições de laboratório a faixa de crescimento foi

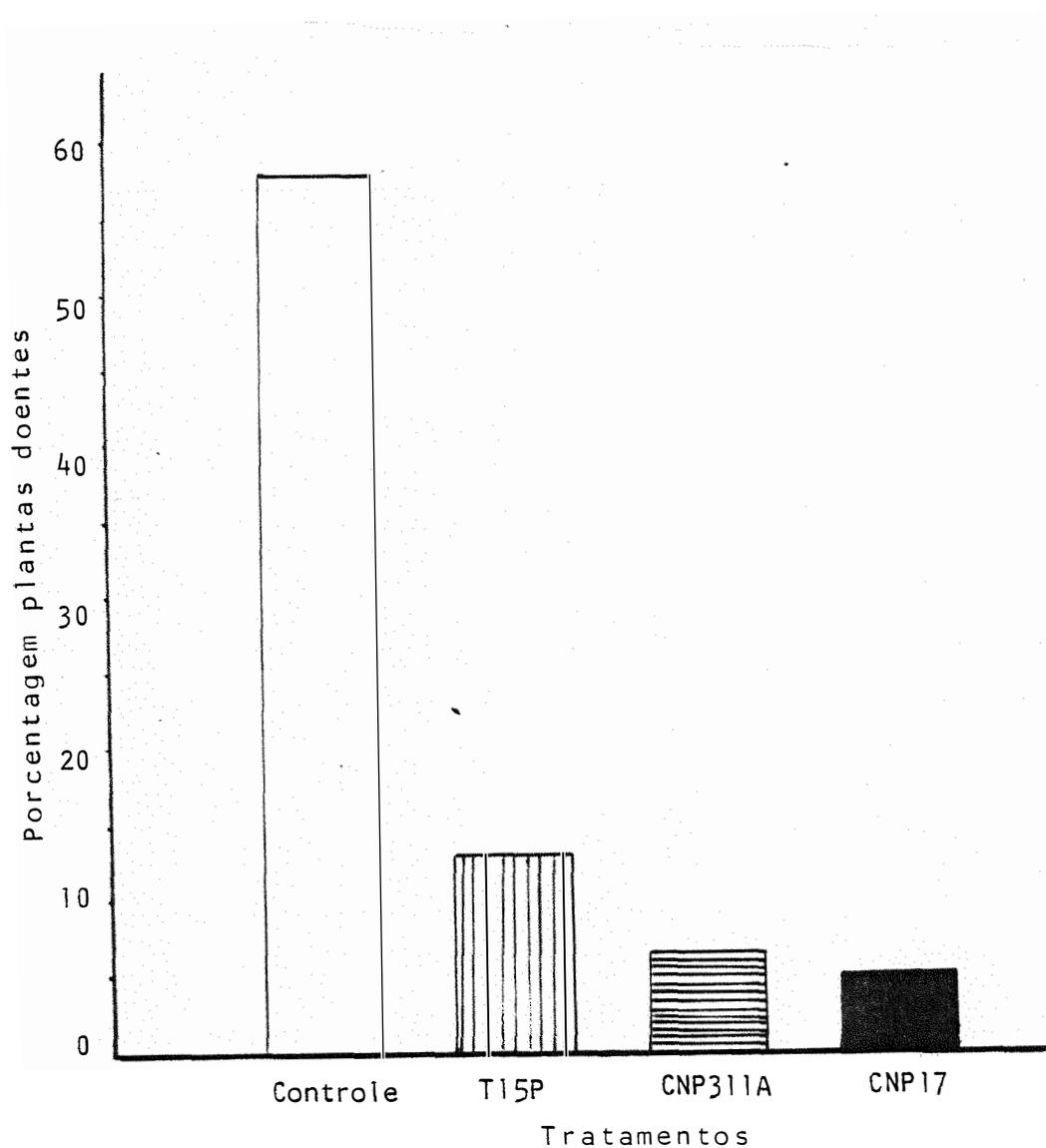


Figura 11 - Bioensaio em condições de campo com o híbrido F100. Valores expressos em porcentagem de plantas com sintoma de murcha, em 5 repetições/tratamento após 109 dias.

de pH 3,5 a 10,5. Entretanto, o pH 5,5 proporcionou o melhor crescimento. Por outro lado, a severidade da murcha foi maior em solo alcalino.

A incidência de doença na testemunha foi relativamente baixa, apesar da intensa patogenicidade do isolado IM<sub>1</sub> (60%). Isto provavelmente pode ser atribuído ao pH do solo: 4,5

Por outro lado, os antagonistas foram beneficiados pelas condições ácidas do ambiente.

O modo de inoculação é outro fator igualmente importante para alcançar a eficiência do controle de doenças de solo. As covas de plantio receberam primeiramente o inóculo do patógeno e posteriormente, o inóculo do antagonista. Desta maneira, as raízes das plantas puderam entrar em contato com o antagonista, inicialmente. O mesmo não ocorreu na testemunha, pois, as plantas foram transplantadas para as covas entrando diretamente em contato com o patógeno. Nos testes realizados anteriormente em condições de campo, após a infestação das covas de plantio com *V. dahliae*, foi acrescentado na testemunha milho-pipoca esterilizado na mesma proporção dos antagonistas. Assim, os microrganismos nativos, provavelmente, ocuparam essa base alimentar e antagonizaram *V. dahliae*. Daí, a razão pela qual a quantidade de doença na testemunha ter sido bastante reduzida (teste não descrito neste estudo).

O controle biológico de patógenos que causam doenças vasculares pode ser mais difícil de ser alcançado pois, o fungo infecta a planta em qualquer fase de seu desen-

volvimento (SCHROTH & HANCOCK, 1981). Também, os sintomas podem vir a se manifestarem mais tardiamente (CATANI & PETERSON, 1967).

A avaliação da reação do hospedeiro efetuada no 70º dia após a infestação dos fungos no solo mostrou que o isolado CNP17 controlou completamente a murcha verticilar, enquanto que a quantidade de plantas doentes foi de 2,5% com o isolado CNP311A, com o isolado T15P foi de 10% e com a testemunha foi de 35%. Pode-se observar que a incidência da murcha neste último sofreu um maior incremento na avaliação final - 60% (Figura 11). Nos demais tratamentos o acréscimo de plantas doentes foi menor. Com o isolado T15P ocorreu uma redução de plantas doentes da primeira para a segunda avaliação. Isto pode ser atribuído ao ataque de outros organismos (insetos, por exemplo) nas parcelas.

Se os antagonistas são capazes de sobreviver e controlar *V. dahliae*, sugere-se estudos mais detalhados no sentido de integrar eficientes agentes de biocontrole, fungicidas e variedades de berinjela com níveis de resistência visando atenuar a severidade da murcha verticilar em berinjela. Também necessitariam ser testados aqueles isolados de *Trichoderma*, os quais foram eficientes nos testes *in vitro* em confrontação direta, embora, não tivessem sido capazes de produzir antibióticos eficientemente nos testes de antibiose, pois, o mecanismo de ação destes pode ser o parasitismo ao invés de antibiose.

De acordo com DENNIS & WEBSTER (1971c) a antibiose é inversamente proporcional ao parasitismo.

Os isolados de *Trichoderma* spp. testados apresentaram bons resultados quanto à sobrevivência no solo, produção de metabólitos tóxicos capazes de afetar os propágulos de *V. dahliae*, resistência a temperaturas extremas e estabilidade metabólica.

KENNERLY & STACK (1987) listou estas quatro características essenciais para iniciar-se um programa de melhoramento de linhagens de *Trichoderma* visando controlar doenças causadas por fungos que produzem esclerócios. Reunir estas características em um só organismo, seja por fusão de protoplasto ou pela clonagem de genes não é a opinião de BAKER (1987b). O autor acredita que vários organismos com características desejáveis seriam mais eficientes pois, quanto maior é a complexidade em um ecossistema maior é a sua estabilidade.

A obtenção de novos biótipos através de agentes mutagênicos tem auxiliado a elucidar alguns pontos chave no desempenho de agentes de biocontrole, como aqueles biótipos desenvolvidos por AHMED *et alii* (1987) resistentes a fungicidas e potentes colonizadores de rizosfera. Desta maneira, alguns estudos deveriam ser conduzidos no sentido de evidenciar mais detalhadamente a competência de isolados de *T. viride*, *T. harzianum* e *T. koningii* na rizosfera de berinjela. Assim, as mudas poderiam ser transplantadas para o campo já pré-colonizadas com estes antagonistas.

## 5. CONCLUSÕES

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

1. os antagonistas eficientes produtores de metabólitos voláteis (Tal-1, T15P, CNP311A e Tw6) e não voláteis (CNP17, CNP311A, Tal-1, T15P, Tw6 e TC11) foram capazes de exterminar *V. dahliae* em meio de extrato de malte e milho pipoca;

2. os mecanismos de parasitismo de *Trichoderma* foram especialmente lise de hifas, enrolamentos de hifas, crescimento paralelo de hifas parasitas e hospedeiras, formação de ganchos e rede de hifas;

3. a faixa ótima para crescimento e produção de antibióticos de *T. koningii* e *T. viride* é de 28°C. Quanto ao pH existe uma preferência para os níveis mais ácidos, principalmente para a produção de metabólitos;

4. os antibióticos produzidos por *T. koningii* e *T. viride* podem inibir seu próprio metabolismo.

5. *T. koningii* e *T. viride* favoreceram a emergência de plântulas de berinjela, possivelmente, devido ao controle de patógenos menores em solo natural, exceto para o isolado T15P, que mostrou um efeito antagônico em relação a RVIII. *T. koningii* foi mais eficiente do que *T. viride* no desenvolvimento de plantas de berinjela;

6. os agentes de biocontrole *T. viride* e *T. koningii* podem sobreviver no solo durante o ciclo da cultura de berinjela; e controlarem ou reduzirem a incidência da murcha.

7. o isolado CNP17 (*T. harzianum*) foi eficiente na redução do inóculo de *V. dahliae* em condições naturais de campo, proporcionando o controle da doença em 95%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Implication of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 34:229-34, 1988.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, St. Paulo, 77:182-9, 1987a.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Competitive saprophytic ability and cellulosytic activity of rhizosphere - competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, St. Paul, 77: 358-62, 1987b.
- AKHTAR, C.M. Biological control of some plant disease lacking genetic resistance of the host crops in Pakistan. *Annals of the New York Academic of Science*, New York, 45-56, 1977.
- ALEXANDER, M. *Microbial Ecology*, New York, John Wiley & Sons. 358p., 1977.
- AUBE, C. & GAGNON, C. Effect of carbon and nitrogen nutrition of growth and sporulation of *Trichoderma viride* Pers.ex Fries. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 15:703-6, 1969.
- BAKER, R. Biological control: an overview. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ontario, 8:218-21, 1986.
- BAKER, R. Mycoparasitism: ecology and physiology. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ontario, 9:370-9, 1987a.

- BAKER, K.F. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, 25:67-85, 1987b.
- BARAK, R.; ELAD, Y.; MICRELMAN, C. & CHET, I. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, St. Paul, 75:458-62, 1985.
- BARNETT, H. L. The nature of mycoparasitism by fungi. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, 17:1-14, 1963.
- BARNETT, H. L. & BINDER, F.L. The fungal host-parasite relationship. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 16:273-292, 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, 72:379-82, 1982.
- BETTIOL, W. Efeito da aplicação de fungicidas no controle biológico de doenças de plantas. *Anais da II Reunião sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas*, Piracicaba, SP., 14-16 outubro, 1987.
- BHARAT, R.; SINGH, V.N. & SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. *Plant and Soil*, Holanda. 57:131-5, 1980.
- BOOSALIS, M.C. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 2:363-75, 1963.
- BOWEN, G.D. & ROVIRA, A.D. Microbial colonization of plant roots. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 14:121-44, 1976.

- BRUEL, G.W. Soil-borne plant pathogens. New York, Macmillan Publishing Company, 1986, 368p.
- CAMPOROTA, P. Antagonisms *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie, Paris*, 5:613-20. 1985.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Oxford, 24:270-6, 1937.
- CATANI, S.C. & PETERSON, J.L. Antagonistic relationships between *Verticillium dahliae* and fungi isolated from the rhizosphere of *Acer platanoides*. *Phytopathology*, St. Paul, 57:363-6, 1967.
- CHANG, Y.C.; CHANG, Y.C. & BAKER, R. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, Beltsville, 70:145-148, 1986.
- CHAO, W.L.; NELSON, E.B. & HOCH, H.C. Colonization of rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology*, St. Paul, 76:60-5, 1986.
- CHET, I. & BAKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 71:286-90. 1981.
- CHET, I. & ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. In: Les Antagonismes Microbiens. Mode d'action et application a la lutte biologique contre les maladies des plantes. Bordeaux, mai 1983, Colloque de l'I.N.R.A., 18:35-40, 1983.

- CHET, I.; HENIS, Y. & MITCHELL, R. Chemical composition of hyphal and sclerotial cells of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 13:137-41, 1967.
- CHET, I. & HENIS, Y. *Trichoderma* as a biocontrol agent against soilborne root pathogens. *Ecology and Management of Soil Borne Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society, St. Paul, 110-2, 1983.
- CHET, I. & HENIS, Y. Effect on catechol and disodium EDTA on melanin content of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and the role of melanin in the susceptibility of these walls to  $\beta$ -(1,3) glucanase and chitinase. *Soil Biology & Biochemistry*, New York, 1:31-8, 1985.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogen. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983, 539p.
- CONWAY, W.S. *Trichoderma harzianum*: a possible cause of decay in storage. *Plant disease*, Beltsville, 67:916-7, 1983.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. Londres, 57:25-39, 1971a.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics *Transactions of the British Mycological Society*, Londres, 57:41-8, 1971b.

- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, Londres, 57: 363-9. 1971c.
- DUTTA, K. Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of *Verticillium* wilt. *Plant and Soil*, Holanda, 63:209-16, 1981a.
- DUTTA, B.K. Effect of the chemical and physical condition of the soil on *verticillium* wilt of *antirrhinum*. *Plant and soil*, Holanda, 63:217-25, 1981b.
- ELAD, Y.; BARAK, R. & CHET, I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology & Biochemistry*, New York 16:381-6, 1984.
- ELAD, Y.; CHET, I & HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 28:719-25, 1984.
- ELAD, Y.; SADOWSKY, Z. & CHET, I. Scanning electron microscopical observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Transactions of the British Mycological Society*, Ottawa, 88:259-62, 1987.
- FARLEY, I.D.; WILHELM, S. & SNYDER, W.C. Repeated germination and sporulation of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, 61:260-4, 1971
- FORDYCE JR. & GREEN, R.J. Mechanism of variation in *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*, St. Paul, 54:795-8, 1964.

- FRAVEL, D.R.; KIM, K.K. & PAPAVIDAS, G.C. Viability of micro-esclerotial of *Verticillium dahliae* reduced by a metabolite produced by *Talaromyces flavus*. *Phytopathology*, St. Paul, 77:616-19, 1987.
- GERIK, J.S. & HUISMAN, O.C. Mode of colonization of roots by *Verticillium* and *Fusarium*. *Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society, St. Paul, 80-3, 1985.
- HADAR, Y.; CHET, I. & HENIS, I. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 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, 74:106-10, 1984.
- HANSEN, E.M. Speciation in plant pathogenic fungi: the influence of agricultural practice. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa, 9:403-10, 1987.
- HARMAN, G.E.; CHET, I. & BAKER, R. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. *Phytopathology*, St. Paul, 71:569-72, 1981.
- HARMAN, G.E. & TAYLOR, A.G. Improved seedling performance by integration of biological control agents at favorable pH levels with solid matrix priming. *Phytopathology*, St. Paul, 78:520-5, 1988.

- HENIS, Y.; LEWIS, J.A. & PAPAIVIZAS, G.C. Interactions between *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma* spp. relationship between antagonism and disease control. *Soil Biology & Biochemistry*, New York, 16(4):371-5, 1984.
- HOMECHIM, M. Potencial e emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum*, Rifai, para controle de patógenos de soja *Glycine max* (L.) Merrill. Piracicaba, 1987. 186p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- JOHNSON, L.F.; BERNARD, E.C. & QIAN, P. Isolation of *Trichoderma* spp. at low temperatures from Tennessee and Alaska soils. *Plant Disease*, Beltsville, 71:137-40, 1987.
- JORDAN, V.W. & TARR, H.S. Inoculum suppression of *Verticillium dahliae*. *Annual of Applied Biological*. Cambridge, 89:139-41, 1978.
- KEMERLEY, C.M. & STACK, J.P. Influence of assessment methods on selection of fungal antagonists of the sclerotium-forming fungus *Phymatotrichum amnicorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 33:632-5, 1987.
- KRAFT, J.M. & PAPAIVIZAS, G.C. Use of host resistance, *Trichoderma*, and fungicides to control soilborne diseases and increase seed yield of peas. *Plant Disease*, Beltsville, 67 :1234-7, 1983.

- KRIKUN, J. & BERNIER, C.C. Infection of several crop species by two isolates of *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ontario, 9:241-5, 1987.
- LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, G.C. A new approach to stimulate population of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soil. *Phytopathology*, St. Paul, 74:1240-4, 1984.
- LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, G.C. Chlanudospore formation by *Trichoderma* spp. in natural substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 30:1-7, 1984.
- LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, G.C. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. *Phytopathology*, St. Paul, 75:812-17, 1985.
- LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, G.C. Reduction of inoculum of *Rhizoctonia solani* in soil by germlings of *Trichoderma hamatum*. *Soil Biology & Biochemistry*, New York, 19:195-201, 1987.
- LIU, S. & BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 70:404-12, 1980.
- MAROIS, J.J.; FRAVEL, D.R. & PAPAVIDAS, G.C. Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere and its interaction with *Verticillium dahliae*. *Soil Biology & Biochemistry*, New York, 16:387-90, 1984.

- MAROIS, J.J.; JOHNSTON, S.A.; DUNN, M.T. & PAPAIVIZAS, G.C.  
Biological control of *Verticillium* wilt of eggplant in the field. *Plant Disease*, Beltsville, 66:1166-8, 1982.
- MAROIS, J.J. & LOCKE, J.C. Population dynamics of *Trichoderma viride* in steamed plant growth medium. *Phytopathology*, St. Paul, 75:115-8, 1985.
- MAROIS, J.J.; MITCHELL, D.J. & SONODA, R.M. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. *Phytopathology*, St. Paul, 71:1257-60, 1981.
- MARSHALL, O.S. Effect of *Trichoderma harzianum* seed treatment and *Rhizoctonia solani* inoculum concentration on damping-off of snap bean in acidic soil. *Plant Disease*, Beltsville, 66:788-9, 1982.
- MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, Ottawa, 134:215-30, 1950.
- McFADDEN, A.G. & SUTTON, J.C. Relationship of populations of *Trichoderma* spp. in soil to disease in maize. *Canadian Journal Plant Science*, Ottawa, 55:579-86, 1975.
- MELO, I.S. Reação de berinjela (*Solanum melongena* L.) a *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth. sob os aspectos de herança, patogenicidade, controle fitohormonal e biológico. Piracicaba, 1984. 142p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" USP).

- 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, 76:306-12, 1986.
- MOYTY, A.; PAPAIVIZAS, G.C. & SHATA, 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.
- NELSON, E.B.; HARMAN, G.E. & NASH, G.T. Enhancement of *Trichoderma*-induced biological control of pythium seed rot and pre-emergence damping-off of peas. *Soil Ecology & Biochemistry*, New York, 20:145-50, 1988.
- NELSON, E.B.; KUTER, G.A.; HOITINK, H.A.J. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology*, St. Paul, 73:1457-62, 1983.
- NOL, L. & HENIS, Y. Effect of spore concentration on germination and autotropism in *Trichoderma hamatum*. *Plant and Soil*, Holanda, 100:285-95, 1987.
- O'BRIEN, M.J. Evaluation of eggplant accessions and cultivars for resistance to *Verticillium* wilt. *Plant Disease*, Beltsville, 67:763-4, 1983.

- PAPAVIZAS, G.C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizosphere. *Phytopathology*, St. Paul, 71:121-5, 1981.
- PAPAVIZAS, C.G.; LEWIS, J.A. & MOITY, T.H.A-E. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology*, St. Paul, 72:126-32, 1982.
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 23:23-54, 1985.
- PERRY, J.W. & EVERT, R.F. Histopathology of *Verticillium dahliae* within mature roots of Russet Burbank potatoes. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 61:3405-3421, 1983.
- PERRY, J.W. & EVERT, R.F. Structure of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in roots of "Russet Burbank" potatoes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ontario, 62:396-401, 1984.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. 9a.ed. São Paulo. Livraria Nobel S.A. 430p., 1981
- RAI, B.; SINGH, V.N. & SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. *Plant and Soil*, Holanda, 57:131-5, 1980.
- RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, Indonésia, 116:1-66, 1969.
- ROVIRA, A.D. & McDOELL, B.M. Microbiological and biochemical aspects of thizosphere McClarem, A.D. Ed. *Soil Biochemistry*, New York, 416-63, 1981.

- SANTOS, A.F. dos & DHINGRA, O.D. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 60:472-5, 1982.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1:231-233, 1975.
- SCHIPPERS, B.; MEIJER, J.W. & LIEM, J.I. Effect of ammonia and other soil volatiles on germination and growth of soil fungi. *Transaction of the British Mycological Society*, Londres, 79:253-9, 1982.
- SCHREIBER, L.R. & GREEN, R.J. Comparative survival of mycelium, conidia, and microsclerotia de *Verticillium albo-atrum* in mineral soil. *Phytopathology*, St. Paul, 52:288-9, 1962.
- SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, 35:453-76, 1981.
- SILVA, G.S. da & TOKESHI, H. Reação de algumas ervas daninhas a *Verticillium albo-atrum*. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, SP., 5:85-9, 1979.
- SIMON, R.W.; DUNLOP, R.W.; GHISALBERTI, E.L. & SIVASITHAMPARAM, K. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil Biology & Biochemistry*, New York, 20:263-4, 1988.
- SIVAN, A. & CHET, I. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Phytopathology*, Berlin, 116:39-47, 1986.

- SIVAN, A.; ELAD, Y. & CHET, I. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology*, St. Paul, 7:498-501, 1981.
- SIVAN, A.; UCKO, O. & CHET, I. Biological control of fusarium crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease*, Beltsville, 71:587-92, 1987.
- SMONTINA, G.E. & GORLENKO, M.V. Morphological variability of the causal agent of *Verticillium* wilt under different nutritional conditions. *Review of Applied Mycology*, London, 47:17, 1968.
- STACK, J.P.; KENERLEY, C.M. & PETTIT, R.E. Influence of carbon and nitrogen sources, relative carbon and nitrogen concentrations, and soil moisture on the growth in nonsterile soil of soilborne fungal antagonists. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 33:626-3, 1987.
- TAYLOR, G.S. & PARKINSON, D. The growth of saprophytic fungi on root surfaces. *Plant and Soil*, Holanda, 15:261-7, 1961.
- TERANISIH, J.; FIGUEIREDO, M.B. CARDOSO, R.M.G. & NAMEKATA, T. The value of serological techniques for the differentiation between *Verticillium albo-atrum* Reink & Berth. and *V.dahliae* Kleb. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, São Paulo, 40:45-51, 1973.

- TOKESHI, H.; VALDEBENITO, R.M.; SOUZA, N.L. de e YOKOMIZO, N.K.S.  
Controle biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. por *Trichoderma* sp. em cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 6:95-101, 1980.
- TROSMO, A. *Trichoderma harzianum* used as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on apple. In : Les Antagonismes Microbiens. Mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. Bordeaux, Mai 1983, Colloque de l'I.N.R.A., 18:109-13, 1983.
- VAJNA, L. Phytopathogenic *Fusarium oxysporum* Schlecht as a necrotrophic mycoparasite. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 114:338-47, 1985a.
- VAJNA, L. Mutual parasitism between *Trichoderma hamatum* and *Trichoderma pseudoKoningii*. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 113:300-3, 1985b.
- VIEGAS, A.P. A murcha do algodoeiro. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 14:449-556, 1939.
- WATANABE, N.; LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, G.C. Influence of nitrogen fertilizers on growth, spore production and germinated and biocontrol potential of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Journal of Phytopathology*, Berlin, 120:337-46, 1987.
- WEINDLING, R. Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*, St. Paul, 24:1153-79, 1934.

- WHIPPS, J.M. Behaviour of fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on plant tissue segments. *Journal of General Microbiology*, Ottawa, 133:1495-50, 1987.
- WILHELM, S. Aerial microesclerotia of *Verticillium* resulting from conidial anastomosis. *Phytopathology*, St. Paul, 44: 609-10, 1954.
- WINDELS, C.E.; KOMMEDAHL, T.; SARBINI, G. & WILEY, H.B. The role of seeds in the delivery of antagonists into the rhizosphere. *Ecology and Management of Soil Borne Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society, St. Paul, 141-3, 1983.
- WINDHAN, M.T.; ELAD, Y. & BACKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76:518-21, 1986.

APÉNDICE

Tabela 1 - Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficiente de variação da análise da variância dos testes de antagonismo em confrontação direta com *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*. Piracicaba, SP. 1988.

Fontes de Variação	GL	Isolado IM <sub>1</sub>	Isolado IM <sub>2</sub>	Isolado IM <sub>3</sub>
		QM	QM	QM
Tratamentos	18	0,844**	1,544**	0,962**
Resíduo	38	0,320	0,478	0,119
Total	56			
Média		8,84	9,06	8,71
CV (%)		6,39	7,63	3,96
Transformação: $\sqrt{x}$				
Unidade: x = %C; onde %C = DT/DE x 100				

\*\* : significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste F

Tabela 2 - Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação da análise da variância dos testes de antibiose. Piracicaba, SP. 1988.

Fontes de Variação	GL	Testador IM <sub>1</sub>		Testador IM <sub>2</sub>		Testador IM <sub>3</sub>	
		QM		QM		QM	
		I	II	I	II	I	II <sup>1</sup>
Tratamentos	19	2,34*	14,34**	2,26*	9,66**	3,76	7,89**
Resíduo	40	0,09	0,94	0,11	0,24	0,13	0,33
Total	59						
Média		6,53	3,84	7,05	4,98	6,32	5,03
CV (%)		4,55	25,34	4,65	9,90	5,77	11,43

<sup>1</sup> I e II representam os valores dos quadrados médios de diâmetro de colônia de *Trichoderma* spp. e diâmetro do halo de inibição, respectivamente

\*\* : significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* : significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 3 - Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação da análise de variância do Teste de influência de pH e temperatura no crescimento e na produção de metabólitos de *Trichoderma* spp. Piracicaba, SP. 1988.

Fontes de Variação	Colônia	
	GL	QM
Temperatura (T)	2	197,61**
pH	2	0,09 <sup>ns</sup>
Isolados	3	8,15**
T x pH	4	0,34 <sup>ns</sup>
T x I	6	3,42**
pH x I	6	1,07**
T x pH x I	12	0,36 <sup>ns</sup>
Resíduo	72	0,27
Média		3,57
CV (%)		14,62

· Dados originais de diâmetro médio de colônia em 3 repetições  
 \*\*: significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F  
 ns: não significativo

Tabela 4 - Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficiente de variação da análise da variância do teste de influência de temperatura e pH no crescimento e produção de metabólitos por *T. viride* e *T. koningii*. Piracicaba, SP. 1988.

Fontes de Variação	Halo de inibição			
	Isolado Tal-1		Isolado CNP311A	
	GL	QM	GL	QM
Testemunha (T)	3	25,892**	4	69,957**
pH	2	5,388**	2	4,782**
T x pH	6	1,035**	8	0,887ns
Resíduo	24	0,260	30	0,652
Média		5,18		5,21
Coefficiente de variação(%)		9,85		15,50

\*\* : significativo ao nível de 1% de probabilidade

ns : não significativo

Tabela 5 - Análise de variância do teste de influência de metabólitos voláteis no crescimento de *V. dahliae*. Valores percentuais de colonização. Piracicaba, SP. 1988

Fontes de Variação	GL	QM <sup>1</sup>
Tratamentos	4	2,576**
Resíduo	15	0,1273
Total	19	

CV (%): 8,3

\*\* : significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste F

<sup>1</sup> : valores transformados em  $\sqrt{x}$

Tabela 6 - Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficiente de variação da análise da variância do teste de auto inibição por metabólitos de *Trichoderma* spp.. Piracicaba, SP. 1988.

Fontes de Variação	GL	QM
Blocos	3	0,300 <sup>ns</sup>
Tratamentos	19	13,457**
Resíduo	57	0,201
Total	79	
CV (%)		10,00

\*\* : significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste F  
 ns : não significativo.

Tabela 7 - Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação da análise de variância do Experimento III: Influência de *T. koningii* e *T. viride* no desenvolvimento de plantas em solo autoclavado. Piracicaba, SP. 1988.

Fontes de Variação	GL	Peso seco	Altura
		QM	QM
Blocos	4	0,80 <sup>ns</sup>	82,55**
Cultivares (Cv)	1	5,23**	0,05 <sup>ns</sup>
Isolados (I)	5	1,83**	82,65*
Cv x I	5	0,69 <sup>ns</sup>	58,26 <sup>ns</sup>
Resíduo	44	0,39	29,16
Média		1,38	27,99
CV (%)		45,80	19,70

\* e \*\*: significativos aos níveis de 1% e de 5% de probabilidade pelo teste F

ns : não significativo

Tabela 8 - Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação da análise de variância do Experimento III: Influência de *T. koningii* e *T. viride* no desenvolvimento de plantas em solo natural. Piracicaba, SP., 1988.

Fontes de Variação	GL	Peso seco	Altura
		QM	QM
Blocos	4	0,396 <sup>ns</sup>	27,503 <sup>ns</sup>
Cultivares (Cv)	1	4,954 <sup>**</sup>	15,811 <sup>ns</sup>
Erro (A)	4	1,400 <sup>ns</sup>	43,060 <sup>ns</sup>
Parcela	11		
Isolados (I)	5	3,118 <sup>**</sup>	185,192 <sup>**</sup>
I x Cv	5	0,546 <sup>ns</sup>	24,553 <sup>ns</sup>
Erro (B)	40	0,671	
Média		2,08	33,88
CV (%)		39,30	15,80

\*\* e ns: significativo ao nível de 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F

Tabela 9 - Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação da análise de variância do Experimento IV - Sobrevivência de *T. koningii* e *T. viride* na rizosfera de berinjela. Piracicaba, SP. 1988.

Fontes de Variação	Ensaio I		Ensaio II	
	GL	QM	GL	QM
Blocos	-	-	7	0,160 <sup>ns</sup>
Isolados (I)	3	0,063 <sup>ns</sup>	3	0,308*
Cultivar (Cv)	1	0,014 <sup>ns</sup>	1	0,018 <sup>ns</sup>
I x Cv	3	0,0187 <sup>ns</sup>	3	0,092
Resíduo	17	0,008	49	
Média		243,75		199,75
CV (%)		3,91		13,80
Transformação		log x		log x

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns: não significativo

Tabela 10 - Análise química de solo (terra roxa estruturada)

Nº de análises	pH	%							ppm				
		N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn	H+Al	
1	6,25	-	85,8	0,33	3,15	1,27	4,8	-	-	-	-	1,41	
2	7,25	0,33	142,0	1,15	3,38	1,76	6,3	0,17	33,10	1,18	0,46	0,87	
3	7,25	0,70	236,5	3,30	6,80	4,43	14,5	0,43	0,20	21,78	2,05	0,87	

\* O número (1)-corresponde ao solo (mistura) empregado no teste de antagonismo (II); infestação (posterior) do solo com *V. dahliae*; o número (2) corresponde ao solo (mistura) autoclavado empregado no teste de antagonismo (III); infestação simultânea com *V. dahliae* e *Trichoderma* spp. e também ao teste de influência de *Trichoderma* spp. na germinação e desenvolvimento de plantas. O número (3) corresponde ao teste de influência de *Trichoderma* spp. na germinação e desenvolvimento de plantas, em solo natural.

