CONTROLE BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae* E PROPRIEDADES CITOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS E ANTAGÔNICAS DO MICOPARASITA *Talaromyces flavus*.

ERI SATO SAITO

(Engenheiro Agrônomo)

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo -Brasil
Fevereiro de 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Saito, Eri Sato
S158c Controle biológico de *Verticillium dahliae* e propriedades citológicas, fisiológicas e antagônicas do micoparasita *Talaromyces flavus*. Piracicaba, 1994.
106p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Fungo para controle biológico 3. Fungo fitopatogênico - Controle biológico I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.24

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae* E PROPRIEDADES CITOLÓGICAS FISIOLÓGICAS E ANTAGÔNICAS DO MICOPARASITA *Talaromyces flavus*.

ERI SATO SAITO

Aprovada em : 15/04/1994

Comissão julgadora:

PROF.DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO	ESALQ/USP
PROF.DRA. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER	ESALQ/USP
DRA. RAQUEL GUINI	CNPMA/EMBRAPA

PROF.DR.JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

-Orientador-

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que , direta ou indiretamente contribuiram para a realização deste trabalho e, em particular:

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação e confiança constantes.

Ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo pelas sugestões, colaboração e confiança constantes;

À Dra. Raquel Ghini por ter proporcionado um aprendizado inestimável e carinhosa convivência;

Ao Dr. Pedro José Valarini pelas sugestões e amizade;

À Dra. Rosa Friguetto pelas sugestões e amizade;

À Dra. Deise Maria Fontana Capalbo pelas sugestões e amizade;

Aos colegas de laboratório de Fitopatologia, Química Analítica, Formulações e Setor de Campo Experimental do CNPMA/EMBRAPA, pela inestimável convivência e colaboração constantes;

Aos Professores, Funcionários e Amigos dos Departamentos de Genética e Fitopatologia da ESALQ\USP, pelo saudável convívio;

Aos Funcionários e Amigos da Divisão de Biblioteca e Documentação da ESALQ\USP pela presteza e perfeição no atendimento ;

Aos Funcionários e amigos do Centro de Informática na Agricultura (CIAGRI\USP) pela colaboração constante;

Aos Biólogos Marcelo Valim; João Phamphille; Sonia

E. Lopez; Eloiza Perez; Fernando Soares, pela carinhosa amizade;

Ao Engenheiro Agronômo Eduardo Lazaretti, pelas sugestões e amizade;

Ao Gustavo Coral, Engenheiro Agronômo, pelo auxílio constante .

Aos analistas de sistemas Carlos S.D. Ortigoso, Ana Paula A. Almada, Wilson F. Paiva pela colaboração constante;

À bióloga Ana Paula Geraldes pela colaboração e carinhosa amizade;

Ao Departamento de Genética, Departamento de Fitopatologia e Coordenação do curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, por terem propiciado o treinamento.

À CAPES , pelo auxílio concedido;

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação do Impacto Ambiental/(CNPMA/EMBRAPA), pela disposição dos laboratórios de Fitopatologia, Química Analítica, Fermentação e Formulação, Setor de computação para a realização deste trabalho.

À Fundacão Tropical André Tosello pelo treinamento em Taxonomia do Gênero *Talaromyces*.

À todos que manifestaram colaboração , apoio, incentivo ou crítica, no sentido de motivar a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO..... 1

SUMMARY..... 3

1.INTRODUÇÃO..... 4

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 6

2.1. Controle biológico de doenças de plantas.... 6

2.2. Mecanismo de parasitismo..... 8

2.3. *Verticillium dahliae*- agente causal da murcha em berinjela (*Solanum melongena*) 12

2.4.Aspectos biológicos e taxonômicos de *T. flavus*..... 13

2.5. Controle biológico de *Verticillium* por *T. flavus*..... 16

2.6. Utilização de variabilidade genética induzida..... 17

2.7. Genética de resistência a fungicidas em *T. flavus*..... 19

2.8. Metabólitos produzidos por *T. flavus*..... 23

2.9. Fermentação de agentes de biocontrole..... 29

2.10. Encapsulação de propágulos..... 30

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 37

3.1. Local de investigação..... 37

3.2.Hospedeiro teste..... 37

3.3.Linhagens..... 37
3.4. Meios de cultura e soluções utilizadas..... 37
3.5.Fungicidas..... 41
3.6.Teste de antagonismo em confrontação direta das linhagens de *T. flavus* contra *V. dahliae in vitro*..... 42
3.7.Interação de hifas de *T. flavus*..... 43
3.8.Teste de antibiose das linhagens de *T. flavus* contra *V. dahliae in vitro*..... 44
3.9.Experimento em casa de vegetação, interação em solo natural e esterilizado..... 45
3.10.Crescimento em BDA..... 47
3.11.Produção de micélio seco de *T. flavus IK*... 47
3.12.Produção de metabólitos de *T. flavus* IK (selvagem) e linhagem selecionada..... 48
3.13.Determinação de meio semi seletivo à *T. flavus*..... 48
3.14.Encapsulação de conídios e micélio de *T. flavus*..... 50
3.15.Caracterização citológica das linhagens de *T. flavus*..... 51
3.16.Caracterização para padrão de esterase..... 52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 53
4.1.Teste *in vitro* com linhagens de *T. flavus* contra *V. dahliae*..... 53
4.2.Experimento em casa de vegetação
4.2.1. Teste de antagonismo I: Infestação

de solo com *V. dahliae* em solo esterilizado..... 58
4.2.2.Teste de antagonismo II: Infestação com *V. dahliae* em solo não esterilizado..... 60
4.2.3. Influência da interação de *T. flavus* e *V. dahliae* no desenvolvimento de plantas em solo natural 63
4.3.Crescimento em BDA..... 64
4.4. Produção de micélio de *T. flavus*..... 66
4.5.Otimização da produção de propágulos..... 66
4.6.Extração de metabólitos..... 68
4.7. Determinação de meio semi seletivo a *T. flavus*..... 71
4.8. Encapsulação de conídios de *T. flavus*..... 74
4.9. Caracterização de linhagens de *T. flavus*.... 75
4.9.1.Caracterização citológica..... 75
4.9.2.Caracterização eletroforética..... 79
5. CONCLUSÕES..... 80
6.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA PÁGINA

1. Severidade de doenças na interação de T4 e *Verticillium dahliae*..... 62

2. Ascosporos de *Talaromyces. flavus* coloridas pelo método de TANAKA *et al*.(1979) objetiva de 100 x (contraste de fase) (a)- IK; (b)- IG; (c)- IR; (d)- T30- ascas com ascosporos uninucleados em tetrades (8 ascosporos); (e)- T22; (f)T30..... 77

3. conídios de linhagens de *Talaromyces flavus* coloridos pelo método de Tanaka *et al*, 1979. (a)- T4; (b)-objetiva de 45 x -conídios uninucleados fialide acerosa; (c)- IR-objetiva de 100 x- conídios uninucleados; (d)- T30; (e) cleistotécio de

T22..... 78

4. Caracterização eletroforéticas

de *Talaromyces flavus*

para padrão de esterase..... 79

LISTA DE TABELAS

TABELA PÁGINA

1. Análise química da amostra de solo de floresta..... 45
2. Antagonismo de confrontação direta de linhagens de *Talaromyces flavus* contra *Verticillium dahliae*..... 53
3. Teste de antibiose de linhagens de *Talaromyces flavus* contra *Verticillium dahliae*..... 54
4. Interação de hifas *Talaromyces flavus* e *Verticillium dahliae*..... 55
5. Severidade de doenças em plantas inoculadas com *Verticillium dahliae* nos tratamentos com *Talaromyces flavus*..... 59
6. Severidade de doenças na interação entre *Talaromyces flavus* e *Verticillium dahliae* em solo natural..... 61
7. Influência da interação entre *Talaromyces flavus* e *Verticillium dahliae* no desenvolvimento de berinjela..... 63

8. Crescimento (cm) e esporulação de 6 linhagens de *Talaromyces flavus* em BDA..... 65
9.Produção de micélio seco em meios sintéticos e constituido de resíduos industriais..... 66
10.Efeito de pH no crescimento e produção de micélio seco de *Talaromyces flavus* em Glucose milhocina..... 67
11.Espectro de ação de metabólitos de *Talaromyces flavus* IK(Kew) e T4..... 69
12.Porcentagem de inibição de *S. rolfsii* por metabólitos tóxicos de IK e T4..... 70
13.Sensibilidade de linhagens de *Talaromyces flavus* à fungicidas (valores transformados em Arc seno da raiz de X\100, média de 4 repetições obtidos por meio da porcentagem de redução do crescimento)..... 72
14.Sensibilidade de 4 espéciess de fungos isolados de solo aos fungicidas..... 73
15. Tamanho de conídios e ascosporos e seus respectivos núcleos da

linhagens de *Talaromyces flavus*..... 76

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae* E PROPRIEDADES CITOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS E ANTAGÔNICAS DO MICOPARASITA *Talaromyces flavus*.

AUTORA: ERI SATO SAITO

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar propriedades citológicas, fisiológicas e antagônicas do fungo *Talaromyces flavus* no controle de *Verticillium dahliae*. Para tanto, foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*; seleção de meio de cultura para produção de micélio e esporos em meios sintéticos e constituídos de resíduos industriais; otimização da produção de propágulos em meio selecionado; determinação do espectro de ação de metabólitos de *T. flavus* à patógenos de solo; determinação de meio semi seletivo; encapsulação de propágulos em formulação granulada e caracterização das linhagens.

As linhagens T4 e IG foram eficientes na redução da doença, sendo que a associação T4 x *Verticillium dahliae* apresentou efeito positivo no crescimento das plantas. Metabólitos produzidos pelas linhagens IK e T4 inibiram patógenos de solo, sendo que a linhagem T4 apresentou maior porcentagem de inibição. O meio glucose milhocina possibilitou maior produção de micélio seco e esporos. O meio de cultura determinado através de sensibilidade a fungicidas permitiu

melhor recuperação do antagonista que o meio de cultura pré determinado. A pectina cítrica pode ser utilizada em substituição a alginato de sódio como polímero, e o micélio é um propágulo adequado a formulação granulada.

Biological control of *Verticillium dahliae* and citological, fisiological and antagonic properties of *Talaromyces flavus*.

AUTHOR: ERI SATO SAITO

ADVISER: DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

The objective of the present research was to study citological, fisiological and antagonic properties of *Talaromyces flavus* in the biocontrol of *Verticillium dah*liae. The following related points were considered: antagonism of *Talaromyces flavus* against *Verticillium dahliae* kleb in aubergine *in vitro* and *in vivo;* experimental trials for mass production; improvement of biomass production; performance testing of metabolite produced by *T. flavus* of other soil borne fungi; determination of a semi seletive medium and formulation of the candidate strain. For the disease control T4 and IG strains were the best, among those tested, and the association T4 X *Verticillium dahliae* showed a positive effect on the growth of the plants.Metabolites produced by strains IK and T4 inhibited soil borne fungi . T4 was the best among the strains tested. The media glucose- corn liquor showed to be the best one for biomass and conidia production. The semi seletive media were adequate for quantification of the antagonists. The citrus pectin can be used as substitute of sodium alginate polimer, and the micelia of *T. flavus* was adequate for formulation.

1. INTRODUÇÃO

Embora o controle biológico de microrganismos patógenos de plantas ocorra naturalmente e sendo , em muitos casos, uma das principais razões de certos patógenos não causarem grandes epidemias, ainda não há conhecimento suficiente para explicar como este controle opera na natureza . Também não se conhece o bastante para que os muitos fatores abióticos e bióticos possam ser manipulados para controlar economicamente um patógeno.

A introdução de microrganismos antagonistas no ecossistema é um método alternativo de controlar muitas doenças de raiz, folhas e frutos. *Talaromyces flavus* (Klocker) Stolk & Samsom (Teliomorfo de *Penicillium vermiculatum* Dangeard) tem sido utilizado como antagonista de *Verticillium dahliae* e *Sclerotinia sclerotiorum* (MAROIS et al, 1984;SPINK & ROWE, 1989). Este fungo coloniza a rizosfera de batata, algodão, e berinjela reduzindo a formação, germinação e crescimento de microescleródios de *V. dahliae* e escleródios de *S. sclerotiorum*, através de parasitismo e liberação de metabólitos extracelulares (KIM *et al.*, 1988).

Apesar de existirem estudos de biocontrole com este antagonista sob vários aspectos incluindo os ecológicos e fisiológicos, poucos são os estudos de caracterização genética, fermentação e formulação para uso no controle biológico.

O presente trabalho teve por objetivos: 1.Caracterização citológica e por eletroforese das linhagens de *T. flavus* ;2.Avaliar a capacidade hiperparasítica de *T. flavus* á *V. dahliae*; 3.Desenvolver meios de cultura para crescimento e esporulação de *T. flavus*; 4.Encapsulação de propágulos para utilização em controle de fitopatógenos de solo.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Controle Biológico De Doenças De Plantas

O principal objetivo do controle biológico é o de manter, por meio do emprego de certas práticas e da introdução de uma biomassa de antagonistas, todo o agroecossistema em perfeito equilíbrio constituído pelo hospedeiro cultivado junto com o patógeno e os organismos úteis. Tais níveis de equilíbrio poderão ser alcançados por meio da elaboracão de um sistema integrado de produção, com destaque no controle biológico, sem perda significativa da produtividade agrícola, com vantagem de se obter maior economicidade e menores riscos de impacto no ambiente (ROBBS, 1991).

COOK & BAKER (1983) definiram o controle biológico de fitopatógenos como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizado por, ou através de, um ou mais organismos, exceto o homem.

Como mecanismos controladores estão: a)Uso de indivíduos ou populações não patogênicas ou hipopatogênicas dentro de espécies patogênicas atuando na destruição de propágulo dos patógenos ou, por desalojamento de saprófitas em resíduos de cultura infestados ou mesmo lesões. A principal função é reduzir a virulência e agressividade do patógeno;

b)Manipulação da planta hospedeira empregando-se práticas culturais e/ou microrganismos, tornando sua resistência mais

efetiva por meio de ambiente favorável para interações entre antagonistas e patógenos do solo; c)Emprego de microrganismos antagônicos com capacidade para atuar na sobrevivência e atividade do patógeno.

Os agentes de biocontrole de fitopatógenos devem possuir mecanismos básicos de antagonismo válidos tanto para o rizoplano como para o filoplano, que incluem:

a) Antibiose através da produção de um ou mais metabólitos por um organismo que tenha efeito danoso sobre o outro;

b)Competição geralmente por nutrientes ou sitio de nutrientes;

c)Parasitismo direto ou hiperparasitismo de um microrganismo pelo outro (COOK & BAKER, 1983)

Um campo importante na pesquisa sobre o controle biológico de patógenos é a seleção de organismos antagonistas para fim de uso direto, manipulação genética ou introdução de novos biótipos (PAPAVIZAS *et al.*, 1982) . As principais características dos antagonistas para que sejam eficientes são que possuam capacidade para competir por nutrientes, produzir metabólitos tóxicos ou atuar por parasitismo. Estas características coincidem com as capacidades da espécie *T. flavus* (KIM *et al*, 1988).

T. flavus é largamente distribuido no hemisfério norte e sul, em temperaturas e áreas subtropicais. FRAVEL & ADAMS (1986) isolaram *T. flavus* em 16 países amostrados. O antagonista tem recebido especial atenção nos últimos anos por produzir antibióticos que inibem tumor celular *in vitro* (FUSKA *et al.*,1979a,b) e antiprotozoário (FUSKA *et al.*, 1972), e por

atuar em diferentes processos como produção de exoenzimas e hiperparasitismo de fitopatógenos (FRAVEL *et al.*, 1987).

2.2. Mecanismo De Parasitismo.

As atividades parasíticas que prejudicam outros parasitos de plantas superiores com o objetivo de biocontrole de doenças de plantas foram denominadas hiperparasitismo ou, para aqueles parasitos de fungos, micoparasitismo. Sendo uma forma comum de interação entre muitos grupos de organismos, o parasitismo estabelece relações nutricionais que favorecem a existência do parasita (BARNETT, 1963; BARNETT & BINDER, 1973; BOOSALIS, 1964; GALLI et al., 1978).

As interações nutricionais entre fungo hospedeiro e fungo parasita levou à divisão dos micoparasitos em necrotróficos e biotróficos. A maioria dos micoparasitos é constituida por saprófitas que se caracterizam pelo rápido crescimento sobre diversos substratos (BARNETT,1963).

Os parasitas biotróficos obtêm nutrientes de células hospedeiras vivas e não causam quase nenhum dano ao mesmo . O parasita pode viver inicialmente como parasita biotrófico e por último destruir o protoplasma do hospedeiro como um parasita necrotrófico (BARNETT & BINDER, 1973).

Esta divisão, entretanto, não é bem aceita, pois existem relatos de microrganismos necrotróficos que se comportam como biotróficos quando seu desenvolvimento é

favorecido pela vida ao invés da morte da estrutura do hospedeiro e, em alguns casos, a morte do hospedeiro não ocorre devido à excreção de substâncias tóxicas (AYERS & ADAMS, 1979; BAKER, 1987)

Diversos exemplos de micoparasitismo mostram-se promissores no controle biológico de doenças de fungos do solo. *T. flavus* é um hiperparasita com capacidade de efetivamente reduzir doenças causadas por fitopatógenos (BOOSALIS,1956; FUSKA & FUSKOVA, 1979; MAROIS et al., 1982).

A parede celular de fungos fitopatogênicos é composto de β 1,3 glucana e quitina e, em alguns casos, celulose. *T. flavus* é capaz de crescer sobre patógenos, utilizando sua parede celular como fonte de carbono. Esses antagonistas possuem sistemas enzimáticos capazes de degradar componentes da parede celular através da produção de enzimas hidrolíticas como β1,3 glucanase , celulase e quitinase e outras (CHET & ELAD, 1983)

Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente durante o processo de vida do antagonista. Por exemplo, *Gliocladium* spp. causa a morte e degradação das hifas do hospedeiro pela secreção de antibióticos. Além disso, esses antagonistas enrolam-se ao redor da hifa hospedeira e crescem sobre o conteúdo das células mortas. Desta forma, antibiose e competição se sobrepõem quando microrganismos, em populações mistas, obtém nutrientes pela secreção de metabólitos que prejudicam o crescimento dos competidores (COOK & BAKER, 1983).

BOOSALIS (1956) observou que *T. flavus* invade hifas de *Rhizoctonia solani* diretamente pela produção de grampos de penetração. Estes grampos desenvolvem de micélio que enovelam a hifa ou da hifa em contato com o hospedeiro. DUTTA (1981) sugeriu que o modo de parasitismo envolve antibiose e competição.

Não só o micélio, mas também muitas outras estruturas do hospedeiro são atacadas pelos micoparasitas. Apesar das estruturas de resistência dos fitopatógenos, como cistos, oosporos, microescleródios e esporos, serem resistentes ao ataque por micoparasitas, SU & LEU (1980) demontraram que mais de 70% de escleródios de *Sclerotinia. sclerotiorum* tornaram-se infectados quando inoculados com uma suspensão conidial do hiperparasita e incubados a 24- 26°C por 3 - 6 semanas.

Inicialmente a hifa de *T. flavus* estabelece um contato íntimo com o hospedeiro pelo enovelamento ao redor da hifa do hospedeiro e pela produção de pequenas ramificações da hifa, que penetram na célula hospedeira sem formar apressórios. Muitas das ramificações laterais produzidas pelas hifas situadas próximas ao hospedeiro crescem unilateralmente em direção a hifa de *S. sclerotiorum*. Observa-se frequentemente penetração no hospedeiro. Hifas frequentemente crescem através da célula hospedeira, com ângulo perpendicular. Uma vez que hifas do hiperparasita raramente correm pararelamente às hifas hospedeiras (MCLAREN *et al.*, 1986). A atividade parasítica de *T. flavus* resulta na deterioração da hifa do hospedeiro e

granulação do citoplasma das células . A granulação pode se estender às células vizinhas, as quais não estão em contato direto, sugerindo a possibilidade de que substâncias tóxicas poderiam estar envolvidas na patogênese. *T. flavus* tem sido relatado como um produtor de inibidores que reduzem o crescimento de V. *dahliae* em cultura (DUTTA, 1981), e viabilidade de microescleródios(FRAVEL *et al.*, 1985), como os antibióticos Talaron (MIZUNO, 1974), vermiculina (FUSKA *et al.*, 1972), vermiculina e vermitastina (FUSKA *et al.*, 1979). Metabólitos podem estar envolvidos no deterioração de hifas de *Sclerotinia sclerotiorum,* pois talaron exibe atividade antifúngica (MIZUNO *et al.*, 1974) e vermiculina está relacionada com o agente antifúngico pyrenoforina (BOECKMAM *et al.*, 1974). Hifas de *S. sclerotiorum* eventualmente entram em colapso como resultado da infecção, mas a parede celular do hospedeiro permanece intacta após o conteúdo celular ser completamente destruido, sugerindo que as enzimas de degradação da parede não são a principal forma de atuação de *T. flavus* em *S. sclerotiorum* . Este fenômeno foi observado em hiperparasitismo de *R. solani* por *Penicillium vermiculatum* onde o conteúdo celular entrou em colapso mas a parede celular frequentemente não desintegra (BOOSALIS, 1956).

Estudos de parasitismo de *S. sclerotiorum* por *T. flavus* sugeriram um quimiotropismo positivo do antagonista pelo patógeno. O crescimento de *T. flavus* em direção à hifas do hospedeiro tem sugerido um tropismo positivo na interrelação hospedeiro parasito. Um fenômeno semelhante tem sido observado

com *Gliocladium catenulatum* Gilman & Abbot e *S. sclerotiorum* onde ocorre frequentemente o crescimento das ramificações das hifas em direção ao hospedeiro. A destruição de microescleródios e hifas do hospedeiro poderá influenciar a capacidade de *S. sclerotiorum* em sobreviver.

Apesar dos antibióticos representarem um papel importante no antagonismo por microrganismos , a competição é um fator que deve ser considerado em condições naturais (CHET & HENIS, 1985; COOK & BAKER, 1983; PAPAVIZAS, 1985).

2.3. *Verticillium dahliae*- Agente Causal Da Murcha De *Verticillium* Em Berinjela (*Solanum melongena L.*)

V. dahliae kleb é um fungo de solo capaz de infectar raízes de plantas , sendo um dos mais importantes parasitos vasculares de plantas superiores. O patógeno persiste no solo como microescleródio que permanece viável por mais de 20 anos (WILHELM, 1954). Sua extensa gama de hospedeiros inclui várias espécies agrícolas de expressão econômica, entre elas a berinjela. A sua importância reside na sua ampla distribuição de um extremo a outro em regiões temperadas. No Brasil, é considerada uma doença que pode causar perda total de produção em epidemias severas.

A forma microescleroidal de *V. dahliae* causa a doença. Trata-se de um parasita especializado, cuja principal fonte de inóculo é o solo. Formas especializadas do fungo mostram preferência de hospedeiro, sendo mais patogênicas a

algumas espécies ou variedades que a outras. Os sintomas na berinjela variam com as condições climáticas e com a variedade afetada. A faixa de temperatura ótima para a infecção situa-se entre 22 a 26°C . O fungo ocorre em todos os tipos de solo, preferindo os levemente alcalinos e neutros. As folhas basais infectadas tornam-se flácidas e se cobrem de manchas esbranquiçadas ou amareladas que sofrem necrose. Com frequência observa-se o caráter unilateral da enfermidade, onde ocorre a necrose da metade de uma folha, um lado do talo ou um só ramo da planta. Os sintomas nas folhas são devido às toxinas produzidas pelo fungo. Há nos caules infectados uma forte descoloração vascular.

A doença é manejada pelo uso de cultivares tolerantes, rotação de cultura, solarização e práticas culturais (JOHNSTON, 1987; KATAN, 1976; MOORMAN, 1982; PENNYPACKER,1983 e 1989). Entre os principais fatores reconhecidos na epidemiologia da doença estão: patótipos de *V. dahliae*, sua densidade de inóculo no solo, temperatura do ar, conteúdo de água do solo, densidade de plantas, disponibilidade de potássio e nitrogênio durante o crescimento das plantas.

2.4. Aspectos Biológicos E Taxonômicos De *Talaromyces flavus*

O fungo *T. flavus* (Klocker) Stolk & Samson (anamorfo,*P. vermiculatum* Dandeard) é um Ascomiceto.

Segundo BENJAMIN (1955), no gênero *Talaromyces*, as paredes do ascocarpo constituem de hifas entrelaçadas mas não

fundidas. Estas formas são de crescimento indeterminado e podem aumentar em tamanho após algumas ascas e ascosporos estarem maduros. Os cleistotécios têm morfologia variável e mostram diferentes graus de diferenciação do ascogônio em algumas espécies.

Em *T. flavus*, o cleistotécio é pequeno (100 - 500 u) , globoso ou subgloboso , superficial, não ostiolado, de coloração amarela, discreta mas com tendência a confluência em algumas espécies, de crescimento indeterminado; , várias consistências, de textura muito frouxa a mais ou menos comprimido, vários inicios de ascocarpos, ascas numerosas, oval a globoso, predominantemente nascido em pequenas cadeias, mais raramente simples e formado por "croziers", irregularmente disposto através do ascocarpo e deliquescente na maturidade. Ascosporos são na maioria granulados, raramente ornamentado, contínuo, hialino ou próximo ao hialino, variando grandemente em tamanho de acordo com STOLK & SAMSON (1972) de 3,0 - 6,5 um de comprimento, sendo que colônias de isolados com ascosporos medindo 5,0 um ou mais são frequentemente mais lentos que aqueles os quais apresentam ascosporos menores,e frequentemente produzem pigmentação no reverso. Conidióforos nascidos em hifas aéreas, estipes com 20 a 80 µm de comprimento, *Penicillium* tipicamente biverticilado, simétrico, e menos comumente monoverticilado, metula com 10 - 15 µm de comprimento, fialide acerosa 10- 16 µm de comprimento, conidios elipsoides ou fusiformes, 2,2- 3,5 x 2,0-2,5 µm, com parede enrugada a espinhosa, nascidas em pequenas cadeias

desordenadas.

Em meio CYA as colônias aos 7 dias apresentam-se com 18-30mm de diâmetro, planas, baixas e quase esparsas a moderadamente profundas e flocosas, micélio amarelo brilhante, menos frequentemente cotonoso ou marrom avermelhado. Na maioria dos isolados desenvolvem-se giminotécios. A conidiogenese usualmente é esparsa e inconspícua, se mais profusa, verde acizentada; exsudato avermelhado claramente presente , reverso amarelo, laranja , avermelhado ou marrom. As colônias em MEA apresentam-se com diâmetro entre 30-50mm , geralmente semelhantes à aquelas em CYA, giminotecios mais abundantes; reverso laranja , marrom, marrom escuro ou vermelho escuro. Colônias em G25N apresentam diâmetro entre 2-7mm , micélio branco esparso, ocasionalmente com microcolônias ou nenhum crescimento. Nenhuma germinação ocorre à 5°C. À 37°C as colônias apresentam de 20-45 mm de diâmetro , e usualmente similares a aqueles em CYA, o micélio é branco ou marrom com conídios verdes; os giminotécios são ausentes; o reverso pode ser amarelo, laranja ou marrom.

Ascosporos de *T. flavus* são termotolerantes. VAN DER SPY *et al.* (1975) relataram que ascosporos protegidos pelo cleistotécio poderiam suportar 100 °C por 30 minutos ou mais. Sendo que o tempo de redução decimal para ascosporos livres deste fungo tem sido relatado ser de 2,9- 5,4 minutos a 91°C (BEUCHAT, 1986) ou 2,2 minutos a 90,6 °C (SCOOT & BERNARD, 1987). Esta diferença na resistência ao calor é atribuida a influência do pH e tipos de ácidos orgânicos presentes no meio

de aquecimento.

BEUCHAT (1988), investigando a tolerância de linhagens de *T. flavus* a ácidos orgânicos durante e após a exposição a elevadas temperaturas, concluiu que osácidos fumárico, sórbico e *benzó*ico são claramente mais letais que acético, málico, cítrico e tartárico, e a letalidade aumenta com a acidez do meio, sendo que o efeito dos mesmos varia dependendo da linhagem e é influenciado por outros constituintes no meio .

2.5.Controle Biológico De *Verticillium dahliae* Por *Talaromyces flavus*

T. flavus produz um metabólito que mata microescleródios e suprime crescimento radial de *V.dahliae in vitro*. FRAVEL & KIM (1987) ensaiaram a toxina produzida e consideraram as estruras de resistência do patógeno mortas quando elas não germinaram após lavagem em água e incubação por 5 dias nas condições ensaiadas. O processo de extração de metabólitos por meio de solventes, e separacão molecular por cromatografia líquida de alta definição tem indicado que o filtrado contém apenas um composto que inibe *V. dahliae* (KIM et al., 1986) .Este metabólito produzido por *T. flavus(*Tf1) é considerado diferente dos quatro antibióticos previamente descritos (KIM et al., 1986),tendo sido denominado de glucose

oxidase.

A redução na população de microescleródios viáveis de *V. dahliae,* observada por MAROIS et al (1984), pode ser explicada em parte como efeito letal do metabólito de *T. flavus* que mata os microescleródios. A antibiose tem sido demonstrada estar envolvida em outros sistemas de controle biológico, incluindo *Pythium ultimum* (HOWELL & STIPANOVIC 1980) e controle de *Agrobacterium tumefaciens* por *A. radiobacter* (KERR, 1980).

Micoparasitismo está envolvida no controle de *S. sclerotiorum (LIB)* de Bary por *T. flavus* (MCLAREN *et al.,* 1986) mas aparentemente não *no* controle de *V. dahliae*, sendo a antibiose o mecanismo efetivo. A genética convencional ou molecular pode ser utilizada para melhorar a capacidade de *T. flavus* em produzir o metabólito e controlar *V. dahliae. O* metabólito sozinho, ou um análogo deste , pode ser um fungicida efetivo que poderia ser usado em condições de produção.

2.6.Utilização Da Variabilidade Genética Induzida.

Os microrganismos, incluindo os fungos, são em geral haplóides e , assim , a indução de mutação por agentes físicos ou químicos é facilitada. De fato, este é um método que, embora simples, tem produzido resultados importantes no melhoramento genético de microrganismos indústriais como por exemplo, a indução de mutação melhorando o rendimento e a qualidade de enzimas sintetizadas (AZEVEDO,1991;EVELEIGH,

1985;MANDELS *et al.*, 1971) ou melhorar a produção de antibióticos ou enzimas líticas por fungos utilizados no biocontrole (CHET & ELAD, 1983; DENNIS & WEBSTER, 1971 a,b). Se por outro lado, o microrganismo for usado em associação com produtos químicos, é importante a indução de mutação que os tornem resistentes a estes compostos. Em todos os casos , entretanto, torna-se necessário verificar se as mutações induzidas não interferiram em outras características importantes para o antagonismo como crescimento, esporulação, produção de metabólitos secundários, habilidade para sobreviver no solo, etc(AZEVEDO, 1991; PAPAVIZAS *et al.*, 1982).

Devido ao *T. flavus* ser um potencial agente para biocontrole de patógenos de solo (MAROIS *et al.*, 1982), resistência a fungicidas é um atributo desejável. KATAN *et al.*(1984) mostrou que a genética convencional pode ser usada com sucesso para melhorar o desempenho do agente de biocontrole. Foi demonstrado também que a mutação pode ter um efeito pleiotrófico no fungo. Entretanto, uma vez que o grau de efeitos negativos de alelos desejáveis variam, muitas linhagens mutantes ensaiadas podem resultar em seleção dos menos prejudiciais, e alelos altamente benéficos. Os benefícios da obtenção de mutantes de *T. flavus* resistentes a fungicidas são a possibilidade de uso no controle integrado com fungicidas (benomyl, thiabendazol, iprodione) para suprimir o patógeno. Além do que, assim como para mutantes de *Trichoderma* (PAPAVIZAS *et al*, 1982; SILVA & MELO ,1989), mutantes de *T. flavus* resistentes a fungicidas podem ser mais eficientes em suprimir

doenças que, isolados selvagens. Entretanto isto precisa ser melhor estudado.

2.7 .Genética Da Resistência A Fungicidas Em *Talaromyces flavus*

O mecanismo de ação dos benzimidazois envolve uma ligação específica da molécula de fungicida com a subunidade de tubulina que resulta em inibição da mitose (DAVIDSE, 1986), uma diminuição no nível de crescimento linear, e mudança na forma da célula (HOWARD *et al.*,1977; DAVIDSE, 1986). Estudos conduzidos sobre mecanismos de resistência têm atribuido a mutações no gene da β-tubulina, que resultando em perda de afinidade da tubulina aos benzimidazois, estaria conferindo resistência em fungos patogênicos(DAVIDSE, 1987).

Mutações que resultam em resistência a um benzimidazol usualmente conferem resistência a outros benzimidazóis (resistência cruzada), mas em alguns casos a mutação pode levar ao aumento da sensibilidade a certos benzimidazois e compostos relacionados (resistência cruzada negativa). Isto foi demonstrado por VAN TUYL et al.(1974), que utilizando mutantes induzidos por UV de *Aspergillus nidulans* , e semeando-os e meio de Malte-agar contendo Benomyl ou Thiabendazol , observaram diferença na sensibilidade. Embora resistência cruzada pareça ter sido a regra, resistência a Benomyl sem a concomitante resistência a Thiabendazol ocorrera em pequena quantidade, o reverso, resitência a Thiabendazole sem a resistência a benomyl foram

encontrados em alguns isolados. Este fenômeno tem sugerido que linhagens resistentes a benzimidazois podem ser controlados por compostos designados a preencher um sítio alvo em organismos resistentes(KATO, et al.1984).

KATAN *et al.* (1984) provaram por meio de cruzamentos entre linhagens selvagens e mutante resistente de *T. flavus* que resistência a benomyl e dicarboximidas pode ser originada por indução de mutação, sendo que os três mutantes resistentes a benomyl utilizados no estudo exibiram dois níveis de resistência a benomyl e variaram em crescimento e morfologia. Uma segregação 1:1 em cruzamentos entre a linhagem sensível e mutantes TF-1 e TF-6 mostrou que os níveis de resistência alto e baixo a benomyl são controlados por genes simples. A presença de apenas níveis parentais de resistência a fungicida entre as progênies de alguns cruzamentos envolvendo isolados de diferentes níveis de resistência indicaram que níveis altos e baixos de resistência foram governados por diferentes alelos Ben^{HR} (1-1), Ben^{HR} (1-5), Ben^{LR} (1-6) em um único locus . Situações semelhantes ocorrem com outros Ascomicetos (KATAN *et al*, 1983) e por analogia com outro fungo caracterizado para resistência a benzimidazóis (Ben) a ação poderia ser codificado pela β tubulina (SHEIR-NEISS *et al* ,1978).

Em *Aspergillus nidulans*, três loci *ben* A, *ben* B e *ben* C, estão envolvidos na resistência (Van Tuyl, 1977 citado por DAVIDSE, 1986). Estudos com mutantes alelos de *ben* A (loci que determinam resistência ou suscetibilidade a

benzimidazóis) conduzidos com *ben* A15 e *ben* A16 , junto com a linhagem selvagem, têm sido usados para afinidade de carbedanzin a tubulina. O *ben* A15 determina resistência a carbedanzin e a thiabendazole, enquanto que ben A16 determina supersensibilidade a carbedanzin e resistência a thiabendazole(VAN TUYL et al., 1974). Assim observou-se que a afinidade de Carbedanzim à tubulina de ben A15 foi baixa, mas sua afinidade à tubulina ben A16 foi maior que o da linhagem selvagem.

Estas mudanças de afinidades , ou diferenças na sensibilidade entre os dois mutantes e cada um deles à linhagem selvagem, são associados com mudanças na estrutura primária de β-tubulina (SHEIR-NEISS *et al.*, 1978). Este gene em *A. nidulans* codifica dois peptídeos, β 1 e β 2 tubulina, o qual leva a uma modificação de eventos após a transcrição.

MORRIS *et al.*(1986) mostraram que *A. nidulans* tem um segundo gene para β tubulina, (tub C) para tubulina β3, tubulina α, e outros monômeros estão presentes em três formas, sendo que dois genes de α tubulina estão envolvidos em sua produção: tub A que codifica para tubulinas α1 e α3, e tub B que codifica para α2 tubulina.

JUNG *et al.*(1987) confirmaram através de clonagem e sequenciamento de cinco alelos mutantes de *ben* A, em gene de β tubulina de *A. nidulans*, que a sensibilidade alterada a benzimidazóis e ou estabilidade alterada dos microtúbulos é devido à mudança estrutural nestes genes. Sequências alteradas em alelos mutantes *ben* A4, *ben* A31 e *ben* A33, os quais conferem

resistência a carbedanzin, noconazole, e thiabendazole, envolvem o codon 6 resultando em mudança do aminoácido histidina à tirosina , codon 50 (uma mudança de tirosina a serina) e codon 134 (uma mudança de glutamina a lisina). As mutações *ben* A16 e ben A19, as quais conferem resistência a thiabendazole mas aumentam sensibilidade a carbedanzin são ambas localizadas no codon 165 e resultam de uma mudança de alanina para valina (JUNG *et. al*, 1987).

As observações em *A. nidulans* indicaram que o gene de β tubulina pode mutar em sítios distintos , causando resistência a benzimidazois. Estas estruturas podem auxiliar na determinação do sítio de ligação. Aminoácidos na posição 165-167 estão envolvidos na ligação em *A. nidulans*.

Em *T. flavus*, KATAN (1984) obteve que baixo nível de resistência a benomyl estava relacionado pleiotroficamente com baixo crescimento. Nenhum efeito foi observado com alelo altamente resistente. Esse fato foi explicado por DAVIDSE (1986) como sendo devido a uma ligação específica da molécula de fungicida a subunidade de tubulina que resulta em inibição da mitose.

Diferindo de outros fungos, KATAN (1982) e KATAN & SHABI (1982) verificaram que a germinação de esporos de *T. flavus* não foi inibida por iprodione. Resistência espontânea apareceu frequentemente, especialmente a 30°C, quando Iprodione foi menos inibitório ao crescimento micelial que a 25°C. A resistência a dicarboximidas segrega na proporção de 1¦1, sendo que a sensibilidade osmótica é característica do alelo

Dic^R. Assim, diferenças na sensibilidade osmótica poderiam ser usadas para reconhecer mutantes para resistência a dicarboximidas (KATAN et al., 1984).

O modo de ação dos dicarboximidas permanece desconhecido, embora tenha sido objeto de muitos estudos. GEORGOPOULOS *et al.* (1979) mostraram que os dicarboximidas causam instabilidade mitótica em *A. nidulans* e concluiram que o efeito no cromossomo e possivelmente no fuso mitótico é a principal base para a fungitoxicidade . Entretanto não está claro se são efeitos próprios ou secundários do fungicida.

SANTOS & MELO(1989) obtiveram protoplastos de micélio jovem de *T. flavus* com a enzima lítica Novozym 234, sendo que alta produção foi obtida com 90 minutos de tratamento. Os estabilizadores osmóticos glucose, NaCl, KCl propiciaram uma alta frequência de regeneração, da ordem de 65%; 65,75%, 70,75%. A obtenção e a regeneração de protoplastos de *T. flavus* constitui uma ferramenta importante para o melhoramento.

2.8 . Metabólitos Produzidos Por *Talaromyces flavus*.

Talaron , um antibiótico produzido por *T. flavus* crescido em meio de cultura com 8% de glucose, foi relatado como tendo coloração amarelo pálido com forte características antifúngicas mas nenhuma atividade antibacteriana (MIZUNO *et al* , 1974). Sob condições similares, *T. flavus* isolado Tf-1, produziu um metabólito extracelular que tem forte efeito

contra fungos , bactérias e protozoários (KIM *et al.*, 1986). Este metabólito causa a inibição do crescimento radial de V. *dahliae* e mata seus escleródios (FRAVEL *et al.*, 1987). O produto foi subsequentemente identificado como resultante da reação de glucose oxidase (β-D- glucose oxigenio redutase, EC 1.1.3.4. (KIM *et al.*, 1988) . Esta enzima cataliza a oxidação de glucose a gluconato e peróxido de hidrogênio na presença de oxigênio molecular. Glucose oxidase na presença de glucose mata os microescleródios de *V. dahliae in vitro* e em solo esterilizado (KIM *et al.*,1987). Glucose oxidase , glucose e gluconato não inibem *V. dahliae* quando eles são usados individualmente. Entretanto peróxido de hidrogênio é altamente tóxico a microescleródios de *V. dahliae* (KIM *et al.*,1988). Assim o efeito antimicrobiano do sistema glucose oxidase é originado do peroxido de hidrogênio, o produto da reação catalizada pela glucose oxidase. Na presença de glucose vários graus de atividade antimicrobiana foram observados. Talaron ou glucose oxidase na presença de glucose afeta microescleródios mais que micélio . Uma concentração 10 vezes maior de peróxido de hidrogênio foi requerida para inibir micélio de *Verticillium* spp comparado com 12 ug mL^{-1} requerido para microescleródios (KIM *et al.*, 1987). Simultaneamente, GLEN & GOLD(1985) encontraram que micélio foi 10 vezes menos sensível ao talaron que microescleródios. Provavelmente, o micélio crescendo ativamente pode ser capaz de metabolizar alguns peróxidos de hidrogênio formado, como o caso de fungo da podridão branca *Phanerochaeta chrysosporum*, um basidiomiceto

que degrada lignina. *T. flavus* é conhecido por produzir os antibióticos vermicilin e vermiculina, vermistatim e ácido 2-metil sórbico (FUSKA *et al.*, 1972;1979a,b;PROSKA *et al.* , 1992).

Glucose oxidase ou Talaron tem peso molecular 152000 com peso das subunidades 71000 indicando que a enzima está em dímero. A enzima isolada por KIM *et al.*(1990) foi diferente da obtida com Tf-1, possivelmente devido à heterogeneidade na enzima devido à molécula de carboidrato variável (HAYASHI & NAKAMURA, 1981). O peso molecular está na faixa de 150000 a 183000 relatada para várias glucose oxidase de fungos (PAZUR , 1966; SWOBODA e MASSEY 1965; TSUGE *et al.*, 1975). O ponto isoelétrico de Talaron foi o mesmo que a enzima de *T. flavus*. *A* glucose oxidase de vários fungos tem alta especificidade para β-D- glucose. Adicionalmente, estas glucoses oxidases podem ter atividade residual com outros monosacarídeos incluindo 2- deoxy-D-glucose (DIXON & WEBB, 1979) . Consistentemente com outras glucoses oxidases de fungo, a enzima de *T. flavus* tem um requerimento específico para D-glucose, entretanto o anômero específico requerido não é conhecido, uma vez que resultados foram obtidos com uma mistura de α e β anômeros de glucose. A aparente constante de Michaelis- Menten Km , para D- glucose em enzima de *T. flavus* é de 100 mM de mistura de α e β anomeros. Este valor está dentro da alta faixa de valores para Km determinado com outro suprimento de fungos, a qual foi na faixa de 9,6 mM para *P. notatum* (SWOBODA *et al.*, 1986) 110 mM para *A. niger* (GIBSON *et*

al., 1964). A atividade da enzima é considerada ótima a pH -5,0.

O uso de glucose oxidase tem sido limitado a cor e flavor ou estabilização da flora microbiana de produtos alimentares devido a características antioxidantes e da natureza de transformar glucose da enzima (BARTON *et al.*,1957; FRELS *et al.*,1984;RICHTER,1983) e o uso da enzima em análise de açúcares.

Embora inúmeros trabalhos tenham provido novas informações sobre a glucose oxidase produzido por *T. flavus*, nenhuma afirmação pode ser feita sobre a produção da enzima pelo antagonista na natureza. Se glucose está envolvida na morte de *V. dahliae* no solo, um suprimento de glucose deve estar disponível para o agente de biocontrole. Sabe-se que carboidratos como a glucose são exudados pelas raizes de plantas (HALE *et al.*,1978). Polissacarídeos como glucana estão presentes em escleródios de *S. sclerotiorum* (ADAMS *et al.*, 1983). Cultura *in vitro* não tem mostrado qualquer evidência de micoparasitismo .

Em contraste, Fahima & Henis (1992) citados por MADI *et al.* (1992) observaram invasão de microescleródios pelas hifas de *T. flavus* apenas na presença da raiz de berinjela morta ou outro suprimento de alimentos. Supõe-se que a produção de glucose oxidase por *T. flavus* , com a subsequente produção de H_2O_2 na presença de nutrientes precede a invasão de microescleródios por hifas de *T. flavus*. Atenuação de microescleródios pelo processo provavelmente

predispõe a invasão pelo antagonista. Em pararelo a esta situação, HENIS & PAPAVIZAS (1983) encontraram que uma breve esposição de *Sclerotium rolfsii* Sacc a pequena quantidade de fumigante os faz muito suscetíveis a invasão por *Trichoderma harzianum* hifai. O advento de novas microtécnicas no solo e rizosfera providenciará mais informações na interação entre glucose e *T. flavus* na rizosfera e microescleródios.

Segundo KIM *et al.* (1990), na ausência de glucose, nem talaron nem glucose oxidase, a uma concentração máxima de 10 ou 1.09 $\mu g\ ml^{-1}$(83 ou 125 nmol min^{-1} mg^{-1}), respectivamente, inibem o crescimento de *Bacillus thuringiensis, Erwinia carotovora, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, P. syringae, Sacharomyces cerevisae, Gliocladium virens, Pythium aphanidermatum , P. ultimum, Rhizoctonia solani, Sclerotinia minor, Sclerotium rolfsii, T. flavus, T. hamatum* e *V. dahliae*. Quando glucose é adicionada ao meio de cultura a uma concentração de 2 a 4%, a concentração mínima inibitória de talaron e glucose oxidase variou de 0,25->125 nmol. min^{-1}. ml^{-1} para a maioria das bactérias e alguns fungos patogênicos incluindo *Pythium* spp, *Rhizoctonia solani, V. dahliae*. Vários agentes de biocontrole, incluindo *Gliocladium virens, T. flavus* e *T. hamatum*, não são afetados por talaron ou por glucose oxidase na presença de glucose exceto em altas concentrações.

PROKSA *et al.* (1992) obteve que 2-methilsorbic acid (MA), (2Z,4E)-2- methil 2.4-hexadienoic acid, é um novo metabólito de *P. vermiculatum* produzido em meio de sacarose.

Sendo a atividade antifúngica deste ácido maior que de ácido sórbico e de seus bromoderivados (ácido bromometilsorbic ou ácido bromosórbico) MA suprime o crescimento de *T. flavus* e germinação de seus conídios. Em *P. vermiculatum* este ácido diminui a produção de vermiculina e inibe proteosíntese em *Sacaromyces cerevisae*.

MADI *et al.* (1992), estudando a herança das propriedades de antagonismo e atividades de enzimas líticas em cruzamento sexual de *T. flavus,* cruzaram duas linhagens selvagens e três mutantes resistentes a benomyl que resultaram em seis combinações, das quais duas produziram cleistotécios híbridos. Observou-se uma variação nas linhagens parentais e na progênie, onde foi considerado como forma importante para controle de fitopatógenos de solo: atividade extracelular de glucose oxidase e enzimas degradadores de parede, antibióticos contra *V. dahliae,* e parasitismo e biocontrole de *S. rolfsii*. Um padrão de herança quantitativa não mendeliano foi encontrado para atividade de β-1-3-glucanase e quitinase . Algumas progênies exibiram maior atividade de glucanase e quitinase, que outras encontradas em linhagens parentais. Antibiose foi correlacionada com atividade glucose oxidase em um dos cruzamentos. A atividade para reduzir podridão de raiz de feijão causada por *R. rolfsii* foi correlacionada com atividade micoparasitica contra esclerodios de *S. rolfsii* em um cruzamento mas não em outros. A variacao quantitativas em cada uma destas enzimas é provavelmente governada por alguns genes estruturais e vários genes controladores. Outros genes,

permeases e fatores citoplasmáticos poderiam contribuir para esta variação. Não existe uma clara co-segregação da maioria das propriedades, como produção de enzimas e antibióticos, o que torna difícil avaliar a capacidade antagnística de *T. flavus*.

Assim, eobora nenhum fator singular tenha sido conclusivamente identificado como principal determinante do antagonismo, MADI *et al.* (1992) comparando dois parentais , linhagem selvagem e mutante resistente a benomyl, observaram que cada enzima poderia atuar como uma forma importante no antagonismo contra *V. dahliae* e *S. rolfsii*. Esta hipótese foi testada geneticamente pela comparação de atividade enzimática no filtrado de culturas de progênies individuais com suas propriedades antagonísticas. A variação observada indicou que a atividade glucose oxidase e o nível de antibiose exibido pelas progênies do cruzamento I contra *V. dahliae* foi correlacionado. Acredita-se que progênies com várias combinações de atividades enzimáticas e outras propriedades providenciam um instrumento experimental para o teste de hipótese relativa a importância para o desempenho de *T. flavus* como potencial agente de biocontrole.

2.9.Fermentação De Agentes De Biocontrole

Embora tenha ocorrido uma rápida expansão da biotecnologia de fermentação em fungos filamentosos nos

últimos 30 anos para alta produção de ácidos, antibióticos, enzimas, e estudo de uso de substratos de baixo custo (SMITH et al., 1980) A maioria dos estudos tem sido orientada para a indústria de antibióticos e enzimas. A Biotecnologia de fungos e bactérias tem dado mais ênfase recentemente para novas áreas como a produção de inseticidas biológicos (DULMAGE, 1981) e micoherbicidas (CHURCHIL, 1982). Assim há poucos trabalhos sobre tecnologia de fermentação para agentes de biocontrole de doenças de plantas.

Objetivando utilizar *T. flavus* para biocontrole, uma preparação efetiva de inóculo deve ser desenvolvida. Alguns progressos têm sido feitos no desenvolvimento de tecnologia para crescimento de grandes quantidades de *T. flavus* e outros fungos filamentosos . PAPAVIZAS et al.(1987) usou um meio líquido contendo melaço e levedura de indústria para produzir inóculo viável de *T. flavus* com sistema de fermentação que simula produção industrial em larga escala. Pouca ou nenhuma atenção tem sido dada ao estudo da otimização da produção de propágulos e metabólitos de linhagens promissoras.

2.10.Encapsulação De Propágulos.

O avanço do controle biológico tem esbarrado em problema de produção e entrega do antagonista. BACKMAN & RODRIGUEZ-KABANA (1975) concluiram que o carregador ideal é um produto granular com partículas pequenas e uniformes, facilmente adaptáveis aos equipamentos agrícolas já existentes.

Em seu estudo, tentaram encontrar um grânulo que pudesse servir de carregador de fungos antagonistas , mas estes, quando enxarcados, ao serem mexidos desintegravam. Os grãos que apresentaram melhor desempenho quanto à adsorção de água foram os de terra diatomácea. A viabilidade do *Trichoderma* foi boa chegando a 100 % no tempo zero mesmo após 1 mês de estocagem. A formulação granulada com agentes de controle biológico apresenta vantagens como não deixar resíduos químicos sintéticos no solo e reduzir a incidência da doença em condições secas. É um habitante natural do solo.

O carregador granular apresenta vantagens com relação a matéria orgânica como, a redução na quantidade de material colocado no solo em até 30 vezes, e o equipamento agrícola tradicional que pode ser utilizado para sua distribuição.

Para utilizar *T. flavus* como agente de biocontrole, é necessário desenvolver e ensaiar sistemas de preparação e entrega de inóculo. PAPAVIZAS et al.(1984) desenvolveram um meio líquido pouco dispendioso, a base de melaço e levedura de fermentação para produzir inóculo viável em tanques de fermentação. Também a técnica de encapsulação de esporos e micélio foi recentemente descrita. Os "pellets" foram feitos com conidios, biomassa fermentada ou ascosporos com pyrax ou farelo de trigo com cloreto de cálcio como agente geleificante e ainda alginato de sódio. A estocagem à temperatura ambiente afetou mais a viabilidade de conídios do que a 5°C. Os ascosporos não foram afetados por serem mais resistentes a

altas temperaturas. Estes estudos concordam com as conclusões de FRAVEL et al.(1985), que verificaram que a sobrevivência de propágulos em " pellets" de alginato-argila varia com o tipo de esporo, isolado e espécie, sendo que ascosporos sobrevivem mais que conídios. Isto pode ser atribuído a morfologia do esporo e/ou fisiologia uma vez que ascosporos são de longa duração enquanto conídios são efêmeros. Ascosporos de *T. flavus* são conhecidos por melhor sobrevivência no campo e mais compatíveis com fungicidas que conídios (FRAVEL, 1988). Diferenças podem ser observadas entre espécies distintas de um mesmo gênero. Conídios de *P. oxalicum* não sobrevivem tão bem como aqueles de *P. dangeardii* (o anamorfo de *T. flavus*).

Os estudos de FRAVEL et al.(1985) mostraram também que embora a concentração inicial de propágulos não afete a sobrevivência, para alguns organismos, há aparentemente uma concentração ótima. Por exemplo, ascosporos da linhagem Tf1 sobrevivem melhor à concentração inicial de 10^7/ml e 10^8/ml que a 10^6/ml. Em contraste ascosporos de Tf-1 e conídios de *P. oxalicum* sobrevivem melhor a 10^5/ml que a 10^7/ml. Sobrevivência por 12 semanas em alginato foi menor que Pyrax a 25 ^oC.

" Pellets" contendo conídios e farelo de *T. flavus*, introduzido no solo, proporcionaram um rápido aumento de atividade. O farelo em associação com conídios de rápido crescimento deram uma base nutricional (PAPAVIZAS et al,1987). O aumento da atividade com conídios em "pellets" de alginato com farelo pode ser explicado pelo fato destes propágulos invadirem completamente o substrato antes que os

microrganismos não desejáveis possam colonizá-lo. Esta é uma característica importante para a sobrevivência de fungos saprofíticos no solo (PAPAVIZAS et al., 1984).

PAPAVIZAS et al.(1987) estudou o efeito dos processos de formulação na proliferação dos propágulos encapsulados em alginato de *T. flavus*, verificou que os ascosporos e principalmente conídios apresentam uma rápida proliferação nos "pellets" de alginato e farelo, enquanto que as preparações de hifa não apresentaram esta rápida proliferação. Fatores bióticos e abióticos podem afetar a extenção e padrão de crescimento de fungos de biocontrole a partir de "pellets". A identificação destes fatores pode tornar o biocontrole mais previsível e efetivo. A adição de "pellet" de alginato contendo conídio e farelo de trigo como ingrediente inerte ao solo resulta em rápido aumento de atividade. O farelo está associado a um rápida germinação de conídios em "pellets" fornecendo alimento base para o crescimento e esporulação de fungo no solo. Nenhuma atividade apreciavel ou proliferação pode ser observada quando Pyrax foi utilizada com conídios e ascosporos ou quando biomassa fermentada foi utilizada para fazer "pellets" com trigo. Foi observado um crecimento lento quando utilizou-se fragmento de micélio seco ou úmido sendo que estes podem tornar-se colonizados por microrganismos nativos do solo.

Atividade e proliferação em solo de "pellets"contendo farelo e ascosporos são intermediários entre aqueles contendo conídios os quais apresentaram uma grande

atividade, e aqueles contendo biomassa fermentada. Esta diferença é esperada uma vez que ascosporos de *T. flavus* não germinam rapidamente em grande número. Se os ascosporos não forem aquecidos a temperaturas maiores que 50°C por 10-15 minutos, apenas 5 a 10% deles germinam. Seu baixo nível de germinação, na presença de alimento base, pode colocar estes propágulos em desvantagem quando comparados com conídios ou com propágulos saprófitas de crescimento rápido. Proliferação em solo de formulação contendo conídio-farelo é precedido pelo aumento de atividade metabólica , como mostrado pela evolução de CO_2 quando propágulos encapsulados são adicionados ao solo e pelo desenvolvimento de cleistotécios férteis em "pellets" parcialmente enterrados ao solo. Produção de cleitotécios e um grande aumento em ufc por grama de "pellet" recuperados do solo sobre níveis iniciais indicaram que crescimento deve ter precedido a formação de cleistotécios, com subsequente produção de ascosporos e conídios no substrato, PAPAVIZAS et al., 1987).

A vida de prateleira de *T. flavus* em "pellets" de alginato-trigo foi menor a 25°C que a baixas temperaturas. Em contraste, a vida de prateleira de ascosporos não foi afetada por temperaturas na faixa de 5°C a 25°C . Este fato não é inesperado, desde que ascosporos são conhecidos serem mais resistentes a altas temperaturas que conídios. Exposição de suspensão aquosa de ascosporos dormentes a 53°C por 15 minutos, ou a 70°C por 1 minuto, aumenta a germinação. Em contraste, conídios expostos a 53°C por 30 minutos são mortos. Ascosporos sobrevivem mais que conídios em "pellets" de alginato com Pyrax

como ingrediente inerte, tendo apresentado melhor sobrevivência no campo e ser mais compatível com fungicidas que conídios (KATAN, 1985).

FRAVEL *et al.*(1986) medindo parametros físicos , químicos , e biológicos de 25 solos, encontraram 5 relacionados a sobrevivência e proliferação de *T. flavus* em análise fatorial multivariada. Estes parâmetros foram troca de capacidade catiônica; concentração de potássio, sódio e zinco e total de população bacteriana no solo. Um aumento no nível de potássio no solo aumentou a sobrevivência de *T. flavus* (5,12-74,68ppm). Potássio é um macronutriente necessário para o crescimento de fungos exercendo suas funções em atividade enzimática, metabolismo de carboidratos, balanço iônico.O potássio afeta diversos processos como formação de oogônios e proteção contra a radiação solar. A absorção de potássio é ativa e ocorre contra um gradiente de concentração de 5.000:1. Um aumento no nível de sódio ocasiona decréscimo no crescimento de *T. flavus*. Um aumento na concentração de Zn(0-1,7x10^{-3}) proporciona aumento na proliferação de *T. flavus*. Zinco é essencial para todos os fungos porque é constituinte ativador de muitas enzimas e muito importante na regulação de metabólitos secundários em algumas espécies. A natureza dos efeitos da população bacteriana não era conhecida por ocasião deste trabalho. As bactérias no solo podem aumentar ou suprimir população de *T. flavus* , portanto, o efeito pode ser positivo ou negativo, direto ou indireto. Isto pode ser exemplificado com *Pseudomonas fluorescens* produtoras de sideróforos que

melhoram a aquisição de ferro em ambientes deficientes em ferro. Embora tanto o ferro como *P. fluorescens* estejam relacionados com sobrevivência do antagonista, um complexo análogo pode ser responsável pelo envolvimento da bactéria na sobrevivência de *T. flavus*.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1.Local Da Investigação

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Fitopatologia, Química analítica, Formulações e Casa de Vegetação, do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação do Impacto Ambiental (CNPMA)/EMBRAPA , Jaguariúna, S.P., Brasil.

3.2. Hospedeiro Teste

Na execução dos experimentos foi utilizada a cultivar de berinjela (EMBU/AGROCERES) suscetível a *V. dahliae*.

3.3. Linhagens

Foram utilizadas as linhagens de *Talaromyces flavus* e *Verticillium dahliae* pertencentes a micoteca do CNPMA/ EMBRAPA.

Utilizou-se uma linhagem de *V. dahliae* (procedente de Campinas), isolada de berinjela.

As linhagens de *T. flavus* foram:

IK- "International Mycological Institute",Eghan, England.UK.

IR-Instituto de micologia de Recife

IG-Isolado de solo de Piracicaba-SP

T22;T30- Biótipos originados de IK após irradiação com luz ultra violeta, para característica morfológica.

T4-Isolado de rizosfera de berinjela(sendo identificado pela Fundação Tropical André Tosello).

3.4.Meios de cultura e soluções utilizadas

Os meios de cultura e soluções utilizadas foram esterilizadas em autoclave por 20 minutos a 121 °C com exceção das substâncias que sofrem efeito de altas temperaturas e /ou aquelas que não necessitam esterilização, as quais estão citadas na metodologia.

A incubação foi feita de acordo com a temperatura ideal para o desenvolvimento de cada linhagem empregada.

3.4.1. Meio de Batata-Dextrose (BD)

Caldo de Batata	1000 ml
Glicose	20 g

Para a obtenção do caldo, 200 g de batata foram cozidos por 15 minutos em água destilada, sendo o volume final completado para 1000 ml. Para o preparo do meio sólido 20g de ágar foram adicionados (Meio de BDA).

3.4.2. Solução de "Tween -80"(0,1 % V/V)

"Tween -80"	0,1ml
Água destilada	99,9ml

a solução foi autoclavada e mantida no refrigerador a 4°C.

3.4.3. Solução salina (0,85% p/v)

NaCl	8,5g
Água destilada	1000,0ml

3.4.4. Solução de Giemsa

Giemsa	1,0ml
Glicerina	66,6ml
Metanol	66,6ml

Misturou-se o giemsa com glicerina a 60°C durante 30 minutos a 2 horas. Após resfriamento , foi adicionado a metanol. Filtrou-se a solução corante que foi armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente e utilizada 72 horas após preparo.

3.4.5.Solução de albumina 50% (TANAKA *et al.*, 1979).

Uma clara de ovo foi colocada em um becker e picotada vagarosamente com tesoura durante 1 hora. Filtrou-se e ao filtrado adicionou-se glicerina (v/v) e cristais de cânfora. A solução foi mantida em refrigerador a 4 °C.

3.4.6. Solução tampão fosfato pH 7.0

solução A:

$Na_2HPO_4 12H_2O$	3,73g
Água destilada	1000,0ml

Solução B:

KH_2PO_4	2,4g
Água destilada	1000,0ml

A solução A foi misturada com a solução B na proporção de 7:3., o pH foi ajustado para 7,0 e a mistura conservada em refrigerador a 4°C.

3.4.7. Solução Estoque de Acrilamida

Acrilamida	75,0g
N,N metilene-bis-acrilamida	2,0g
Água destilada	250,0g

A solução foi filtrada e mantida a 4°C.

3.4.8.Tampão do gel separador pH 8,9.

Tris-base	47,75g
Água destilada	60,00ml

O pH foi ajustado para 8.9 com HCl 1N, e o volume completado para 100ml com H_2O .

3.4.9. Tampão do gel empilhador pH 6.8

Tris-base	7,475g
Água destilada	60,000ml

O pH foi ajustado para 6,8 com HCl 1N, e o volume completado para 100 ml com agua destilada.

A solução foi conservada sob refrigeração.

3.4.10.Tampão do tanque

Tris	63,2g
glicina	39,9g
Água destilada	1000,0ml

A solução foi filtrada e armazenada à temperatura ambiente, no momento do uso este tampão foi diluido 1:10 em água destilada.

3.4.11.Tampão da amostra

Glicerol	5,0ml
Tampão do gel empilhador	2,5ml
Azul de bromofenol	cristais

O volume foi completado para 25 ml com água destilada e armazenou-se a -20°C.

3.4.12.Gel separador a 10%

Tampão do gel separador	3,0ml
Acrilamida	10,0ml
Água destilada	16,8ml
Persulfato de amônio 10%	0,225ml

TEMED 0,015ml

O gel foi preparado no momento do uso.

3.4.13. Fixador PAGE (esterase)

Soluções substratos

α-naftil acetato 1% em solução aquosa de acetona 50%

β-naftil acetato 1% em solução aquosa de acetona 50%

3.4.15.Corante-esterase.

"FAST-BLUE,RR"	50,0ml
Tris-hcl 0.5MpH 7.1	5,0ml
α-naftil acetato	0,75ml
β-naftil acetato	0,75ml
Água destilada	45,5ml

3.5.Fungicidas.

Benomyl:

Nome químico: 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato de metila.

Produto comercial: Benlate 500 (50% princípio ativo).

Iprodione:

Nome químico: 3.(3.5- diclorofenil)-n-(1-metil-etil)-2,4-dioxo- 1-timidazolina carboximida.

Produto comercial: Rovral (50% princípio ativo).

Thiabendazole:

Nome químico: 2-(tiazol-4 il) benzimidazol.

Produto comercial: Tecto 600 (60% de princípio ativo)

Quintozene (PCNB)

Nome químico: pentacloronitrobenzeno

Produto comercial: Plantacol (75% Princípio ativo)

Propiconazole:

Nome quimico:

1-[2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-il-metil]-1H-1,2,4 triazol

Produto comercial:Tilt(25% princípio ativo)

Dicloran:

Nome químico: propileno-bis-ditiocarbamato de zinco

Produto comercial: Antracol pó molhavel(70% de princípio ativo)

Chlorothalonil:

Nome químico:tetracloroisoftalonitrila

Produto comercial:Daconil 500 SDS(50% de princípio ativo).

Dodine:

Nome químico: acetato de N-dodecil-guanidina

Produto comercial: Dodex 450 SC(45% de princípio ativo)

Sportak:

1-(N-propil-N-2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil)carboil)imidazole (55% de principio ativo)

Produto comercial:Sportak 450 CE

3.6.Teste de antagonismo em confrontação direta das linhagens de *T. flavus* contra *V. dahliae in vitro* .

Os biótipos foram testados por meio do ensaio de culturas pareadas, conforme BELL et alii (1982), onde os discos de meio de BDA de 0,7 cm de diâmetro, contendo micélio de *V.*

dahliae , foram transferidos para placas de Petri (de 9.0cm de diâmetro) contendo meio BDA, a uma distância de aproximadamente 2.0 cm de suas bordas.

Esse material foi incubado durante 48 horas a 25°C, sob luz alternada. Em seguida, discos de 0,7 cm de diâmetro, contendo micélio e esporos das 6 linhagens, foram transferidos para as placas em posição oposta à colônia do patógeno e assim, mantida durante 14 dias na presença de luz fluorescente contínua a 25°C.

As avaliações foram feitas baseando-se no critério de CAMPAROTA(1985), sendo:

$$\%C = \frac{DTx100}{DE}$$ onde,

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

DE=distância que separa os dois explantes (aproximadamente 4.0 cm)

Cada tratamento foi repetido 4 vezes e o delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados.

3.7.Interação de hifas de *T. flavus*.

T. flavus foram crescidas em meio de BDA o tempo suficiente para ocupar uma parte da lamínula de vidro disposta anteriormente na posicão frontal do inóculo. As colônias foram incubadas a 25 $\pm$2 °C sob luz contínua, durante 7 dias.

A seguir, semeou-se um disco do patógeno na placa e, por ocasião do encontro das hifas sobre a lamínula, efetuou-se a retirada, coloração com lactofenol e observações

microscópicas.

Os isolados de *Talaromyces flavus* utilizadas foram IK, IG, IR, T4, T22, T30.

3.8.Teste de antibiose das linhagens de *T. flavus* contra *V. dahliae in vitro*.

O objetivo foi avaliar o comportamento das linhagens de *T. flavus* como antagonistas ao fitopatógeno *V. dahliae*.

A metodologia usada consistiu em cobrir assepticamente a superfície da placa de Petri contendo meio extrato de malte com discos de papel celofane. A seguir, os discos de meio BDA, de 0,7 cm de diâmetro contendo micélios e conídios de *T. flavus*, foram colocados no centro das placas, sobre a superfície do papel celofane (DENNIS & WEBBSTER, 1971b).

As colônias foram incubadas por 7 dias , a 25 °C, na presença de luz fluorescente contínua.

Em seguida, retirou-se o papel celofane juntamente com a colônia do antagonista.

Discos de *V. dahliae* com 5 dias de crescimento, retirados das bordas das colônias, foram transferidos para o centro das placas.

As placas foram levadas para a incubadora a 25°C , sob luz alternada.

Após 5 dias de incubação, observou-se o diâmetro de crescimento das colônias, comparando-os com a testemunha crescida em ausência de *T. flavus*.

A porcentagem de inibição foi calculada por meio da

fórmula:

% de inibição=

$$\frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento do tratamento} \times 100}{\text{crescimento da testemunha}}$$

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 4 repetições.

3.9.Experimento em casa de vegetação ,interação em solo natural e esterilizado.

3.9.1. Preparo do inóculo.

Colocou-se 100 ml de milho pipoca pré-autoclavado em sacos de polipropileno 12 x 12 cm , adicionando-se 10 ml de H_2O destilada, e levou-se para esterilização em autoclave, a 120°C por 20 minutos em dois dias consecutivos. Em seguida , colocou-se 2 discos de BDA de 0,7cm de diâmetro contendo micélio e conídios de *V. dahliae* ou *T. flavus*.

Para incubação, os sacos contendo *V. dahliae* foram mantidos a 25 °C sob luz alternada, e para os antagonistas, a 25°C sob luz contínua, até que os grãos de milho pipoca estivessem totalmente colonizados pelos respectivos fungos.

3.9.2.Preparo do substrato.

Solo de floresta de textura argilosa foi autoclavado a 121°C por 1 hora em dois dias consecutivos(Tabela 1).

Tabela 1. Solo de floresta: Análise química da amostra de solo[1]

PH	m.O.	P	S-So4	N	Ca	Mg	Al	H+Al	Sb	T	V	M
Cact 2	%		ug/cm3				Meq 100 Cm^3					
5,4	6,0	21	67,80	0,29	1,6	0,5	3,7	16,6	2,3	18,9	12	62

1.As análises químicas foram realizadas pelo Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP.

3.9.3. Uso das linhagens de *T. flavus* no controle de *V. dahliae* em plantas de berinjela.

O objetivo foi verificar o efeito das linhagens(IK, IG, IR, T4, T22, T30) de *T. flavus* sobre a incidência de murcha de *Verticillium*, em berinjela,em solo natural ou esterilizado,o experimento foi feito em vasos com capacidade para 3 kg de solo.

A inoculação dos biótipos foi feita por ocasião do plantio, sendo colocado 100 g de inóculo preparado segundo o item 3.12.1.a uma concentração de 10^8 conídios de *Talaromyces flavus* e 1,75 x 10^{10} conídios de *V. dahliae*. Utilizou-se 0,2 g de benomyl por vaso.

A avaliação consistiu da verificação da severidade da doença em escala de notas de 0 a 3, O valor 0 consistiu de plantas totalmente sadias; 1, plantas sadias mas com descoloração no xilema; 2, clorose, definhadas e parcialmente com descoloração do xilema; 3, plantas murcha, mortas.

Avaliou-se também o peso seco de parte aérea, raiz e altura de plantas em solo natural.

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados com 3 repetições e quatro plantas por repetição.

3.10.Crescimento em meio BDA

Com o objetivo de estudar a esporulação, crescimento e coloração das colônias das linhagens de *Talaromyces*, cultivou-se inicialmente as colônias em meio BDA, e após 14 dias de incubação, discos de meio contendo micélio e conídios com 0,7 cm de diâmetro , foram retirados das margens das colônias e transferidos para placa de Petri contendo meio BDA.

Foi determinado o diâmetro de crescimento, no 14° dias de incubação, quando observou-se a esporulação, a coloração e a presença de setores nas colônias. A incubação deu-se à 25°C sob luz fluorescente contínua.

O delineamento foi em blocos ao acaso com três repetições.

3.11 .Producão de micélio seco de *T. flavus IK*.

Visando a obtenção de um produto a base de micelio de *T. flavus* , para posterior formulação, foram testadas meios de composição conhecida e meio constituido de resíduos industriais . O fungo foi cultivado em agitador mecânico (a 120 rpm a 28° C) em frascos (Erlemmeyers de 250 ml) contendo 100 ml de meio de cultura por 8 dias consecutivos. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com 3

repetições. Após o crescimento , o micélio foi filtrado e lavado 2 vezes com água destilada e seco em estufa a 45 °C por 8 dias consecutivos. A avaliação consistiu em aferir a massa seca dos respectivos tratamentos.

3.12. Produção de metabólitos de *T. flavus* IK (selvagem) e linhagem selecionada.

T. flavus foi multiplicado em frascos de 1000 ml contendo 350 ml de BD por sete dias consecutivos a 120 rpm 28 °C. O material foi filtrado e o sobrenadante extraido com acetona, em baixa temperatura e posteriormente com acetato de etila, concentrado em evaporador rotativo (KIM et al., 1988). A seguir, foi testado contra *V. dahliae* e outros patógenos de solo. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições.

3.13.Determinaçao de meio semi seletivo à T. flavus.

3.13.1. Reação de sensibilidade de linhagens de *T. flavus* aos fungicidas benomyl, chlorothalonil, dicloran, iprodione, sportak, dodine, rosa bengal, propiconazole.

O objetivo foi verificar o comportamento das linhagem IK de *T. flavus* nas concentrações 0,1; 1,0; 10,0; 100 ppm do princípio ativo dos fungicidas.

A colônia da linhagem selvagem IK foi cultivada inicialmente em BDA e após 14 dias de incubação , sob luz contínua, e 25 °C, discos contendo micélio e conídios, com 0,7cm de diâmetro foram retirados da margem das colônias e

transferidos para Placa de Petri contendo meio basal suplementado com fungicida.

O meio de cultura com fungicida foi preparado dissolvendo-se o produto em acetona (5,0ml), quando necessário, e completando-se o volume com água destilada esterilizada (solução estoque) de acordo com a técnica de EDGINTON et al. (1971), modificada por MENTEN et al. (1976). a partir desta solução foram feitas diluições, transferindo-se uma alíquota de 1,0ml de cada suspensão para 100 ml de meio basal fundente ($\pm 45^{o}C$) de maneira a obter-se as concentrações desejadas para cada fungicida.

A incubação deu-se a $25^{o}C$, sob luz fluorescente contínua.

A avaliação consistiu de:

Cálculo da porcentagem de redução de crescimento das colônias (RC%), utilizando-se a fórmula:

$$RC\% = \frac{(DT-CTF)\ DP\ x100}{DT}, \text{ onde:}$$

DT , diâmetro médio da testemunha e CTF é o total de crescimento da colônia (em cm) nos tratamentos.

A medida do diâmetro das colônias em crescimento foi efetuada 10 dias após a instalação do experimento.

O delineamento experimental foi o blocos casualizados com 4 repetições.

3.13.2.Sensibilidade de fungos isolados de solo a fungicidas.

O objetivo foi verificar o comportamento dos fungos,*Trichoderma sp, Rhizoctonia solani, T. flavus, p. sp.*

isolados de solo aos fungicidas selecionados (dodine, rosa bengal, rovral, dicloram, propiconazole, benomyl, sportak) e às concentrações determinadas no item 3.13.1.(1,0; 0,1; 0,1; 0,1; 1,0; 0,1; 10,0 respectivamente).

O critério de avaliação foi o mesmo do item 3.13.1.

3.14. Encapsulação de conídios e micélio de *T. flavus*.

Os conídios da linhagem de *T. flavus* foram preparados em sacos de polipropileno, os quais continham 100 ml de milho pipoca autoclavada por 20 minutos e em dois dias consecutivos. Após o que repicou-se dois discos de 7 mm de diâmetro, dos bordos das colônias, do antagonista. A incubação deu-se a 25°C sob luz contínua por 14 dias.

Os conídios de *T. flavus* foram extraidos do meio de cultura sólido e utilizadas na formulação em "pellets". A concentração de esporos na suspensão foi aferida com auxílio de câmara de Neubauer.

Adotou-se pectina a 2%, alginato a 1% e 10% caulin como carregador e cloreto de cálcio a 3,7% como solução geleificante. Esporos e células foram adicionados a concentração $2X10^4$ conidios/ml sendo que a concentração por "pellet" estimada para o presente ensaio pode ser convertido pela fórmula:

$$\text{Número de conídios/pellet} = \frac{1.298x10^5 \text{ conidios}}{P.1g \text{ "pellet"}}$$

P=número de "pellets"/g

O delineamento adotado foi o fatorial com quatro níveis sendo os fatores tipos de polímeros (alginato e pectina cítrica), tipos de propágulos (micélio, micélio + esporos, esporo), condição de armazenamento (temperatura ambiente e a 4°C), tempo (armazenamento) e uma variável resposta, viabilidade.Avaliou-se a viabilidade por meio de plaqueamento de 20 "pellets" em BDA acrescido de estreptomicina e incubando-se por 7 dias sob luz contínua a 25 °. Cada tratamento constou de duas repetições.

3.15.Caracterização citologica das linhagens de *T. flavus*

Foram realizadas observações citológicas da coloração de núcleos, estimando-se o número de núcleos por conídios e ascosporos e tamanho (comprimento e largura) dos mesmos pelo método de TANAKA et al.(1979). Para estes estudo, os biótipos foram previamente cultivados em BDA por 14 dias sob luz contínua a 25 °C, para produção de conídios, e no escuro para Ascosporos.

Foram avaliadas 50 conidios e ascosporos de cada biótipo.

Conídios e ascosporos dos referidos biótipos foram aderidos às lamínulas usando-se solução de albumina, utilizando-se para fixação, uma solução de álcool- ácido acético 3:1, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A hidratação foi efetuada por tratamento sucessivo em álcool, 95% e 70% , procedendo-se em sequida, a hidrólise em ácido

clorídrico 1N a 60°C, variando o tempo de hidrólise de acordo com a linhagem.

Os conídios e ascosporos foram corados por imersão em solução de Giemsa diluida de 1:6 com tampão fosfato 0,02 M pH 7,0, durante 10 a 15 minutos. O excesso de corante foi retirado por lavagem com o mesmo tampão. Para observações microscópicas foi utilizado o microscópio CARL ZEIS (JENA) , modelo JENAMED2 , associado ao sistema fotomicrografico MF-AKS, modelo 24X16 EXPOMET , quando necessário.

3.16.Caracterização para padrão de esterase

Com o objetivo de verificar a diversidade genética das linhagens IK, IG , IR, T4 ,T22, T30 utilizou-se a metodologia apresentada por PACCOLA-MEIRELLES et al. (1988) na extração de proteinas , preparo das amostras e do gel de acrilamida para eletroforese.

Os geis de poliacrilamida foram retirados da placa e incubados em solução corante , à temperatura ambiente até as bandas aparecerem. Posteriormente , os geis foram lavados em água e fixados em solução aquosa de glicerol 10% para revelação da atividade de esterase.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.Teste *in vitro* com linhagem de *Talaromyces flavus* e *Verticillium dahliae*.

4.1.1. Antagonismo de confrontação direta de linhagens de *T. flavus* contra *V. dahliae*

Pode-se observar que o T4 e T30 apresentaram os melhores resultados quanto a porcentagem de colonização(Tabela 2).

Tabela 2. Antagonismo de confrontação direta de linhagens de *Talaromyces flavus* contra *Verticillium dahliae*.

linhagem	colonizacao[1] media *(%)*	5%	1%
T4	100,00	a	A
T30	98,70	a	A
IK	66,59	b	B
IR	66,59	b	B
IG	66,53	b	B
T22	50,00	b	B

Médias de 4 repetições obtidos através da porcentagem de colonização (%C), segundo CAMPAROTA (1985).
Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si para comparação de % de colonização a nível de significância indicado.

D.M.S.1%= 2.0322

4.1.2.Teste de antibiose de linhagens de *T. flavus* contra *V. dahliae*.

Quanto ao teste de antibiose verificou-se que a produção de metabólitos tóxicos variou amplamente entre as linhagens ensaiadas e dentro dos mutantes morfológicos de *T. flavus*(Tabela 3).

A linhagem IG mostrou-se excelente produtora de antibióticos visto que apresentou porcentagem superior de inibição, seguida da linhagem T4.

Tabela 3. Teste de antibiose de linhagens de *Talaromyces flavus* contra *Verticillium dahliae*.

Linhagens	inibição de crescimento(%)	
IG	75.2800	A
T4	73.0925	B
IK	25.0000	C
IR	25.0000	C
T22	0.0000	C
T30	0.0000	C
TEST	0.0000	C

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si para comparação de colonização a nível de significância indicado.
D.M.S.1%= 2.0322

A partir deste ensaio foi possível detectar os melhores produtores de metabólitos em meio de cultura. Entre os mecanismos de antagonismo de *T. flavus* contra *V. dahliae*

está a antibiose (MAROIS et al., 1984) inibindo o crescimento do patógeno ou atuando na morte de estruturas de resistência como escleródios e microescleródios (FAHIMA et al., 1992; MAROIS et al, 1984) sendo que, a toxicidade do mesmo tem sido atribuida a glucose oxidase (KIM et al.,1988) e enzimas degradadoras de parede (MADI et al., 1989)

4.1.3. Interação de hifas de *T. flavus* e *V. dahliae*.

Para o estudo da interação de hifas dos dois fungos foram feitas observações microscópicas por meio de montagens de lâminas em culturas pareadas.

Tabela 4. Interação de hifas de *Talaromyces flavus* e *Verticillium dahliae*.

Linhagem de *T. flavus*	Tipo de parasitismo					
	Enovelamento	contato intimo	Lise	vacuolise	rede	ganchos
T4	0	0	+	+	0	0
T22	0	0	0	0	0	0
T30	0	0	0	+	0	0
IK	0	0	0	+	0	0
IG	0	0	0	0	0	0
IR	0	0	0	+	0	0

Obs: 0= não ocorrem + = ocorrem

Não foi observado crescimento pararelo de hifas de *T. flavus* e *V. dahliae* nas linhagens ensaiadas, nem estruturas semelhantes a ganchos, em direção aos feixes de hifas do hospedeiro, nem a formação de rede de hifas do

hospedeiro ou enovelamento e contato íntimo. Apenas lise e vacuólise foram observadas em poucas linhagens(Tabela 4).

DENNIS & WEBSTER (1971) observaram que a vacuolização e lise ocorre frequentemente devido à produção de antibióticos no gênero *Trichoderma*. A observação de ocorrência de vacuólise e lise confirmam que antibiose por meio de metabólitos tóxicos e enzimas deva ser o principal mecanismo pelo qual *T. flavus* efetua o controle de patógenos do solo. Enzimas hidrolíticas produzidos por *T. flavus* além de degradar hifas de uma gama de fungos patogênicos podem destruir estruturas de resistência como escleródios, que possuem camadas rígidas de melanina (ELAD et al., 1984).

Segundo MACLAREM et al. (1986), a invasão por *T. flavus* em *S. sclerotiorum* ocasiona a agregação do citoplasma e numerosos grânulos finos, estendendo o efeito às células adjacentes. Frequentemente a desintegração do citoplasma ocorre anteriormente ao evento de penetração dentro da célula hospedeira. Observa-se o enovelamento do hiperparasita ao redor da hifa do patógeno em estádios tardios que torna-se bastante profuso contrastando com o observado em *V. dahliae*.

A eficiência do agente de controle de fitopatógenos pode depender parcialmente de sua capacidade para proliferar durante um curto período de tempo das condições ambiente favoráveis antes de encontrar o patógenos de plantas. Um crescimento mais rápido e esporulação podem significar melhor eficácia no campo. Assim embora *T. flavus* tenha parasitado *S. sclerotiorum*, o controle eficiente depende de outros atributos.

ADAMS(1989) ensaiou oito antagonistas relacionados a escleródios de *Sclerotinia* de três diferentes modos em solo, a fim de determinar alguns dos atributos importantes no controle biológico de patógenos de solo. *P. citrinum*, *T. flavus*, *G. virens*, *Trichoderma* spp. não reduziram a sobrevivência de escleródios de *S. minor* em cada um dos três experimentos. Apenas *S. clerotivorum* e *T. oligantrum* foram capazes de causar uma marcada redução na sobrevivência de *S. minor* quando esporos do antagonista foram adicionados ao solo. Estes micoparasitos foram ativos quando aplicados a nível de 10-14 esporos por grama de solo, enquanto que outros antagonistas foram inefetivos a 10^6-10^7 esporos/ml. A superioridade destas duas linhagens foi atribuida a macroconídios que foram capazes de germinar em solo quando estes estavam adjacentes ao escleródio de *Sclerotinia* spp. Os macroconídios foram capazes de infectar o escleródio, causar o seu decaimento, e , dando continuidade ao processo, crescendo no solo e infectando escleródios saudaveis. Uma vez que hifas dos antagonistas foram observadas por ocasião da coleta dos escleródios conclui-se que os mesmos serviram de substrato para crescimento, protegido de outros microrganismos, que crescem no solo.

DAVET(1986) trabalhando com 20 isolados de *Trichoderma* spp concluiu que atividade parasítica em solo não esterilizado varia positivamente com a capacidade competitiva saprofítica. O micoparasita deve ser capaz de infectar e destruir o fitopatógeno além de crescer em solo natural e infectar propágulos saudáveis do patógeno.

4.2.Experimento em casa de vegetação

4.2.1 Teste de antagonismo I: Infestação do solo com *V. dahliae* em solo esterilizado.

A capacidade de agentes de biocontrole serem efetivos no controle de doenças de plantas pode ser limitada a vários fatores, tais como: sobrevivência no solo e na rizosfera, pH, temperatura, agressividade do patógeno, suscetibilidade do hospedeiro, umidade e qualidade da base alimentar, entre outros.

Embora *V. dahliae* seja favorecido por temperaturas amenas, o que propicia um aumento de severidade da doença, este fato não prejudicou o biocontrole nas condições do experimento. 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, parte dos pelos radiculares e raízes secundárias são rompidas. Desta maneira, a penetração do patógeno foi favorecida pela ausência de barreiras físicas no hospedeiro.

Tabela 5 . Severidade da doença em plantas de berinjela inoculadas com *Verticillium dahliae* nos Tratamentos com *Talaromyces flavus* em solo esterilizaodo.

Tratamentos	notas[1]	
Testemunha (inoculada)	2.6667	A
IK	2.0833	A
IG	2.0000	A
T22	2.0000	A
QUIMICO(benomyl)	2.0000	A
IR	1.0000	B
T30	0.6667	BC
T4	0.0000	C

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

D.M.S.1%=0.7680

1- Escala: 0 = plantas sadias

1 = plantas sadias mas com descoloração no xilema

2 = clorose , definhadas e parcialmente com descoloração no xilema.

3 = plantas murchas e/ou mortas.

Observou-se que as plantas infectadas com as linhagens T4 e T30 de *T. flavus* e também em menor escala, IR apresentaram menor severidade da doença. Isso pode ser atribuido a produção de metabólitos pela linhagem T4 e com menor destaque por IR, em quantidades suficientes no solo e posterior difusão dos mesmos no solo, uma vez que estas linhagens foram as melhores no teste de antibiose. Mas T30 não se destacou na produção de metabólitos "in vitro", entretanto apresentou resultados semelhantes ao T4 em confrontação com o

patógeno, assim a sua eficiência em controlar o patógeno ocorreu provavelmente por outro mecanismo, ou seja a competição.

Embora tenha sido verificado que *T. flavus* reduz a população de microescleródios viáveis de *V. dahliae* em condição de campo (FRAVEL , 1984) e a produção de metabólitos tenha explicado em parte esta redução, observamos que as linhagens podem diferir, quanto ao mecanismo mais importante no controle.

4.2.2 .Teste de antagonismo II. Infestação com *V. dahliae* em solo não esterilizado.

Pode-se observar pela Tabela 6 que a severidade da doença nesse ensaio foi menor que a do ensaio anterior. Provavelmente isto pode ter ocorrido devido à competição tanto do antagonista quanto do patógeno com a microbiota naturalmente existente no solo.

As linhagem IG e T4 produziram efeitos que resultaram na menor severidade da doença(Tabela 6).

O tratamento químico não foi eficiente no controle da doença, pois não foi diferente da testemunha inoculada.

Atribuiu-se o sucesso do biocontrole neste ensaio a presença de antagonistas no solo, pois as linhagens ensaiadas foram capazes de colonizar raizes do hospedeiro e foram detectadas no solo por ocasião da avaliação do experimento.

Os antagonistas que apresentaram maior porcentagem de inibição no teste de antibiose foram também melhores neste bioensaio(Tabela 3 e 6).

Pode-se observar que a linhagem T4 apresentou a melhor redução da severidade da doença tanto em solo esterilizado como em solo não esterilizado, o que pode ser devido à produção de metabólitos e boa competitividade da linhagem no solo e na rizosfera (Figura 1).

Tabela 6 .Severidade de doenças na interação entre *Talaromyces flavus* e *Verticillium dahliae* em solo natural(não esterilizado).

Tratamentos	notas[1]	5%	1%
T30	1.5811	a	A
Benomyl	1.5811	a	A
Testemunha(inoculada)	1.5811	a	A
T22	1.5254	a	AB
IK	1.2247	ab	AB
IR	1.0521	bc	BC
testemunha(sem inoc.)	1.0521	bc	BC
T4	0.7071	c	C
IG	0.7071	c	C

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significancia indicado pelo teste de Tukey.

D.M.S. 5%= 0.41389 D.M.S.1%= 0.50723

1-Escala: 0 = plantas sadias

1 = plantas sadias mas com descoloração no xilema

2 = clorose, definhadas e parcialmente com descoloração no xilema.

3 = plantas murchas e/ou mortas

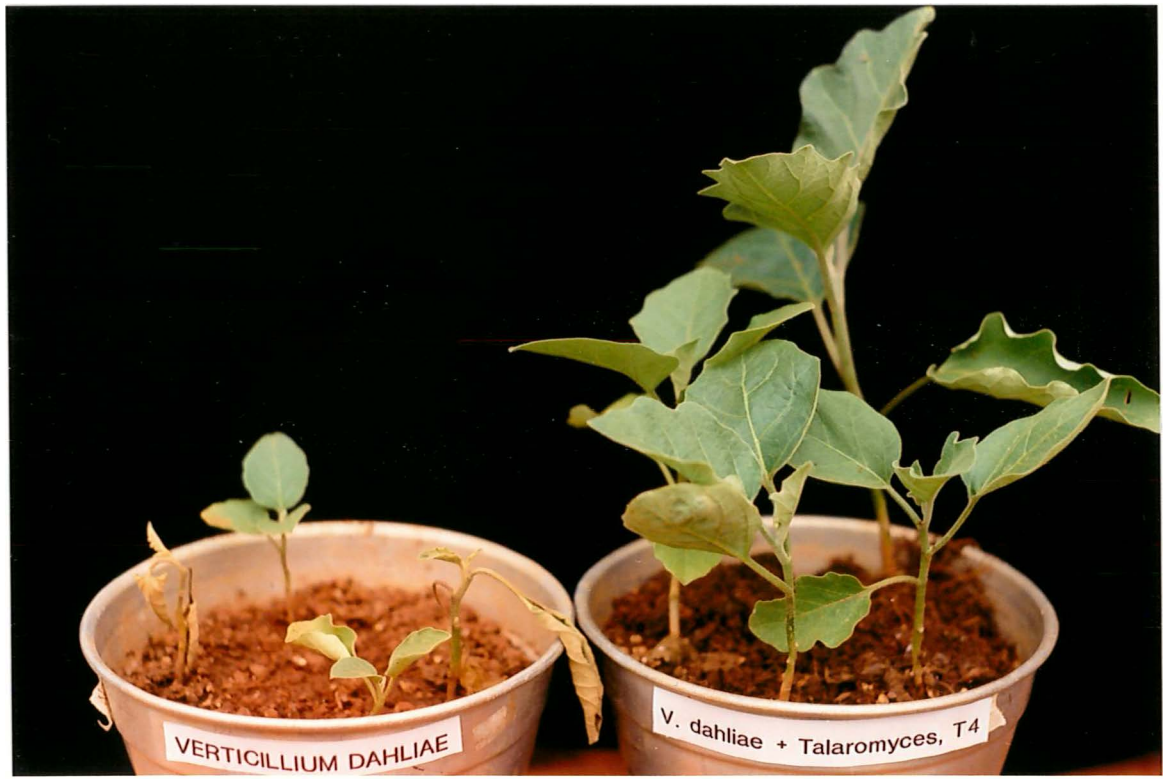

Figura 1. Severidade de doenças na interação da linhagem de *Talaromyces* T4 com *Verticillium dahliae*. a) *V. dahliae* b) *V. dahliae* + *Talaromyces* T4.

4.2.3. Influência da interação entre *T. flavus* e *V. dahliae* no desenvolvimento de plantas em solo natural.

A linhagem T4 foi capaz de favorecer o crescimento da cultivar de berinjela (EMBU) .

TABELA 7.Influência entre *Talaromyces flavus* e *Verticillium dahliae* no desenvolvimento de *Solanum melongena L.*

Linhagens	Peso de matéria seca (g)				Altura	
	P. aérea		Raiz			
T4	0,7200	A	1,2658	A	11,7500	A
IR	0,2626	B	0,2626	B	0,4358	BC
T30	0,2041	B	0,2133	C	5,6660	C
IK	0,2600	B	0,4258	BC	7,5410	BC
IG	0,5026	AB	0,7250	B	8,7910	B
T22	0,1291	B	0,2016	C	6,4580	BC
Benomyl	0,2925	B	0,4100	BC	6,1660	BC
Testemunha	0,1833	B	0,2966	C	6,1660	BC
Branco	0,3325	AB	0,3875	BC	6,0300	BC

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

D.M.S. raiz= 0,43958
D.M.S.P.aérea= 0,42211
D.M.S altura= 5,0959

Pode-se verificar que as plantas cresceram melhor com a linhagem T4. Provavelmente deve ter ocorrido uma interação benéfica entre esta linhagem e a microflora existente no solo. As interações entre outras linhagens e o patógeno não resultaram em efeito no crescimento da planta hospedeira.

A promoção de crescimento de plantas por bactérias ou fungos (BROWN, 1974a,1974b) pode envolver: a) Controle de patógenos secundários da rizosfera(BROADBENT et al, 1977;ELAD et al,1987, KLOEPPER & SCHROT, 1981, SUSLOW & SCHROTH, 1982); b)Produção de hormônios (BAKER et al,1984; CHANG et al, 1986,WINDHAN et al, 1986). c)Produção de vitaminas ou conversão de materiais em formas úteis à planta (BARBER & LYNCH, 1977; BROWN, 1974a) d) Liberação de nutrientes do solo ou matéria organica (BARBER & LYNCH, 1977; BROWN, 1974a) e)Aumento da translocação de minerais (BROWN, 1974a)

Provavelmente a interação com *V. dahliae* afeta a planta hospedeira via mais de um desses mecanismos . A compreensão dos mesmos pode servir para a otimização do uso de fungos em induzir crescimento em várias culturas, e como agente do controle biológico.

4.3.Crescimento em BDA.

As linhagens de *T. flavus* crescidas por 14 dias sob luz contínua a 25°C apresentaram diferenças significativas quanto ao crescimento e esporulação em meio BDA (Tabela 8).

A linhagem T4 é a de maior crescimento enquanto que

IG apresenta a maior esporulação dentre todas as linhagens utilizadas.

Tabela 8.Crescimento (cm) e esporulação de 6 linhagens de *Talaromyces flavus* em meio BDA.

linhagem	crescimento	Esporulação ($x10^4$ esporos/ml)
T4	8.00.A.	0.750 B
IG	6.00 B	10.000 A
T90	4.90 C	9.000 B
IK	3.76 D	1.750 B
IR	3.30 D	0.875 B
T22	2.20 E	2.125 B

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

D.M.S.1% crescimento= 0,79430 D.M.S.1% esporulação=2.3727

Estas duas linhagens apresentaram os melhores controles de *Verticillium* em solo não esterilizado, sendo que T4 provavelmente produziu antibióticos, produtos do metabolismo secundário, mais rapidamente que as demais linhagens devido ao rápido crescimento. A linhagem IG, embora apresentando um menor crescimento, mostrou maior esporulação, estes dois fatores poderiam ter contribuido para uma rápida produção de metabólitos secundários, e competição em solo natural, contribuindo para o controle da doença e crescimento de mudas de berinjela.

4.4.Produção de micélio de *T. flavus*.

O meio glucose levedura de indústria destacou-se na produção de matéria seca e glucose milhocina foi o que deu maior esporulação(Tabela 9).

Tabela 9 . Produção de micélio seco pela linhagem Ik de *Talaromyces flavus* em meios sintéticos e constituidos de resíduos industriais.

MEIOS DE CULTURA **	PESO DE MATERIA SECA G/ 100ml		ESPORULACAO (X 5 X 10^4 ESPOROS /ml)	
G.L.INDUSTRIA	0,9267	A	2,50	B
G.MILHOCINA	0,6400	B	136,00	A
M.MILHOCINA	0,5967	BC	6,00	B
M.D.PEPTONA	0,4067	BCD	2,00	B
G.N.AMONIO	0,3833	CDE	0,75	B
S.N.SODIO	0,3133	DE	0,00	B
SABOURAUD	0,3067	DE	2,00	B
EXT.L.D.PEPTONA	0,2300	DE	0,00	B
B.D.	0,1200	E	0,50	B

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

D.M.S.1%= 0.2664

Desvio padrão=0.0930 Erro padrão da média= 0.05337

Média geral= 0.4348 Coeficiente de variação= 21.40

G= glucose L=levedura M=melaço D=dextrose

N=nitrato S=sucrose Ext=extrato B=batata

4.5 .Otimização da produção de propágulos

O interesse em estudar a otimização de produção de propágulos está na utilização deste em formulações. Conídios e micélio podem ser usados em conjunto ou separadamente e posteriormente aplicados ao solo.

Os resultados mostram (Tabela 9) melhor produção de materia seca em meio de glucose levedura de indústria, e esporulação no meio glucose milhocina.

Os resultados na Tabela 10 mostram que o pH tem efeito na produção de micélio seco por *T. flavus* (linhagem IK) sendo que a partir de 72 horas de crescimento houve diferença significativa.

Tabela 10 .Efeito de pH no crescimento e produção de micélio seco de *Talaromyces flavus* em glucose - milhocina.

TEMPO DE CRESCIMENTO	PESO DE MICELIO SECO	
	pHO=4,0	pHO=6,0
24	0.1067 C a	0.0467 C a
48	0.0800 C a	0.0900 C a
72	0.3833 C b	0.1433 BCa
96	0.3967 B b	0.2633 Ba
120	0.6533 A b	0.2667 Ba
144	0.6500 A b	0.4733 Aa

Média geral do ensaio= 0.2911

Desvio padrão=0.0772

Coeficiente de variação=26.5157

D.M.S.1%= 0.1948 para comparação de tempo dentro de pH

D.M.S.1%= 0.1301 para comparação de pH dentro de tempo de crescimento.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não deferem entre si a nível de 1% para comparação de tempos de crescimento.

Médias seguidas de mesma letra minúscula não deferem entre si a nível de 1% para comparação de pH dentro de cada tempo de crescimento.

Os resultados mostram que houve efeito de pH no crescimento de *T. flavus* sendo que o pHo=4,0 permitiu maior crescimento.

4.6. Extração de metabólitos.

Os efeitos exercidos pelos metabólitos foram variáveis de acordo com as linhagens ensaiadas e entre os patógenos, mostrando que podem ocorrer tanto diferenças quantitativas como qualitativas(Tabela 11).

Esses metabólitos são termolábeis com ponto de fusão T4=22,8212 e IK= 21,77418(Determinado no laboratório de química analítica do CNPMA\EMBRAPA), fez-se necessária a sua conservação sob refrigeração. Principalmente devido a essa termolabilidade, PROKSA et al. (1992) estudaram a estabilização de uma das moléculas, o ácido 2-metil sorbico, através de bromoderivados.

As medidas de controle recomendadas para o combate de patógenos de solo, em várias culturas, como inundação de terrenos infestados , rotação de culturas, aplicação de fungicidas e uso de variedades resistentes não são muito eficientes quando estão presentes formas de resistência como escleródios(GROGAN, 1979; BARROS,1988). Assim , um método alternativo de controle seria o uso de linhagens de *T. flavus* com características de boa produção de antibióticos e enzimas de amplo espectro de ação.

Tabela 11 . Espectro de ação de metabólitos de *Talaromyces flavus* IK e T4 na inibição do crescimento micelial de 6 isolados de fungos patogênicos.

Patógenos	inibicao de crescimento micelial (%) IK	T4
Sclerotium rolfsii	21.73 bA	52.25 aA
Fusarium solani (pep)	16.00 aAB	49.11 aB
Verticillium dahliae	13.39 bAB	23.27 aA
Rhizoctonia solani	6.44 bBC	23.19 aB
Sclerotinia sclerotiorum	5.93 bBC	20.68 aB
Fusarium solani fsp phaseoli	0.00 bC	20.50 aB

Médias seguidas de mesma letra maiuscula não diferem entre si, para comparação entre patógenos dentro de *Talaromyces*.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si para comparação de *Talaromyces* dentro de patógenos.

D.M.S.1%= 13.32022

Além da inibição de crescimento micelial, foi estudada também a porcentagem de inibição de *S. rolfsii* por metabólitos tóxicos das linhagens IK e T4 de *T. flavus* (Tabela 28).

Tabela 12 Porcentagem de inibição da germinação de escleródios de *Sclerotium rolfsii* por metabólitos das linhagens de *Talaromyces flavus* IK e T4

Concentração de metabolitos	germinação de *S. rolfsii* (%)		
	T4	IK	acetato de etila
100.0 %	0.0	0.0	100.0
50.0 %	0.0	0.0	100.0
10.0 %	0.0	0.0	100.0
1.0 %	0.0	100.0	100.0
0.1 %	100.0	100.0	100.0
0.0 %	100.0	100.0	100.0

A principal forma de atuação de *T. flavus* na inibição de outros fungos é por meio da produção de metabólitos(FAHIMA & HENIS (1992) citados por MADI *et al.*,1992.

Sabe-se que não há evidências de que os antibióticos sejam produzidos no solo em quantidades suficientes para induzir resultados efetivos no controle biológico de fitopatógenos (PAPAVIZAS , 1987). Entretanto uma vez que houve controle efetivo pelas linhagens T4,IG e IR, os antibióticos e enzimas podem estar sendo produzidos em quantidades suficientes para se tornarem efetivas conjuntamente com o mecanismo de competição.

Muitas linhagens de *T. flavus* produzem antibióticos ativos contra uma certa faixa de fungos do solo. *T. flavus* tem sido efetivo contra *Sclerotinia sclerotiorum* (MACLAREN *et al.* ,1986), *Rhizoctonia solani* (BOOSALIS,1956) , *Sclerotium rolfsii* (MADI & HENIS, 1989), e na murcha de *Verticillium* em tomate, berinjela e batata (DAVISET et al.,1986; DUTTA, 1981; FRAVEL et al.,1986; MAROIS et al. , 1982).

Muitas questões permanecem sem respostas sobre a

natureza dos metabólitos antifúngicos produzidos por *T. flavus* e sua atuação no biocontrole. Há uma aparente necessidade de estudos interdisciplinares envolvendo microbiologistas e a química de produtos naturais entre outras. Um esforço para caracterizar metabólitos de linhagens promissoras, em agente de controle biológico é necessário. A questão se estes metabólitos são produzidos, e se sua atividade ocorre *in vivo* ou não, tem sido um desafio. Uma vez que os metabólitos antifúngicos de *T. flavus* (IG e IR) e T4 foram efetivos para a atividade de biocontrole, o conjunto de moléculas ativas produzidas por estas espécies poderia propiciar um modelo de síntese de melhores fungicidas. Posteriormente, estes metabólitos poderiam ser selecionados para outras atividades biológicas, isto é, como reguladores de crescimento, e agentes fungicidas.

4.7 Determinação de meios semi seletivos para *T. flavus*

Sensibilidade de *T. flavus* à fungicidas

Para cercobin, dicloran, carbedanzim, benomyl,chlorothalonil ocorreu 100 % de redução no crescimento das linhagens a partir de 10,0 ppm. Como é mais interessante a seleção de fungicidas que ocasionem menor porcentagem de inibição,foram selecionados àqueles que permitiram porcentagem de inibição menor que 45 %. Assim dodine, propiconazole, sportak, R. bengal, dicloran , iprodione, benomyl, foram ensaiados para sensibilidade de fungos isolados de solo (Tabela 32) , nas concentrações 1.0 ppm; 1.0 ppm; 10.0ppm ;0.1

ppm; 0.1 ppm ; 0.1 ppm ; 0.1 ppm ,respectivamente.

Tabela 13 .Sensibilidade de linhagens de *Talaromyces flavus* à fungicidas.

Fungicida	Dose (ppm)			
	0.1	1.0	10.0	100.0
Benomyl	25,1279 bB	100,0000 aA	100,0000 aA	100,0000 aA
Chlorothalonil	57,1053 bA	100,0000 aA	100,0000 aA	100,0000 aA
Dicloran	14,0191 cC	25,0000 bC	100,0000 aA	100,0000 aA
Iprodione	16,6114 cBC	60,0000 bB	84,6099 aB	83,6786 aB
Sportak	16,6114 cBC	17,5878 cC	33,3330 bB	69,9998 aC
Dodine	0,0000 cD	0,00000 cD	30,0000 D	66,7590 aC
Rosa Bengal	18,1606 cBC	25,7619 cC	50,9608 C	73,5379 aC
Propiconazole	23,9151 cB	28.70680 cC	58,8506 aC	36,5240 bD

Médias seguidas de mesma letra minuscula não diferem entre si para comparação de dose dentro de fungicidas (teste de Tukey a 1%).

Médias seguidas de mesma letra maiúsculla não diferem entre si para comparação de fungicidas dentro de concentração (teste de Tukey a 1%)

D.M.S.1%= 6.38906 (para comparação de doses dentro de fungicidas)

D.M.S.1%= 7.27163(Para comparação de médias de fungicidas dentro de doses)

O critério para seleção de fungicidas foi baseado na sensibilidade diferenciada entre linhagens de fungos isolados de solo e de *Talaromyces*, sendo interessante a não inibição de *Talaromyces* mas sim , inibição dos fungos de solo. Desta maneira propiconazole, benomyl e Sportak foram utilizados

para compor o meio semi seletivo.

A contagem de ufc mostrou que o número foi superior no meio formulado através de reação de sensibilidade à fungicidas comparada ao utilizado por MAROIS *et al.*,(1984) por ocasião da avaliação da habilidade de *T. flavus* em colonizar a rizosfera e sua interação com *V. dahliae*.

Tabela 14 .Sensibilidade de 4 espécies de fungos isolados de solo à cinco fungicidas .

Fungicida	% de reducao de crescimento cm			
	Trichoderma	*Rhizoctonia*	*Talaromyces*	*Penicillium*
DODINE	0,0000 bC	0,0000 bA	57,7339 aE	0,0000 bD
R. BENGAL	0,0000 bC	0,0000 bA	35,5454 aD	0,0000 bD
ROVRAL	0,0000 bC	0,0000 bA	55,4999 aB	0,0000 bD
DICLORAN	0,0000 bC	0,0000 bA	50,0000 aC	0,0000 bD
PROPI.	44,4270 aB	0,0000 cA	33,3298 bE	33,3229 bC
BENOMYL	0,0000 cC	0,0000 cA	27,7669 bF	82,6743 aB
SPORTAK	100,0000 aA	0,0000 cA	61,1099 bA	100,0000 aA

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si para comparação entre fungicidas dentro de espécies de fungos isolados de solo (teste de Tukey a 1%)

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para comparação de espécies dentro de fungicidas (teste de Tukey a 1%).

O princípio de inibição seletiva (TSAO, 1970) foi utilizado para desenvolver este meio semi seletivo. O alto nível de fungicidas propiconazole, benomyl e sportak tolerado pela linhagen de *T. flavus* justificaram seu uso como

ingredientes do meio semi seletivo.

O desenvolvimento de um meio semi seletivo é importante para restringir o rápido crescimento da microflora natural do solo. *T. flavus* é isolado comumente com outros fungos de solo por ocasião da avaliação da população do antagonista e do patógeno.

Quando os fungicidas são usados em combinação, pode ocorrer sinergismo ou antagonismo entre certos compostos prevenindo o sucesso da quantificação e monitoramento de organismos desejáveis (TSAO, 1970). Um exemplo de sinergismo pode ser exemplificado com rosa bengal e benodanil onde há necessidade da redução da concentração deste último, pois o composto torna-se mais inibitório quando em conjunto com o rosa bengal.

Embora as possíveis combinações não tenham sido avaliadas, o meio determinado permitiu melhor monitoramento da linhagem IK se comparado ao meio de *T. flavus* de MAROIS *et al.*,1984.

4.8.Encapsulação de conídios de *T. flavus*.

Dentro das condições de armazenamento à 4 °C, os parametros avaliados não diferiram entre si à nível de 1% de probabilidade. Em temperatura ambiente , houve diferenças a partir do 5° mês de armazenamento, entre os polímeros de alginato e pectina, quando o propágulo utilizado foi o esporo.

Uma vez que o efeito exercido pelos tipos de polímero foram semelhantes entre si, quando utilizou-se micélio ou micélio mais esporos, como propágulo, a pectina extraida da

polpa da laranja pode ser utilizada em detrimento do alginato.

4.9. Caracterização das linhagens de *T. flavus*

4.9.1.Caracterização citológica.

Foram analisadas 50 conídios de cada biótipo. Linhagens com esporos uninucleados constituemum material propício para futuros estudos genéticos , uma vez que a obtenção e seleção de mutantes é facilitada a partir de conídios e ascosporos uninucleados (Figs. 2 e 3).

O tamanho dos ascosporos (3,00 a 4,00 µm) está de acordo com o descrito por STOLK & SAMSOM (1972). Os esporos de T4 são menores que o descrito (2,2-3,5µm) T30, IK e IR apresentam dimensões em concordância com a literatura..

TABELA 15. Tamanho de conídios, ascosporos e frequência de núcleos por conídios e ascosporos de linhagens de *Talaromyces flavus* (Média de 50 conídios).

Linhagens	Conídios (υm)		F%	Ascosporos		F%
	comprimento	Largura		Comprimento	Largura	
T4	1,016	1,024	---	---	---	---
T22	---	---	---	3,054	2,502	100
T30	2,030	1,050	100	3,024	2,024	100
IK	2,012	1,082	100	3,012	2,010	100
IG	2,497	1,077	100	3,024	2,008	100
IR	2,030	1,498	100	3,012	2,030	100

F%= Frequência de conídios e ascosporos uninucleados

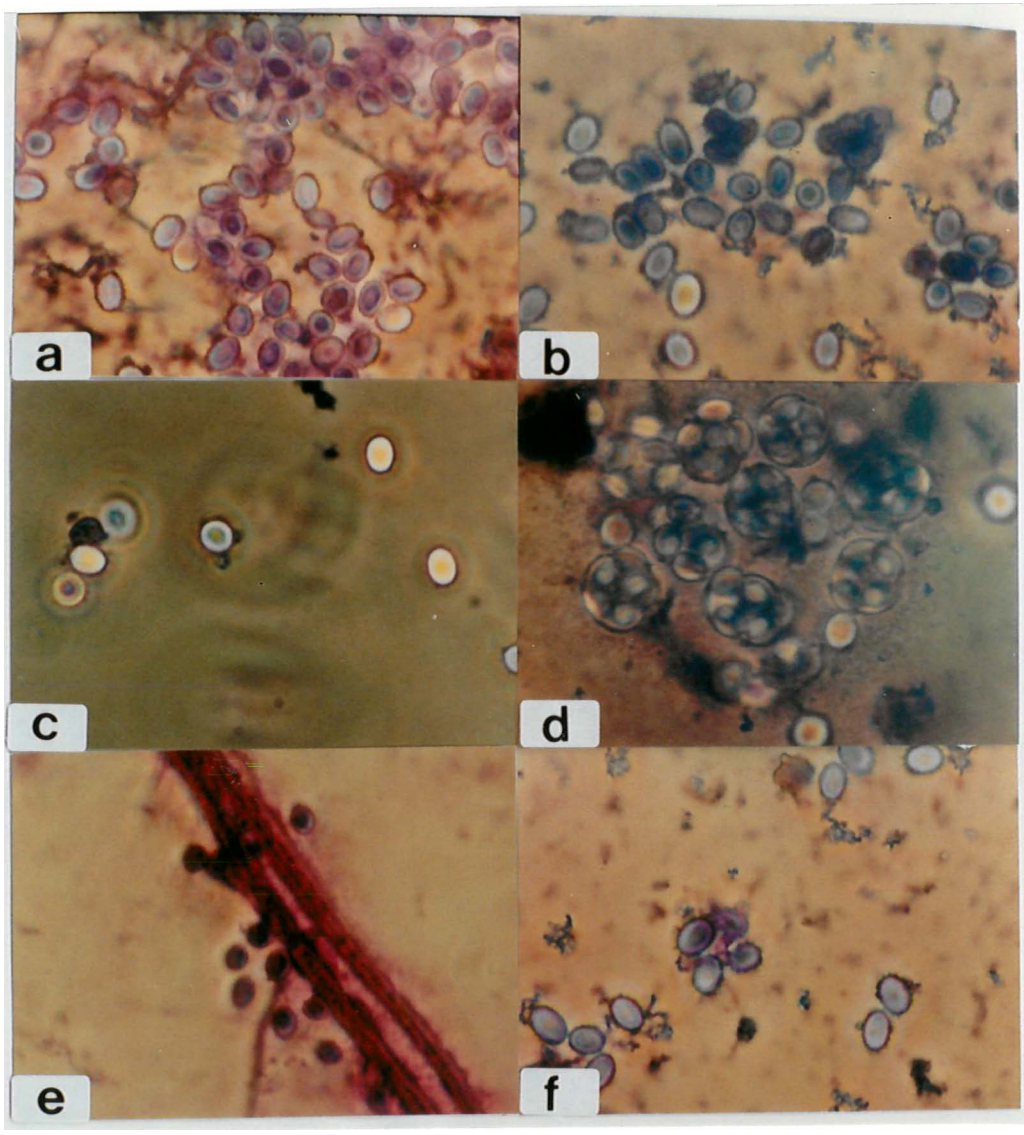

Fig.2. Ascosporos de linhagens de *Talaromyces flavus* coloridos pelo método de Tanaka et al(1979). Objetiva de 100 x (contraste de fase). (a)-IK; (b)-IG (c)-IR; (d)-T30- ascos com ascosporos uninucleados em tetrade(8 ascoporos); (e) T22; (f)-T30.

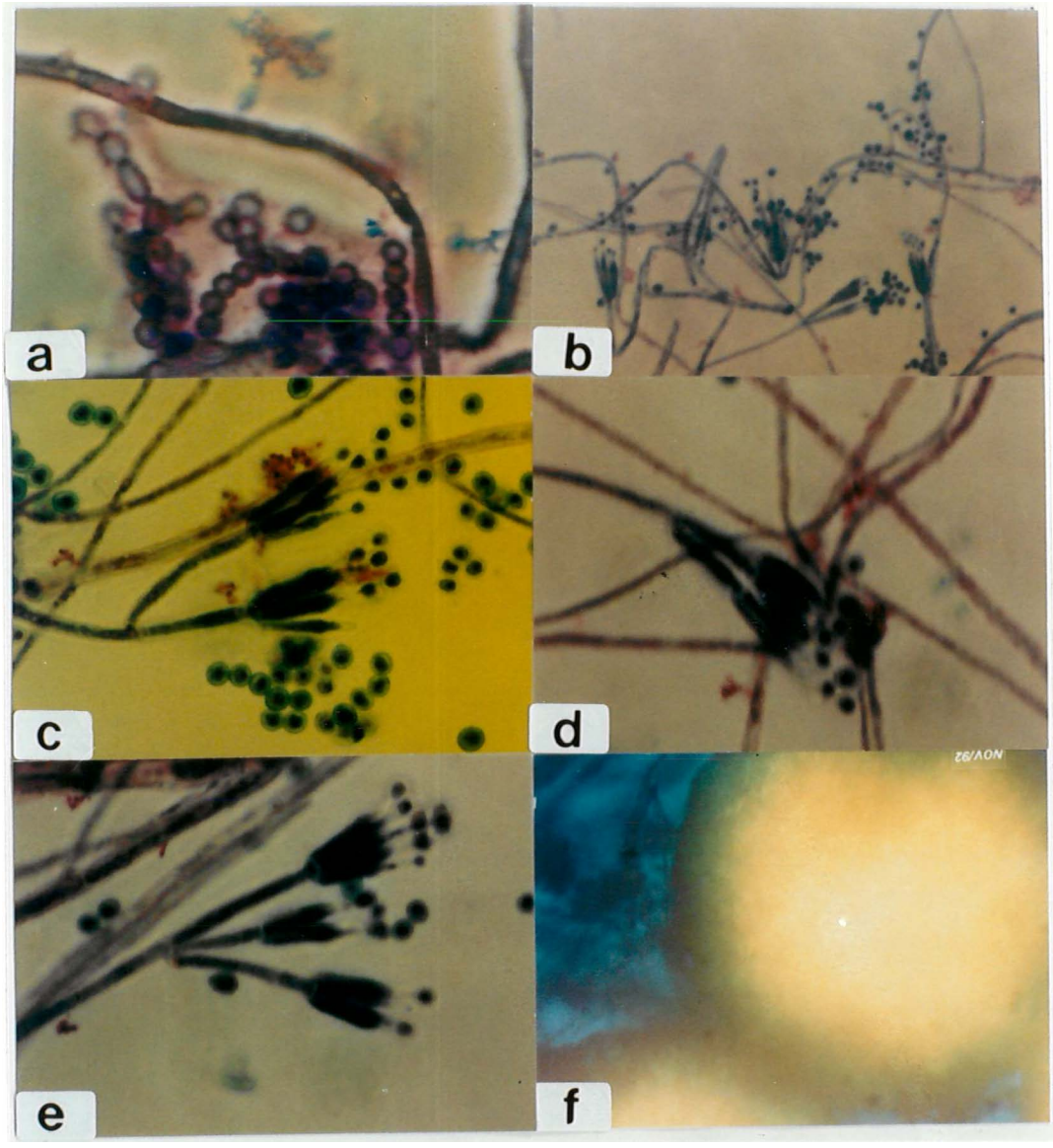

Fig.3.Conídios de linhagens de *Talaromyces flavus* coloridos pelo método de Tanaka *et.al.*(1979). (a)- T4; (b)-IK- objetiva de 45 x- conídios uninucleados; (c)- IR- objetiva de 100 x -conidios uninucleados; (d)-IG-conidios uninucleados; (e) T30-conidios uninucleados; (f)-cleistotécio de T22.

4.9.2. Caracterização eletroforética das linhagens de *T. flavus*

De acordo com a Fig.6, pode-se identificar a presença de α e β esterases em todos os biótipos analisados, caracterizando-os quanto a produção desta enzima. No entanto, foram detectadas diferenças no número e posição das bandas indicando uma variabilidade entre as linhagens. Identificou-se tambem, a presença de bandas diferentes para os novos biótipos obtidos a partir da linhagem Ik para os padrões de esterase .

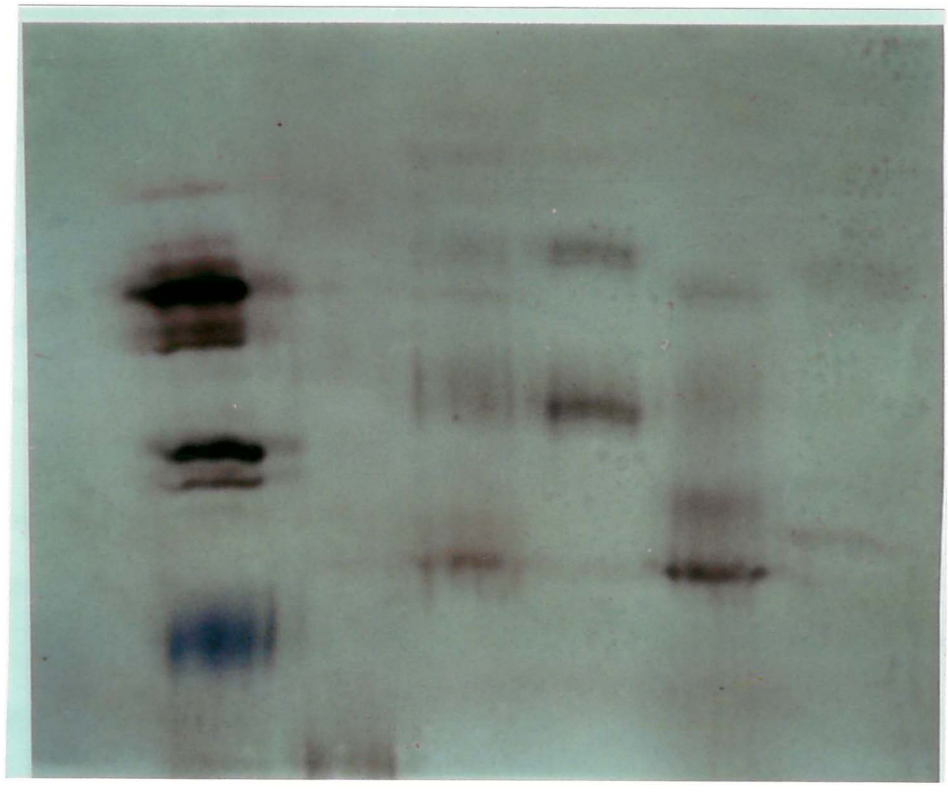

Figura.4.Caracterização eletroforética de *Talaromyces flavus* para padrão de esterase.

5. CONCLUSÕES

A interação entre *Talaromyces flavus* e T4 em *Verticillium dahliae* permitiu maior desenvolvimento de plantas de berinjela em comparação a testemunha inoculada somente com o patógeno.

T. flavus produzem metabólitos tóxicos capazes de inibir o crescimento micelial dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum, Sclerotium rolfsii, Fusarium solani e Rhizoctonia solani.*

Conídios e ascosporos do fungo *T.flavus* são uninucleados e apresentam padrões diferenciais para esterase para as diferentes linhagens, assim como apresentam características promissoras para efetuar o melhoramento genético.

O meio glucose milhocina propiciou maior produção massal de micélio e esporulação de *T.flavus*, sendo que o melhor pH para o meio de cultura foi 4.

A pectina cítrica pode ser utilizada como polímero em substituição a alginato de sódio e micélio de *T. flavus* (IK) como propágulo.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL,W. (org.). Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA, pp. 121-134, 1991.

ADAMS,P.B.Comparison of antagonists of *Sclerotinia* species. Phytopathology, St. Paul, 79:1345-7, 1989.

ADAMS,P.B.;AYERS,W.A.1983. Histological and physical aspects of infection of sclerotia of two *Sclerotinia* species by two mycoparasites, Phytopathology,St. Paul, 73: 1072-1076,1983.

AVENT, A.G.; HASON, J.K.; TRUNEH,A. Metabolites of *Gliocladium flavofuscum*. Phytochemistry,Oxford. GB, 32 : 197-198,1993.

AYERS,W.A.;ADAMS,P.B.Mycoparasitism of sclerotia of sclerotinia and species by *Sporodesmium sclerotivorum*.Canadian Journal of Microbiology, Otawa, 25:17-220, 1979.

BAKER, K.F. Envolving consept of biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology ,Palo Alto., 25: 67-85,1987.

BAKER,R.ELAD,Y.;CHET,I.1984.The controlled experiment in the scientific method whith special emphasis on biological control. Phytopathology,St Paul. 74:1019-1021,1984.

BACMAN,P.A.;RODRIGUEZ-KABANA,R.. A system for the growth and delivery of biological control agent to the soil. phytopathology.St.Paul, 65:819-821. 1975.

BARBER,D.A.;LYNCH,J.A..Microbial growth in the rhizosphere . Soil. Biology Biochemistry,Oxford ,. 9.305-308,1977.

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- 92,1973..

BARROS,I.B.I. Reação de *Lactuca sp.* ao *Sclerotinia minor* Jagger e hibridação interespecífica no gênero *Lactuca*. Piracicaba, 1988.175p. (Doutorado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/usp)

BARTON,R.R.;RENNERT,S.S.;UNDERTKOFLER,L.A.Glucose oxidase in the protection of foods and beverages. Food Technolology,Champaign,12:683-686, 1957.

BELL,D.K.; WELLS,H.D.;MARKHABELL, D.K.; WELLS, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against sise fungal plant pathogens. phytopathology, St. Paul, 72: 379-82, 1982.

BENJAMIN,C.R..Ascocarps of *Aspergillus* and *Peniciillium*. Mycologia.New York, 47:669-87,1955.

BEN- YEPHET, Y.; SITI, E.; FRANZ, Z. Control of *Verticillium dahliae* by metan- sodium in loessial soil and effect on potato tuber yields. Plant Disease,Beltsville, 67 : 1223-1225,1983.

BEUCHAT,L.R.Extraordinary heat resistance of *T. flavus* and *Neasartorya fisheri* ascospores in fruit products. Journal of Food Science,chicago,51:1506-1510,1986.

BEUCHAT,L.R. .Thermal tolerance of *Talaromycesw flavus* ascospores as affected by growth medium and temperature, age and sugar content in the inactivation medium. Trannsactions of the British Mycological Societs,London, 90:359-364 (1988).

BOECKMAN, R.K.;FAYORS, J.; CLARDY, J. A revised struture of

vermiculine. A novel macrolide dilactone antibiotic from *Penicillium vermiculatum*. Journal of American Chemical Society,Easton, 96 :5954- 5956,1974.

BOOSALIS, M. Effect of soil temperature and Green- Manure amendment of unsterilized soil on parasitism of *Rhizoctonia solani* by *Penicillium vermiculatum* and *Trichoderma sp.* Phytopathology,St. Paul,46: 473-477,1956.

BOOSALIS, M. C. Hyperparasitism. Annual Review of Phytopathology St. Paul, 2 :363-75,1964.

BROADBENT,P.;BAKER,K.F.; FRANKS,N.;HOLLAND,J.Effect of Bacilus on increased growth seedlings in steamed and nontreated soil. Phytopathology,St. Paul, 67,1027-1033,1977.

BROWN,M.E.Plant growth substances produced by microrganisms of soil and rhizosphere. Journal of Applied, Bacteriology.New York, 35: 443-451,1974.a

BROWN,M.E. .Seed and rot bacterization. Annual Review of Phytopathology,Palo Alto, 12, 181-197,1974.b

BUTTERFIELD, E.T. ; DE VAY, J. E. reassesment of soil assay for *Verticillium dahliae*. Phytopathology,Palo Alto,.67: 1073-1078,1977.

CAMPAROTA,P..Antagonisms *in vitro* de *Trichoderma spp.* vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühln. Agronomie, Paris, 5: 613-20. 1985.

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

CHET, I.; ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism In: les

antagonismes microbiens. Mode d´action et application a la lutte biologique controle les maladies des plantes. Bordeaux, mai. Colloque de l´ I.N.R.A.,18: 35-40,1983.

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 β-- (1-3)-glucanase and chitinase. Soil biology and Biochemistry,New York, 1: 31-8, 1985.

CHURCHIL, B.W. Mass production of microrganism for biological control. Pages 139- 156. In Biological control of weeds with Plant Pathogen. R. Charudattan and H.L. Walter, eds. John Wiley & Sons, New York, 293 pp.1982.

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

DAVET,P. Activeté parasitaire des *Trichodrema* vis-á-vis des chanpignons à sclerotes; corrélation avec aptitude à la competition dans un sol nonsterile. Agronomie,Paris;6: 863-867,1986.

DAVIDSE,L.C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impacts. Annual Review of Phytopathology,St. Paul, 24:43-65,1986.

DAVIDSE,L.C. Biochemical aspects of benzimidazole fungicides-action and resistance. In : moderm seletive fungicides. H.Lyr, ed, VEB gustav Fischer Verlag, Jena and Longman Group UK Ltd, London, 245-257, 1987.

DAVIDSE,L.C.;FLACH,W. Differential binding of methyl benzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a

mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. Journal of cell biology,New York, 72:174-193,1977.

DAVIS, J.R.; FRAVEL,D.R.;MAROIS,J.J.;SORONSEN,L.H.Effects of soil fumigation and seedpiece treatment with *Talaromyces flavus* on with incidence and yield.Biological & Cultural Tests,Minnesota, 1:18.1983.

DENNIS, C. & WEBSTER , J. Antagonistic properties of species groups of trichoderma. I. Production of non - volatile antibiotics. Transactions of the British. Mycological Societs,London,57:41-8, 1971 a.

DENNIS, C. & WEBSTER , J. Antagonistic properties of species - groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Societs,London,57: 41-8, 1971 b.

DIXON,M.;WEBB,E.C.. Enzymes. 3rd ed. academic press, New York, 243 pp.1979.

DUTTA, B.K. Studies os some fugi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of Verticillium wilt. Plant and Soil,Dordrecht,63: 209- 216,1981.

DULMAGE, H.T. Production of bacteria for biological control of insects. Pages 129- 141. In: Biologial control in crop Production. Beltsville Symp. Agric Res. Vol 5. G.C. PAPAVIZAS, ed. ALLAWHELD. OSMUN & CO, New York. 345 pp.1981.

EDGINGTON,L.V.;KHEW,K.L.;BARRON,G.L..Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopatology, St. Paul,42-4,1971.

ELAD,Y.;CHET,I.;BAKER,R. Increased growth response of plants

induced by rhizobacteria antagonistic to soilborne pathogenic fungi. Plant and Soil,Dordrechet, 98, 325-330.1987.

EVELEIGH,D.E. *Trichoderma* In Biology of Inddustrial Microrganism (A.L.Demain and N.A.Solomon Ed.),pp 487-509.1985.

FAHIMA,T.;MADI,L.;HENIS,Y. Ultraestruture and germinability of *Verticillium dahliae* microesclrotia parasited by *Talaromyces flavus* on agar medium and in treated soil. Biocontrol science and Technology, 2,69-78,1992.

FRAVEL,D.R..The role of antibiosis in biocontrol of plant diseases. Annual Review of Phytopathology.St. Paul, 26:75-91.1988.

FRAVEL, D. R.; ADAMS, P. B. Estimation of United States and World distribution of Talaromyces flavus. Mycologia,London,78: 684-686,1986.

FRAVEL, D. R. ; BAKER, C. J.; RISTAINO, B. J. Metabolite produced by Talaromyces flavus reduces viability of microesclerodia of *Verticillium dahliae* in vitro and in soil. Phytopathology,St. Paul, 75: 625,1985.

FRAVEL, D.R.; MAROIS, J.J. Edaphic parameters associated with establishiment of the biocontrol agent Talaromyces flavus. Phytopathology,St. Paul, 76: 643- 646,1986.

FRAVEL, D.R.; KIM, K.K.; PAPAVIZAS, G.C. Viability of microesclerodia of *Verticillium dahliae* reduced by a metabolite produced by Talaromyces flavus. Phytopathology,St. Paul, 77: 616-619,1987..

FRAVEL, D. R.; MAROIS, J.J.; LUMSDEN, R.D.; CONNICK, W.J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate - clay matrix. Phytopathology,St. Paul,75: 774- 777,1985.

FRELS,J.M.;SAMUELSON,K.J.;FRONING,G.W.;RUPNOW,J.H..Evaluation of glucose oxidase-catalase treatment to improve the microbiological quality of poltry meat Poultry Science,Ithaca, 63:841-843,1984.

FUSKA,J.;FUSKOVA,A.;NEMEC,P..Vermistatin, an antibiotic with cytotoxic effects produced from *Penicillium vermiculatum* .Biologia (Bratislava)34:735-740.1979a.

FUSKA, J.;NEMEC, P. ; FUSKOVA, A. Vermicillin , a new metabolite from Penicillium vermiculatum inhibiting tumor cells in vitro. Journal of. Antibiotics,Tokyo, 32 : 667-669,1979b.

FUSKA, J.; NEMEC, P. ; KUHR, I. Vermiculine, a new antiprotozoal antibiotic from *Penicillium vermiculatum* . Journal of Antibiotics,Tokyo, 25: 208- 211.1972.

GALLI,F. Manual de fitopatologia volume I. Editora agronômica Ceres. 1978. 373 p .

GEORGOPOULOS,S.G.;SARRIS,M.;ZIOGAS,B.N. Mitotic instability in *Aspergillus nidulans* caused by fungicides iprodione, procymidone and vinclozolin. Pesticide Science,Essex, 10:389-392,1979.

GIBSON,Q.H.;SWOBODA,B.E.P.;MASSEY,V..Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. Journal biological Chemistry. Baltimore,239:3927-3934.1964.

GLENN,J,K.;GOLD,M,H, Purification and characterization of an extracelular Mn(II)- dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phacerochaete chrisosporium*, Archives of biochemical biophisis,San Diego, 242: 329-341, 1985.

GROGAN,G.R..*Sclerotinia* species, summary and comments on needed research,Phytopathology, St.Paul, 69:908-10,1979.

GRUEN,H. Auxin and fungi, Annual Review of Plant Physiology,California,10: 405,1959.

HALE,M.G.;MOORE,L.D.;GRIFFIN,G.J. Root exudates and exudation. Pages 163-203 in: Interaction between Nom Pathogenic soil microrganism and plants,1978.

HAYASHI,S.;NAKAMURA,S..Multiple forms of glucose oxidase with different carbohydrate compositions. Biochemical Biophysics.Acta,New York, 657:40-51.1981.

HENIS,Y;PAPAVIZAS,G.C. Factors affecting germinability and susceptibility to attack of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* in field soil. Phytopathology,St. Paul, 73:1469-1474,1983.

HOWARD,R.J.;AIST,J.R..Effect of MBC on Hyphal tip organization, growth, and mitosis of *Fusarium acuminatun*, and their antagonism by D2O. Protoplasma,Leipzzig,1977.

HOWELL, C.R.; STPANOVIC, R.D.Suppression of Pythium ultimum-induced damping- off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. Phythopathology,St. Paul, 70¦712-715.1980.

JOHNSTON,K.B. Defoliation, diseases , and growth:A reply. Phytopathology,St. Paul,77: 1495-1497,1987.

JUNG,M.K.;DUNNE,P.W.;SUEN,I.H.;OAKLEY,B.R. Sequence of alteration in β tubulin mutation of *A. nidulans*. Journal of. Cell Biology ,New York, 105 (Abstract 1560),1987.

KATAN,T. Heat activation of dormant ascospores of *Talaromyces flavus*, Transactions of the British Mycological Society,

London, 64, 748-750, 1985.

KATAN,T. Resistance to 3,5-dichlorophenil-N-cyclic imide(di-carboximide) fungicides in the gry mold pathogen Botrytis on protected crops. Plant Pathology,London, 31: 133-141,1982.

KATAN,J.;GREENBERGER,A;ALON,H;GRINSTEIN,A. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil borne pathogens. Phytopathology, St. Paul, 66:683-688.1976.

KATAN,T.;SHABI,E. Characterization of a dicarboximide fungicide-resistant isolate of Monilinia laxa. Phytoparasi-tica,10:241-245,1982.

KATAN, T.; DUN, M. T.; PAPAVIZAS, G.C. Genetics of fungicide resistence in *Talaromyces flavus*. Canadian Journal of Microbiology,Ottawa,30 : 1079- 1087,1984.

KATAN,T.;SHABI,E.;GILPATRICK,J.D.Genetics of resistence to Benomyl in *Venturia inequalis* isolates from Israel and New York. Phytopathology,St. Paul,73:600-603,1983.

KATO,T;SUZUKI,K.;TAKAHOSHI,J.;KAMOSHITAQ,K. Negatively correlated cross-resistance betweem benzimidazole fungicides and methyl N-(3,5-dichlorophenil)carbamate.Journal of Pesticide Science,Essex, 9:489-495,1984.

KERR, A. Biological control of crown gall throgh production of agrocin 84. Plant Disease,Beltsville,64: 25-30,1980.

KIM, K. K.; FRAVEL, D. R.; PAPAVIZAS, G.C. A novel metabolite from the culture filtrate of *Talaromyces flavus* (resumo) Fed. Proceding American Societs of Experimental biology .45: 1796,1986.

KIM,K.K.;FRAVEL,D.R.;PAPAVIZAS,G.C..Identification and charac-

terization of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* which mediates biocontrol of *Verticillium dahliae* (Abstr).Phytopathology,St. Paul,77:172.1987.

KIM, K.K. ; FRAVEL, D.R.; PAPAVIZAS, G.C, Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. Phytopathology,St. Paul,78: 488-492,1988.

KIM.K.K.;FRAVEL,D.R.;PAPAVIZAS,G.C.Production, purification, and properties of glucose oxidase from the biocontrol fungus *Talaromyces flavus*.Canadian Journal of Microbiology, Ottawa,36:199-205.1990.

KIM.K.K.;FRAVEL,D.R.;PAPAVIZAS,G.C. Glucose oxidase as the antifungal principle of talaron from *Talaromyces flavus*.Canadian journal of microbiology,Otawa, 36:760-764.

KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* interaction with plants and effect on growth response. Plant and soil,Dordrechet,144: 267- 272,1992.

KLOEPPER,J.W.;SCHROTH,M.N.. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnobiotic conditions. Phytopathology,St. Paul, 71:642-644,1981.

LEWIS, J.A.; PAPAVIZAS, G.C. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. Plant Pathology,London,34: 571- 577,1985.

MADI,L.;HENIS.Parasitism of *Sclerotium rolfsii* by *Talaromyces flavus*.Phytopathology,St. Paul,79:1160.1989.

MADI,L. KATAN,T.;HENIS, Y. Inheritance of antagonistic properties and lytic enzyme activities in sexual crosses of

Talaromyces flavus. Annual Applied Biology, Cambridge, 121:565-576,1992.

MANDELS,M.;WEBER,J.;PARIZEK,R.Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*.Applied Microbiology, Baltimore, 21:152-154.1971.

MAROIS,J.J.; FRAVEL, D.R.; PAPAVIZAS, G.C.Ability of Talaromyces flavus to ocupy the rhizosphere and its interactions with *Verticillium dahliae*. Soil Biology and Biochemistry, New York, 16: 387-390,1984.

MAROIS, J.J.; JOHNSTON; S.A.; DUNN, M.T.; PAPAVIZAS. G.C. Biological control of Verticillium wilt of Eggplant in the Field. Plant disease,Beltsville,66: 1166-1168,1982.

MCLAREN, D.L.; HUANG,H.C.; RIMMER. Hyperparasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Talaromyces flavus* .Canadian journal of Plant Pathology.Ontario,8: 43-48,1986.

MELO, I.S. Reação de berinjela (*Solanun melongena l.)* a *Verticillium albo- atrum Reinke & berth*. Sob os aspectos de Herança , patogenicidade, controle fitohormonal e biológico. Tese de Doutorado. ESALQ. Piracicaba- sp- Brasil.1984.

MENTEN,J.O.M.;MACHADO,C.C.;MINUSSI,E.;CASTRO,C.;KIMATI,H.Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.)Goid. *in vitro*.In: CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 9., CAmpinas, 1976. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 1(2):57-66, Junho.1976.

MIZUNO, K.; YAGI,A.; TAKADA, M.; MATSUURA, K. ; YAMAGUCHI, K.; ASANO, K. A new antibiotic, Talaron, Journal Antibiotics, Tokyo, 27: 560-563,1974.

MOORMAN,G.C. The influence of black plastic mulching on infection rates of Verticillium wilt and yield of eggplant. Phytopathology,St. Paul,72: 1412-1414,1982.

MORRIS,N.R..The molecular genetics of microtubuls protein in fungi. Experimental Mycocology .19:77-82,1986.

PACCOLA-MEIRELLES,L.D.;VALARINI,M.J.;AZEVEDDO,J.L.;ALFENAS,A.C. Manual de Técnicas eletroforéticas em microrganismos. Piraccicaba, FEALQ,1988.54p.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma and gliocladium* . Biology, Ecology and Potential for Biocontrol. Annual Review Phytopathology,St. Paul, 23:23-26,1985.

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

PAPAVIZAS, G.C.; FRAVEL, D.R.; LEWIS, J.A. Proliferation of *Talaromyces flavus* in soil and survival in alginate pellets. Phytopathology, St. Paul,77:131-136,1987.

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

PAPAVIZAS, G.C.; LUMSDEN, R.D. Improved medium for isolatiomn of *Trichoderma spp.* from soil. Plant Disease, Beltsville, 66: 1019-1020,1982.

PAPLOMATAS, E.J.; BASSET, D.M.; BROMME, J.C., DE VAY, J. E. Incidence of Verticillium wilt and Yield losses of cotton cultivars (*Gossypium hirsutum)* based on soil inoculum den-

sity of *Verticillium dalhiae*, Phytopathology, St. Paul, 82:1417-1420,1992.

PAZUR,J.H.Glucose oxidase from *Aspergillus niger*.Methods Enzymology. 9:82-87.1966.

PEGG,F.G.Endogenous giberillins in healthy and diseased plants, in Physiological Plant Pathology, Hrttefuss,R. and Willians,H.P. EDs., Spring-Verlag, Berlin, 1976, 592p.

PEGG,G.F.;SELMAN,I.W. An analysis of the growth response of young tomato plants to infection by *Verticillium albo atrum* II-The production of growth substances, Annuals of applied Biology,Cambridge, 47: 222, 1959.

PENNYPACKER, B.W. The role of mineral nutrition in the control of Verticillium wilt. Pages 33-45. In: Soilborne Plant Pathogens: Management of Diseases with macro and micro-elements. A. W. Engelhard, ed. American Phytopathological Society, St. Paul,1989.

PENNYPACKER,B.W; LEATH, K.T.dispersal of *Verticillium albo-atrum* in the xylem of alfafa. Plant Diseases Beltsville, 67:1226-1229,1983.

PROSKSA,B.; ADAMCOVA, J.;FUSKA,J. 2- Methylsorbic acid, an antifungal metabolite of *Penicillium vermiculaltum*. Applied Microbiology Biotechnology,Berlin,37: 443-445,1992.

RICHTER,G. Glucose oxidase. Pages 428-436. In: Industrial Enzymology. T. Godfrey and J. Reichelt. Eds. Nature Pres,New York. 1983.

ROBBS, C.F. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL,W. (org) . Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. EMBRAPA- CNPDA, PP.

121-134,1991.

SANTOS,T.M.C.; MELO, I.S.Preparation and regeneration of protoplasts of *Talaromyces flavus*. Revista Brasileira de Genetica,Ribeirão Preto, 14: 835-840, 1991.

SHEIR,R.;NEISS,G.;LAI,M.H.;MORRIS,N.R.Identification of a gene for β-tubulin in *Aspergillus nidulans*. Cell, Cambridge, 15:639-647,1978.

SMITH, J.E.; BERRY, D.R.; KRISTIANSEN, B. eds. Fungal Biotecnology. Academic Press, London. 1980. 308 pp.

SU, S.J.; LEU,L.S. Three parasitic fungi on *Sclerotinia sclerotiorum (Lib) de Bary*. Plant Protection Bulletin 22: 253-262,1980.

SWOBODA,B.E.P.;MASSEY,V. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*.Journal biology chemystry , Baltimore, 240:2209-2215,1965.

RICHTER,G.Glucose oxidase. Pages 428-436. in: Industrial Enzymology. T. Godfrey and J. Reichelt, eds. Nature Press, New York,1983.

SCOOT,V.N.;BERNARD,D.T. Heat resistance of *Talaromyces flavus and Neosartorya fisheri* isolated from comercial fruit juices. Jounal of Food Protection.50:18-20,1987.

SILVA,A.C.F.;MELO,I.S.Mutantes de *Trichoderma harzianum* resistentes a Iprodione e antagônicos ao *Sclerotinia minor*. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS, 3.Piracicaba, 1989. Anais. Piracicaba, FEALQ;Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989.P.102.

SPINK,D.S.; ROWE, R.C. Evaluation of *Talaromyces flavus* as biological control agents against *Verticillium dahliae* in

potato. Plant Disease,Beltsville, 73:230 -236,1989.

STOLK,A.C.;SAMSON,R.A..The genus *Talaromyces* and related genera. II. Studies in Mycology,2. Central-bureau voor Schimmelcultures, Baarn.1972.

SUSLOW,T.V.;SCHROTH,M.N. Rhizobacteria of sugar tests: Effects of seed aplication and root colonization on yield. Phythopathology,St. Paul, 72:199-206,1982.

SUTIC,D.D.;SINCLAIR,J.B.. anatomy and Physiology of Diseased Plants. Boca Raton; CRC Pres, 221p, 1991.

SWOBODA,B.E.P.;MASSEY,V.Purification and properties of the glucose oxidase from *A*spergillus niger. journal Biological Chemystry,Baltimore,240:2209-2215.

TANAKA,T.MURATA,N.;KATO,H..Behavior of nucleic and chromossomes during ascus development in matting between rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. Annals of Phytopathological Society of Japan.. Tokyo, 45:182-91,1979.

TJAMOS, E.C.; BIRIS, D.A.; PAPLOMATA, E.J. Recovery of olives trees with Verticillium wilt after individual aplication of soil solarization in established olive orchards. Plant Disease,Beltsville, 75:557-562,1991.

TSAO,P.H.Seletive media for isolation of pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology.Palo Alto,8:157-186.1970.

TSUGE,H.;NATSUAKI,O.;OHASHI,K. Purification properties , and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Journal Biochemistry,Tokyo;78:835-843.1975.

VAN DER SPY,J.E.;MATTHEE,F.N.;CRAFFORD,D.J.A. Dangeard and *Penicillium brefeldianum dodge* in apple juice.

Phytophylactica,Pretoria, 7:105-108,1975.

VAN TUYL,J.M. genetics of fungal resistance to systemic fungicides. Meded. Landb.Hogesch, Wageningen,77,1-137,1977.

VAN TUYL,J.M.;DAVIDSE,L.C.;DEKKER,J. Lack of cross resistance to benomyl and thiabendazole in some strains of *Aspergillus nidualns*. Netherland Journal of Plant Pathology, Amisterdã,80:165-168,1974.

WILHELM,S. Aerial microesclerotia of *Verticillium* resulting from conidial anastomosis. Phytopathology, St. Paul, 44: 609-10, 1954.

WHINDAN,M.T.;ELAD,Y.;BAKER,R.A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma spgp*. Phytopathology,St. Paul, 76: 518-521. 1986.

APÊNDICE

Tabela 1. Valores e significância do QM e CV da porcentagem de colonização de *Talaromyces flavus* contra *Verticillium dahliae*.

Causas de variação	GL	QM
% de colonização	5	1007.4673389**
Resíduo	12	15.540020
Total	17	

Valores transformados das observações segundo Arc. sen da raiz de x\100

Média geral = 63.76473

Coeficiente de variação=6.183%

** significativo a nível de 1% de probabilidade

Tabela 2 .Valores e significância de QM e CV do teste de antibiose de linhagens de *Talaromyces flavus* contra *Verticillium dahliae*.

C. variação	G.L.	Q.M.	
Blocos	3	0.5566	
Tratamentos	6	4425.2852	**
Resíduos	18	0.7575	
Total	27		

Desvio Padrão = 0.8703 Erro padrão da média= 0.4352

Média geral= 28.3389 Coeficiente de variação= 3.07

Tabela 3 . Valores e significancia de QM e CV da interação entre *Talaromyces flavus e Verticillium dahliae* em condição de casa de vegetação em solo esterilizado (média de três repetições)

Causa de variação	GL	QM
Blocos	2	0.1901
Tratamentos	7	2.4103
Resíduo	14	0.0711
Total	23	

Severidade de doenças

Desvio padrão=0.2666 Erro padrão da média=0.1539

média geral=1.5521 coeficiente de variação=17.17

Tabela 4 .Valores e significância de QM e CV. de severidade de doença na interação *Talaromyces flavus e V. dahliae*.

Causas de variação	GL	QM
Tratamento	8	0.4001 **
Resíduo	18	0.0208
Total	26	

Valores transformados de médias de três repetições em RAIZ(X + 0.5)

média geral= 1.223585

Coeficiente de variação= 11,809%

Tabela 5 .Valores e significância de QM e CV do efeito da interação de *Talaromyces flavus* x *Verticillium dahliae* no crescimento de plantas de berinjela (*Solanum melongena)*

Causas de variacão	GL	QM
Tratamentos	8	10.99385 **
Resíduo	18	0.5959163
Total	26	

Média geral=7.4228

Coeficiente de variação=10.40%

Tabela 6 .Valores e significância de QM e CV do efeito de *Talaromyces flavus* no controle de *Verticillium dahliae* em Berinjela (*Solanum melongena)*

causas de variação	GL	QM
Tratamento	8	0.1004527 **
Residuo	18	0.0144601
Total	26	

Dados de peso seco de raiz

Média geral=0.321770

Coeficiente de variação= 37.371%

Tabela 7 . Valores e significância de QM e CV do efeito de *Talaromyces flavus* no controle de *Verticillium dahliae* em berinjela .

Causas de variação	GL	QM
Tratamento	8	0.3292121 **
Resíduo	18	0.0156819
Total	26	

Média geral= 0.484630

Coeficiente de variação=25.840%

Tabela 8 . Valores e significância de QM e CV da esporulação de *Talaromyces flavus* em BDA. (Média de 8 repetições)

causa de variação	GL	QM
Esporulação	5	97.3833 **
Residuo	42	1.7321
Total	47	

Média geral= 3.08333

Coeficiente de variação=42,685%

** Significativo a nível de 1% pelo teste F.

Tabela 9 . Valores e significância de QM e CV do crescimento de *Talaromyces flavus* em BDA. Média de 3 repetições)

Causas de variação	GL	QM
Crescimento	5	13.02055 **
Resíduo	12	0.0838882
Total	17	

Média geral=4.694445

Coeficiente de variação=6.170%

** Significativo a nível de 1% pelo teste de F.
Dados originais cm.

Tabela 10.Valores e significância do QM e CV da produção de micelio em meios sintéticos e contituidos de resíduos industriais.

CV	GL	QM
TRATAMENTOS	8	0.1822
RESIDUOS	18	0.0088
TOTAL	26	

DESVIO PADRÃO= 0.0940 MÉDIA GERAL= 0.4359

ERRO PADRÃO DA MÉDIA=0.0543

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO=21.57

Tabela 11. Valores e significâncias do QM e CV da esporulação de *T. flavus* em meios semi sintéticos e constituidos de resíduos industriais.

CAUSA DE VARIAÇÃO	GL	QM
TRATAMENTO	8	8027,6944 **
RESÍDUO	27	7.1389
TOTAL	35	

DESVIO PADRÃO =2.6714

MÉDIA GERAL=16.6389

ERRO PARÃO DA MÉDIA= 1.3359

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO=16.06

Tabela 12 .Valores e significância de QM e CV do efeito de pH inicial no crescimento e produção de micélio seco de *Talaromyces flavus* em glucose milhocina.

C.Variação	GL	QM
Tempo de cresc.	5	0.2469 **
pH inicial	1	0.2739 **
T.cresc.x pH ini.	5	0.0239 **
Tratamento	11	0.1480
Resíduo	24	0.0060

Média geral do ensaio= 0.2911

Desvio padrão= 0.0772 CV=26.5157

Tabela 13.Valores e Significância do QM e CV da ação de metabólitos de *T. flavus* contra Patógenos de solo.

Causa de variação	GL	QM
Talaromyces	1	5250.71064 **
patógenos	5	863.95191 **
Tal. x Patógenos	5	278.27289 **
Resíduo	36	26.6346207
Total	47	

Média geral =21.043541

Coeficiente de variação= 24.525%

Tabela 14. Valores e significância do QM e CV da sensibilidade de linhagens de *Talaromyces flavus* à Fungicidas.

Causa de variação	GL	QM
Dose	3	6446.326954 **
Fungicida	7	12106.75181 **
Fungicida x Dose	21	797.57652 **
Resíduo	96	8.027502
Total	127	

Media geral=49.4672747 Coeficiente de variação=5.728%

Valores transformados em arco seno da raiz x\100, média de 4 repetições obtidas por meio de % da redução de crescimento.

Tabela 15 . Valores e significância do QM e CV da sensibilidade de fungos isolados de solo a fungicidas.

Causas de variação	GL	QM
Fungos	3	5016.9764 **
Fungicidas	6	8064.4267 **
Fungos*Fungicidas	18	1922.3091 **
Resíduo	84	0.0000 **
Total	111	

Média geral = 21.659868 Coeficiente de variação =0.0000% ** Significancia ao nível de 1% pelo teste F. Dados originais.

Tabela 16 . Valores de Qm e CV dos efeitos de meio determinado através de sensibilidade a fungicidas e comparada ao meio semi seletivo de *T. flavus*(MAROIS *et al.*,1984)

Causas de variação	GL	QM
Antagonistas	2	10329,500**
Meio semi seletivo	1	522.666 *
Ant*Meio	2	38.1666
Resíduo	18	98.9166
Total	23	

Média geral= 54.25

Coeficiente de variação=18.333%

Tabela 17. Valores e significância de QM e CV da viabilidade das formulações de linhagens de *Talaromyces flavus* (IK).

Causas de variação	GL	QM
Tempo	5	44.0277
Armazenamento	1	56.2500
Propágulo	2	63.1944
Polímero	1	84.0277
Pol*Prop*Arm*Tempo	10	39.5833 **
Pol*Prop	2	63.1944
Prop*Tempo	10	30.6944 **
Resíduo	112	13.8392
Total	143	

Média Geral= 99.236115 Coeficiente de variação= 3.749%