

ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO  
ENGENHEIRO AGRÔNOMO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO  
CONTRÔLE BIOLÓGICO DA  
MURCHA DE *Fusarium oxysporum* f.  
*phaseoli* (SCHLECHT) KENDR. e SNYD.  
EM *Phaseolus vulgaris* L.

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura «Luiz de Queiroz», da Univer-  
sidade de São Paulo, para obtenção  
do Grau de «Magister Scientiae».

PIRACICABA - SÃO PAULO

1968

Aos meus pais

e ao meu marido

dedico

## Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO . . . . .	pág. 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA . . . . .	2
3. MATERIAIS . . . . .	10
3.1. Solos utilizados e suas caracterizações . . . . .	10
3.2. Fungos utilizados nos experimentos de contrôle biológico . . . . .	11
3.2.1. Patógeno . . . . .	11
3.2.2. Fungos prováveis inibidores de <u>Fu-</u> <u>sarium</u> . . . . .	11
3.3. Meios de cultura utilizados . . . . .	12
3.4. Hospedeiro . . . . .	12
3.5. Substrato para o cultivo do Hospedeiro, 3.5.1. Solo como substrato . . . . .	13
3.5.2. Areia como substrato . . . . .	13
3.6. Condições ambientais dos experimentos . . . . .	13
4. MÉTODOS . . . . .	14
4.1. Amostragem dos solos . . . . .	14
4.2. Diluição do solo e Plaqueamento . . . . .	14
4.3. Preparo dos Inóculos . . . . .	15
4.3.1. Obtenção do inóculo de Fusarium . . . . .	15
4.3.2. Preparo do inóculo dos fungos pro- váveis inibidores de Fusarium, pa- ra a inoculação pelo método da i- mersão . . . . .	15
4.3.3. Obtenção do inóculo dos fungos pro- váveis inibidores de Fusarium, pa- ra a <u>inoculã</u> ção pelo método da in- festação do substrato. . . . .	16
4.4. Métodos de Inoculação dos Fungos. . . . .	16
4.4.1. Inoculação de Fusarium . . . . .	16
4.4.2. Inoculação dos fungos prováveis i- nibidores de Fusarium pelo método da imersão . . . . .	16
4.4.3. Inoculação das sementes com fungos prováveis inibidores de Fusarium . . . . .	17
4.4.4. Inoculação dos fungos testados em contrôle biológico pelo método da infestação do substrato . . . . .	17

4.5. Tratamento das sementes, semeadura e ob tenção de mudas . . . . .	17
4.6. Isolamento, classificação, conservação e reisolamento dos fungos usados no con trôle biológico . . . . .	18
4.7. Estudos de Antagonismo "In vitro" . . .	19
4.8. Métodos de avaliação para os experimen tos de contrôle biológico . . . . .	19
4.8.1. Método do Índice de Resistência .	19
4.8.2. Método da porcentagem de plantas mortas. . . . .	20
4.8.3. Método da porcentagem de germina ção . . . . .	20
4.9. Levantamento da População Fúngica de seis Solos. . . . .	20
4.10. Isolamento indireto de Fungos do Solo prováveis inibidores de <u>Fusarium</u> - Expe rimento II . . . . .	21
4.11. Estudos do Contrôle Biológico de Fusa rium. . . . .	22
. 4.11.1. Estudos de Contrôle Biológico com Chaetomium, Trichoderma e Ce phalosporium inoculados pelo méto do da imersão em plantas e semen tes. - Experimento. III. . . . .	22
4.11.2. Estudos de contrôle biológico com 25 isolamentos de fungos, inocula dos pelo método da infestação do substrato - Experimento IV. . . .	23
4.11.3. Estudos de contrôle biológico com 10 isolamentos de fungos, inocula dos pelo método da infestação do substrato - Experimento V . . . .	25
4.11.4. Teste de Antagonismo "in vitro" - Experimento VI . . . . .	25
5. RESULTADOS . . . . .	26
5.1. Experimento I - Levantamento da Popula ção Fúngica de seis solos . . . . .	26

5.2. Experimento II - Isolamento de Fungos do Solo prováveis inibidores de Fusarium . . . . .	27
5.3. Experimento III - Estudos de Contrôles Biológico com Chaetomium, Trichoderma e Cephalosporium, inoculados pelo método da imersão, em plantas e sementes . . . . .	30
5.4. Experimento IV - Estudos de controle biológico com 25 isolamentos de fungos, inoculados pelo método da infestação do substrato . . . . .	31
5.5. Experimento V - Estudos de Controle Biológico com 10 isolamentos de fungos, inoculados pelo método da infestação do substrato . . . . .	38
6. DISCUSSÃO . . . . .	43
7. CONCLUSÕES . . . . .	50
8. RESUMO . . . . .	51
9. SUMMARY . . . . .	52
10. BIBLIOGRAFIA . . . . .	53
11. AGRADECIMENTOS . . . . .	58



## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro se reveste de uma importância considerável no Brasil, constituindo em alimento básico do povo brasileiro e, frequentemente, na mais importante fonte de proteína. Para enfatizar essa importância, basta dizer que o Brasil é o maior produtor e consumidor do feijão do mundo. Dentro deste contexto econômico, cabe às doenças um papel muito importante como fatores negativos da produção, a incidência severa de muitas delas redundando em graves prejuízos. Dentre as doenças, merece destaque a murcha de *Fusarium* causada pelo fungo *Fusarium oxysporum f. phaseoli* (Schlecht) Kendr. e Snyder. relatada por CARDOSO, KIMATI e FERNANDES (1966).

O controle de doenças semelhantes à murcha de *Fusarium* do feijoeiro é um problema muito sério, sendo na maioria dos casos o uso de variedades resistentes o único economicamente viável. Entretanto, abriu-se, recentemente, um campo experimental completamente novo, o do controle biológico, cuja importância prática ainda não se pode delimitar bem mas que se apresenta bastante promissor. Sendo um campo novo, qualquer contribuição será uma ajuda no desenvolvimento futuro de uma interessante maneira de se controlar doenças desse tipo.

O presente trabalho é uma contribuição no sentido de estabelecer as relações de antagonismo de alguns organis-

mos encontrados em diferentes tipos de solos de Piracicaba ao Fusarium oxysporum f. phaseoli, que, neste trabalho, será designado apenas por Fusarium. Evidentemente, o trabalho não tem pretensões de estabelecer definitivamente a viabilidade prática do uso de controle biológico mas, simplesmente, contribuir com uma parcela de conhecimento que junto com outros possibilitará a formação de um conjunto de princípios fundamentais da arte e ciência do controle biológico.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Devido à dificuldade técnica de se obter uma exata contagem de microrganismos do solo e da sua classificação, FRED e WAKSMAN (1928), BURGESS (1958), JOHNSON e outros (1959) MONTÉGUT (1960) e GARRET (1963) discutem o valor da técnica da diluição em série do solo e do plaqueamento dessas diluições em agar. Todos estes autores se referem a certos defeitos que o método apresenta, como, por exemplo, o isolamento predominante de fungos de esporulação abundante, geralmente do grupo dos Deuteromicetos ou da família Sphaeriaceae, quase não havendo isolamento de Basidiomicetos que são abundantes no solo. Todos eles, porém, concordam que é um dos poucos métodos bem estudados e estandarizados, para o levantamento de microrganismos. MONTÉGUT (1960) aponta que é um método que apresenta grandes vantagens sobre outros, visando-se o cálculo de microrganismos no solo e sua identificação; uma das vantagens apresentadas sobre a inoculação direta do solo em

caixas de petri, WARCUP (1950), seria o fato de se usar maior pêsso de solo inicial para se proceder à diluição, fornecendo uma melhor amostragem do solo a ser plaqueado. Este autor cita que para solos com certa porcentagem de argila, a penas o método da diluição em série pode ser usado, podendo-se preferir o método da inoculação direta do solo em caixas de petri para solos muito arenosos, que apresentam ao redor de 1.000 microrganismos por grama de solo.

SCHMITTHENNER e WILLIAMS (1958) estudaram os métodos para o levantamento dos fungos do solo, visando diminuir o êrro das contagens e propiciando uma maior uniformidade dos dados obtidos. Obtiveram uma grande porcentagem de informação adicional, calculada estatisticamente, usando o seguinte método: coletando 20 subamostras para cada solo, misturando-se-as em uma só amostra; fazendo 10 repetições em placas de petri para cada diluição do solo. Além disso, referem-se ao meio OAES como apresentando vantagens sôbre os meios de Warcup e Martin.

BURGES (1958) aponta que há diferenças em número e atividade dos microrganismos conforme a estação do ano e variando de uma parte do solo para outra. Ainda, que os fungos são pouco influenciados pelo pH do solo, encontrando-se, em média, de 20.000 a 1.000.000 de unidades viáveis de fungos por grama de solo. A redução da atividade seria provocada por baixas temperaturas e dissecação do solo, havendo, também, uma dependência do nitrogênio disponível no solo.

WILLIAMS e SCHMITTHENNER (1960) discutem que, sem dúvida o maior fator que afeta os fungos do solo é a quantidade e o tipo de nutrientes disponíveis, sendo dependentes de nutrientes orgânicos os quais são, em sua quase totalida-

de, supridos por plantas superiores autotróficas. Verificaram que alguns gêneros e espécies do mesmo solo aparecem em porcentagens diferentes conforme a cultura existente.

WILLIAMS e SCHMITTHENNER (1962) estudaram o efeito da monocultura e da rotação de cultura sobre a população dos fungos no solo. Verificaram que a rotação de cultura propicia uma microflora mais rica e variada.

MENON e WILLIAMS (1957) relataram que a população de fungos de um solo foi influenciada por sua vegetação mas, não variava significativamente com a temperatura e a umidade, resultado oposto àquele obtido por BURGESS (1958).

KAUFMAN e WILLIAMS (1963) estudaram a influência da relação C/N sobre a população fúngica do solo. O número total dos fungos decrescia com o aumento da relação C/N. Além disso, encontraram que determinados gêneros eram favorecidos por uma relação larga e outros por uma relação estreita de C/N.

WILLIAMS e SCHMITTHENNER (1956) fizeram um estudo dos gêneros de fungos que ocorrem em solos de Ohio, determinando um total de 40.000 a 200.000 unidades viáveis por grama de solo.

Todos os autores acima citados, além de KAUFMAN e WILLIAMS (1964) e KAUFMAN, WILLIAMS e SUMMER (1963), trabalharam pelo método da diluição em série e seu plaqueamento, escolhendo esta técnica como a melhor para a obtenção dos resultados que pesquisavam.

RANZANI, FREIRE e KINJO (1966) estudaram as diferentes séries de solos do município de Piracicaba, sua composição física e química, gênese, geologia e classificação, além de outros aspectos porém, sem referências à microbiolo -

gia dêstes solos.

CARDOSO (1967) fêz um estudo detalhado sôbre o Fusarium do feijoeiro, abrangendo raças de Fusarium, sua patogenicidade, métodos de inoculação, e métodos de avaliação da severidade da doença. Além disso traz uma revisão bibliográfica dos trabalhos acêrca da murcha do feijoeiro.

SALGADO e outros (1966) estudaram a interação Fusarium e nematóide em relação à Murcha do Algodoeiro, e o efeito de diferentes porcentagens de areia, em substratos artificiais, sôbre a severidade da doença. Concluíram que a maior severidade da doença ocorria nos tratamentos em que os substratos continham maior porcentagem de areia, provàvelmente devido a uma melhor disseminação do patógeno na areia.

WEINDLING (1946) fêz uma revisão de alguns casos de antagonismos de microrganismos, no que se refere ao contrôlle biológico de doenças causadas por fungos do solo. WOOD e TVEIT (1955) fizeram uma revisão completa sôbre o contrôlle de doenças de plantas por meio de organismos antagonistas, com uma referência especial a doenças causadas por fungos do solo. GARRET (1965), revendo os tipos de contrôlle biológicos já conhecidos, indica que êste provàvelmente será uma forma de contrôlle das doenças, de larga aplicação no futuro.

WEINDLING e FAWCETT (1936) estudaram o contrôlle da Rizoctoniose das mudinhas de citros, acidificando-se o solo, concluindo que o efeito controlador desta prática se deve a um aumento, nestas condições, de Trichoderma spp, fungos de ação antagonista à Rhizoctonia solani. WEINDLING (1941) isolou e testou uma toxina produzida por Gliocladium fimbriatum e algumas espécies de Trichoderma, verificando sua alta ação antagonística contra esporos de Sclerotinia americana e hi -

fas de Rhizoctonia solani.

WEINDLING (1932) investigou um "strain" de Trichoderma lignorum que parasita fungos do solo como R. solani, Phytophthora parasitica, Pythium spp. Rhizopus spp e Sclerotium rolfsii.

JACKSON (1965) obteve uma redução da infecção de Sclerotium bataticola em sementes de amendoim com Aspergillus flavus.

CAMPBELL (1956) estudou a associação de 6 espécies de fungos do solo com Helminthosporium sativum, do trigo, obtendo uma redução na incidência da doença com o auxílio de Phoma humicola, Epicoccum purpurascens e Trichoderma viride.

WAKSMAN e BUGIE (1944) isolaram uma substância antibiótica produzida por Chaetomium, a chaetomina, que se assemelha, em sua ação, à penicilina, agindo, principalmente, sobre bactérias gram-positivas.

CUMMINGS (1954) obteve a inibição do crescimento, "in vitro" de um grande número de fungos, quando em presença de Chaetomium globosum.

TVEIT e WOOD (1955) testaram quarenta e sete isolamentos de Chaetomium, representando vinte e sete espécies, quanto à sua habilidade em controlar o crescimento de plantas de aveia, causado por Fusarium nivale. Alguns isolamentos de C. globosum e de C. cochliodes deram alto índice de controle, rivalizando com o tratamento de sementes por fungicidas mercuriais. C. cochliodes é altamente eficiente no controle, quando misturado aos solos 10 meses antes da semeadura da aveia. Os isolamentos que proporcionaram um bom controle não se mostraram muito antagônicos ao Fusarium quando crescendo em caixas de petri.

DAVIS (1964) estudou o controle biológico de Fusarium oxysporum de diferentes plantas, por meio de inoculações cruzadas destes fungos sendo que os não patogênicos a uma determinada cultura protegiam estas plantas da doença causada pelo outro Fusarium, patogênico à cultura.

TVEIT e MOORE (1954) obtiveram o controle de uma doença da aveia causada por Helminthosporium victoriae por meio de um isolamento de Chaetomium. Este último também se mostrou antagônico a vários fungos e bactérias "in vitro".

SMITH (1957) pela primeira vez demonstrou um efeito inibidor de Micromonospora, atualmente conhecido como Cephalosporium, sobre Fusarium oxysporum.

ALLISON e PHILLIPS (1963) selecionaram vários isolamentos de Cephalosporium por meio de três passagens por plantas inoculadas posteriormente com o Fusarium do tomateiro, usando-se sempre aqueles isolamentos de Cephalosporium que impediram o aparecimento da doença. Dos três isolamentos verificaram que o último era altamente eficiente no controle, o segundo de eficiência intermediária e o primeiro quase inefetivo.

LONG (1963) reporta o controle da Murcha de Fusarium do "cowpea" por espécies de Cephalosporium. ROY e PATEL (1963) descrevem que diferentes isolamentos de Cephalosporium, efetivos na inibição dos sintomas da Murcha de Fusarium do tomateiro, foram testados para o algodoeiro. Verificaram que alguns isolamentos efetivos no tomateiro também o foram para o algodoeiro, mas outros não, sendo outros isolamentos efetivos para o algodoeiro e não para o tomateiro.

CHISLER e outros (1962) descrevem que uma espécie de Cephalosporium diminuiu a incidência da Murcha de Fusarium

em tomateiro.

RODEBAUGH (1964) estudou o controle biológico da Marcha de Fusarium do tomateiro por meio do Cephalosporium. Encontrou que alguns isolamentos deste fungo eram mais eficientes no controle do que outros. Dá explicações bioquímicas para o controle dessa doença, demonstrando que a atividade da metilesterase péctica aumentava rapidamente em plantas suscetíveis de tomateiro inoculadas com Fusarium. Plantas que haviam recebido o Cephalosporium previamente demoravam mais tempo para apresentar um aumento da metilesterase, que, rapidamente, mostrava um decréscimo acentuado. A inibição da formação da metilesterase indicava um mecanismo de resistência ativo nestas plantas, sendo que a atividade da polifenoloxidase estava estreitamente relacionada com a extensão da descoloração das plantas.

BEDI (1966) estudou o controle biológico do Verticillium do quiabo, verificando que baixas concentrações de Cephalosporium inoculadas antes do Verticillium reduziam significativamente a incidência da doença. Cephalosporium e Verticillium não se mostraram antagônicos em cultura, porém extratos de raízes de plantas inoculadas com Cephalosporium inibiam o desenvolvimento de Verticillium. O mesmo autor sugere que a natureza da resistência induzida em plantas inoculadas com Cephalosporium à invasão de Verticillium é de natureza bioquímica.

PATEL (1964) estudou o controle biológico do Fusarium do algodoeiro com vários isolamentos de Cephalosporium. Para a inoculação do Cephalosporium este foi cultivado em meio líquido, sendo as raízes das plantinhas inoculadas pelo método da imersão numa suspensão de conídios. Obteve um

bom contrôle da doença com alguns isolamentos de Cephalosporium. MWANZA (1964) fêz estudos semelhantes com o Fusarium do tomateiro.

MOSTAFA (1966) estudou o contrôle do Fusarium e do Verticillium do algodoeiro com uma série de fungos diferentes. A maioria dêstes fungos, isolados de plantas de algodoeiro cultivadas em solo natural, não eram considerados patógenos do algodoeiro. Êstes fungos foram inoculados no algodoeiro pelo método da infestação do substrato, prèviamente à sementeira e à inoculação do Fusarium. Obteve que espécies de Chaetomium e Gliocladium reduziam a Murcha, provàvelmente pela produção de substâncias difusíveis que retardam o crescimento dos patógenos. Isolamentos de Cephalosporium, Fusarium oxysporum e Gonatorrhodiella causavam a obstrução dos vasos das plantas, retardando a penetração dos patógenos.

Na literatura nacional não se encontraram trabalhos a respeito do contrôle biológico.

A revisão feita demonstra que ainda não se sabe o suficiente sôbre o contrôle biológico, para tornar sua aplicação uma prática normal na agricultura. Não se encontraram referências ao contrôle biológico do Fusarium oxysporum do feijoeiro, na literatura.

3. MATERIAIS3.1. Solos utilizados e suas caracterizações

Para o levantamento da população fúngica e para a obtenção dos fungos utilizados nos experimentos de controle biológico, foram usados solos de seis séries do município de Piracicaba. Suas principais características físico-químicas encontram-se relacionadas no quadro I, de acordo com RANZANI, FREIRE e KINJO (1966).

QUADRO I - Solos utilizados e suas caracterizações

Solo	Grande nº Grupo	Série	Classe Textural	pH	C/N	Capacid. dupla troca
1	Podsolóico	Quebra-Dente	Areia barrenta fina	5,3	8	5,88
2	Hidromórfico	Monte Olimpo	Barro arenoso fino	4,2	10	10,15
3	Podsolóico	Tijuco Preto	Barro arenoso fino	5,3	11	7,49
4	Latosol	Luiz de Queiroz	Barro argiloso	6,0	10	8,52
5	Mediterrânico	Bairrinho	Barro	6,0	11	11,94
6	Regosolo	Sertãozinho	Barro arenoso grosso	4,3	8	2,02

A vegetação típica dos solos, quando se procedia à sua coleta, era a seguinte:

Quebra-Dente: Restos de cultura de cana-de-açúcar e capim gordura (Melinis minutiflora).

Monte Olimpo: capins de banhado e sapé (Imperata brasiliensis).

Tijuco Preto: capim gordura (Melinis minutiflora) e plantação de Grevillia robusta.

Luiz de Queiroz: capim favorito (Panicum teneriffae), capim gordura (Melinis minutiflora) e restos de cultura de milho.

Bairrinho: Capim gordura (Melinis minutiflora) e cana-de-açúcar.

Sertãozinho: lixa (Lippia urticoides), capim gordura (Melinis minutiflora), sapé (Imperata brasiliensis) e capim favorito (Panicum teneriffae).

### 3.2. Fungos utilizados nos experimentos de controle biológico

3.2.1. Patógeno - Trabalhou-se, em todos os casos, com o isolamento 3700 de Fusarium, pertencente à raça 1, descrita por CARDOSO (1967).

3.2.2. Fungos prováveis inibidores de Fusarium - Os fungos que foram testados quanto à sua capacidade de controle biológico foram isolados de tecidos de feijoeiro e estão relacionados no quadro X. Além destes, utilizaram-se, ainda, os seguintes isolamentos:

2 isolamentos de Chaetomium spp isolados do tomateiro, fornecidos por Dr. H. Tokeshi. - Isolamentos 32 e 33.

1 isolamento de Chaetomium sp. isolado do feijoeiro, fornecido por Eng. Agr. C. O. N. Cardoso. - Isolamento 34

1 isolamento de Cephalosporium sp., isolado do algodoeiro, fornecido por Dr. E. Balmer. - Isolamento 30.

1 isolamento de Cephalosporium sp. isolado do tomateiro, fornecido por Dr. C. C. Allison. - Isolamento 31

1 isolamento de Curvularia, fungo reisolado com grande frequência do Experimento III. - Isolamento 36.

### 3.3. Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura utilizados no decorrer d'êste trabalho foram: a) Meio de Warcup (WARCUP, 1950); b) Meio de Martin (MARTIN, 1950); c) Meio OAES (SCHMITTHENNER e WILLIAMS, 1958); d) Meio de batata (200 g), glicose (20 g), ágar (15g), água (100 ml)- (BDA); e) Meio de peptona (2 g), maltose (4 g), ágar (15 g) e água (1000 ml)- (MPA); f) Meio de cultura feito com a mesma solução nutritiva usada para o hospedeiro, na mesma concentração, e acrescida de 2% de sacarose; g) Meio de arroz com casca (1 volume), água (2 volumes), acrescido de 1% de dextrose.

Para a conservação dos fungos utilizou-se solo com 20% de matéria orgânica, esterilizado e contido em tubo de ensaio.

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave, por 30 minutos, a 1 atmosfera de pressão e 120°C.

### 3.4. Hospedeiro

Usaram-se, para todos os experimentos, 4 diferentes variedades de feijoeiro. Todas eram sabidamente suscetíveis ao Fusarium, isolamento 3700. As sementes usadas neste trabalho provêm da coleção de sementes da Ila. Cadeira da ESALQ e foram multiplicadas nos campos de cultura desta Escola, tendo sido conservadas em câmaras secas apropriadas. As variedades de Phaseolus vulgaris utilizadas encontram-se relacionadas no quadro II.

QUADRO II - Variedades de Phaseolus vulgaris usadas

Nº de identificação	Nome da variedade	Grupo	Origem
4000	Rosa (PE)	Rosinha	Pernambuco
4005	Rosinha (Tatui)	Rosinha	São Paulo
6002	Bico de Ouro	Bico de Ouro	São Paulo
6003	Feijão nº 29-30-L.50	Bico de Ouro	São Paulo

### 3.5. Substrato para o cultivo do Hospedeiro

3.5.1. Solo como Substrato - Usou-se uma mistura de solo natural de cada série, com areia de rio lavada e esterilizada. O hospedeiro foi cultivado em vasos de barro com 20 cm de diâmetro superior e 19,5 cm de altura. A irrigação era feita com água de torneira.

3.5.2. Areia como substrato - em todos os experimentos cultivou-se o hospedeiro em vasos iguais aquêles descritos acima, contendo areia lavada de rio, irrigada semanalmente com solução nutritiva. A solução nutritiva usada nos experimentos foi a segunda fórmula comercial de MALAVOLTA e HAAG (1964), substituindo-se o nitrato de potássio daquela fórmula por nitrato duplo de sódio e potássio, na base de 5,50 gramas deste adubo por litro de solução.

Para ambos os casos, a areia e os vasos eram esterilizados em autoclave, por duas horas, sob uma pressão de 0,5 atmosferas e uma temperatura de 110°C.

### 3.6. Condições ambientais dos experimentos

Para todos os experimentos em que se cultivava o feijoeiro em vasos, êstes eram mantidos em casa de vegetação, com uma temperatura controlada de 28 a 30°C. Para manter a u

midade suficiente, os vasos eram irrigados diàriamente com 250 ml de água de torneira. Para os experimentos "In vitro", utilizava-se uma estufa de temperatura controlada entre 28 e 30°C, onde se mantinham as placas de petri ou frascos de cultura.

#### 4. MÉTODOS

##### 4.1. Amostragem dos solos

De cada solo coletavam-se 20 amostras, ao acaso, de aproximadamente 100 cc, que eram acondicionadas em btinhas a apropriadas e esterilizadas. A profundidade de retirada do solo foi de 5 a 20 cm. No laboratório, as vinte amostras de cada solo eram misturadas e permitia-se-lhes uma secagem, à sombra, por 24 a 48 horas, conforme o grau de umidade que apresentavam. Quando sêco, o solo era peneirado em tamiz de 16 mesh, fazendo-se a uniformização da amostra agitando o solo em um moinho de bola, por 30 minutos. Após a homogeneização das amostras retiravam-se 5 a 10 gramas de terra que eram levadas para a determinação da umidade.

##### 4.2. Diluição do solo e Plaqueamento

Após a preparação do solo, retiravam-se 10 gramas dêste, as quais eram suspensas em 90 ml de água destilada e esterilizada, contendo 1% de carboximetilcelulose, agitando o frasco em agitador de pulso por 10 minutos. Em seguida, faziam-se as diluições em série, trabalhando-se com as concentrações de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . De cada uma das diluições pipetava-se uma alíquota de 1 ml, vertendo-a para caixa de petri

que logo em seguida recebia 12 ml de meio de cultura a 45°C, por meio de uma seringa esterilizada, e agitando as placas em tôdas as direções. O número de colônias era contado dois dias após o plaqueamento.

#### 4.3. Preparo dos Inóculos

##### 4.3.1. Obtenção do inóculo de Fusarium

Sempre que se preparava o inóculo, partia-se da cultura em conservação em meio de solo, a qual era repicada para caixas de petri contendo meio MPA. Seguiu-se tôda a marcha descrita por CARDOSO (1967), que consistia em transferir conídios de Fusarium para frascos erlenmeyer contendo meio de cultura feito com solução nutritiva mais sacarose, deixando-se desenvolver por sete dias a 28°C. O inóculo obtido neste período era considerado o inóculo concentrado (N), após a homogeneização da cultura. Com o inóculo concentrado preparavam-se as concentrações desejadas, diluindo-o com solução nutritiva ou com água.

##### 4.3.2. Preparo do inóculo dos fungos prováveis inibidores de Fusarium, para a inoculação pelo método da imersão.

Os fungos eram cultivados em meio de BDA, em placas de petri, à temperatura de 28°C, os isolamentos de Chaetomium por 30 dias e os outros por 15 dias. Fazia-se a suspensão do conteúdo de duas placas do mesmo fungo para 300 ml de água destilada esterilizada, homogeneizando-se em liquidificador por 1 minuto.

#### 4.3.3. Obtenção do inóculo dos fungos prováveis inibidores de Fusarium, para a inoculação pelo método da infestação do substrato.

Neste caso, os fungos eram cultivados em meio de arroz com casca, contido em frascos erlenmeyer, permitindo-se o crescimento dos isolamentos de Chaetomium por 35 dias e dos outros por 25 dias, à temperatura de 28°C.

Para qualquer tipo de preparo de inóculo dos fungos prováveis inibidores do Fusarium partia-se sempre de culturas conservadas em solo.

#### 4.4. Métodos de Inoculação dos Fungos

##### 4.4.1. Inoculação de Fusarium

O Fusarium foi sempre inoculado pelo método de Armstrong, que consiste em se colocar o inóculo diretamente no substrato onde o hospedeiro se desenvolve, junto às raízes deste, previamente feridas. Aplicavam-se 300 ml de inóculo, na concentração desejada, por meio de uma perfuração feita no centro do vaso com um tubo de vidro, de diâmetro um pouco inferior ao do círculo formado pelas plantas em crescimento, pondo-se as raízes feridas das plantas em contato com o inóculo. A idade das plantas que recebiam este tratamento variava de 7 a 15 dias.

##### 4.4.2. Inoculação dos fungos prováveis inibidores de Fusarium pelo método da imersão.

As plantinhas com sete a nove dias de idade após a semeadura eram arrancadas das caixas onde foram produzidas, e, por agitação, retirava-se o excesso de areia aderente ao sistema radicular, fazendo-se uma rápida lavagem das raízes em água corrente. O sistema radicular era mergulhado no inó-

culo dos fungos e neles mantido por aproximadamente quatro horas e trinta minutos, fazendo-se uma agitação manual cada 20 minutos. Cada 300 ml de inóculo servia para a inoculação de 40 plantas. Após o tempo da inoculação, as plantas eram levadas à casa de vegetação e fazia-se o seu plantio diretamente nos vasos, regando-se com o excesso do inóculo.

#### 4.4.3. Inoculação das sementes com fungos prováveis inibidores de Fusarium

Após a desinfecção, as sementes eram mantidas por 24 horas em água e a seguir mergulhadas numa suspensão do inóculo, por cinco horas, com agitação constante. Findo este período fazia-se a semeadura em vasos, regando-se com o excesso do inóculo.

#### 4.4.4. Inoculação dos fungos testados em contróle biológico pelo método da infestação do substrato.

Para a infestação do substrato, obtinha-se inóculo dos fungos constituído de arroz em casca e fungo. Retirava-se um volume de 100 ml dêste inóculo, após a sua perfeita homogeneização, para a inoculação de cada vaso. Nos vasos fazia-se um sulco de mais ou menos 8 cm de profundidade, colocando-se o inóculo e distribuindo-o muito bem. Em cima fêz-se a semeadura, com 50% de sementes a mais do que as plantas desejadas, recobrando-se tudo com areia.

#### 4.5. Tratamento das sementes, semeadura e obtenção de mudas

As sementes, após rigorosa seleção, foram desinfetadas, mergulhando-se-as em uma solução de hipoclorito de sódio diluído (uma parte de hipoclorito comercial, contendo 5%

de cloro ativo, para uma parte de água), pelo tempo de 30 minutos. Decorrido êsse prazo, o hipoclorito era substituído por água e nesta as sementes foram deixadas imersas por 24 horas antes da sementeira. A sementeira sempre foi feita a uma profundidade de 2 cm.

Para a obtenção de mudas a serem inoculadas pelo método da infestação, a sementeira foi feita diretamente nos vasos, distribuindo-se as sementes em um círculo de 14 cm de diâmetro, em quantidade igual a 50% a mais que o número de mudas desejadas.

Para a aplicação do método de inoculação por imersão, a sementeira foi feita em caixas de madeira, previamente esterilizadas em autoclave, e que mediam 43 x 32 x 10 cm de altura. Nestas, as sementes foram distribuídas em cinco linhas paralelas à maior dimensão da caixa, numa densidade de 15 a 17 sementes por linha. Também, neste caso, usou-se um número de sementes 50% superior ao número de mudas desejado.

#### 4.6. Isolamento, classificação, conservação e reisolamento dos fungos usados no controle biológico

De plantas vivas ou mortas fazia-se o isolamento pelo método da cultura de tecidos. Para isto, o caule de cada planta era dividido em cinco partes, começando da raiz e terminando no ápice, retirando-se de cada parte um segmento de 1 cm de comprimento. Estes segmentos eram desinfetados superficialmente e plaqueados em meio de Martin. Para a classificação dos fungos, êstes eram cultivados em meios de Martin, OAES, BDA e MPA e posteriormente conservados em solo esterilizado.

#### 4.7. Estudos de Antagonismo "In vitro"

Os fungos testados como inibidores de Fusarium e o próprio Fusarium foram inoculados no mesmo dia, cada qual numa extremidade da placa de petri contendo meio BDA. A transferência dos fungos para a placa foi feita com o auxílio de uma alça de tungstênio de diâmetro constante, incubando-se as placas a 28°C. Seguiu-se esta técnica para cada fungo, para confrontar o seu desenvolvimento com o de Fusarium e a influência de um sobre o outro. No período de 14 dias após o plaqueamento foram feitas observações diárias do desenvolvimento das colônias. Seguiram-se técnicas descritas por JOHNSON e outros (1959) e por PORTER (1924).

#### 4.8. Métodos de avaliação para os experimentos de controle biológico

Para a avaliação do possível controle da doença pelos fungos em estudo utilizaram-se dois métodos:

4.8.1. Método do Índice de Resistência. Este método foi descrito por CARDOSO (1967) e consiste em medir o número de plantas mortas no final do experimento, levando-se em conta a velocidade de morte. O índice de resistência consiste de uma média ponderada, considerando-se o número de plantas mortas e tomando-se como peso o valor do período, multiplicado por 100.

$$\text{Índice de Resistência} = \frac{x \cdot y}{y}$$

onde:

x = número de plantas mortas dentro do período de valor y

y = valor do período no qual se colheu o número x de plantas mortas.

Período era considerado o intervalo entre as coletas de plantas mortas, o qual podia ser um dia ou vários dias.

#### 4.8.2. Método da porcentagem de plantas mortas.

Neste caso consideravam-se, apenas, as plantas mortas no final do experimento, independentemente do dia em que se deu a sua morte. As porcentagens de plantas mortas eram transformadas para arco-seno, aplicando-se depois a análise de variância.

Para a avaliação da germinação de sementes em vasos e desenvolvimento de plantas foram usados dois métodos:

#### 4.8.3. Método da porcentagem de germinação.

Trabalhava-se com a porcentagem de germinação transformada para arco-seno.

4.8.4. Davam-se notas para cada vaso, levando-se em consideração o número de plantas e, principalmente, seu aspecto e estágio de desenvolvimento, notas estas que eram dadas 14 dias após a germinação. As notas variavam de 1 para vasos sem plantas a 10, com alto índice de germinação e desenvolvimento ótimo. das plantas.

### 4.9. Levantamento da População Fúngica de seis Solos. - Experimento I.

Utilizaram-se os solos descritos em 3.1., seguindo-se as técnicas 4.1. e 4.2., com os meios de Martin, de Warcup e OAES. Para cada solo foram usados os três meios de cultura e as três diluições, fazendo-se 10 repetições para cada diluição.

No ano seguinte foi repetido o mesmo ensaio, porém só com o meio de Martin e com a concentração  $10^{-3}$ . Neste ca-

so, procurava-se classificar as principais colônias de fungos que apareciam nas placas.

Antes de se fazer a contagem do número de colônias, as placas eram incubadas em estufa a 29°C por 48 horas. Após a contagem o número médio de colônias para cada repetição era transformada para número de unidades viáveis de fungos por grama do solo.

#### 4.10. Isolamento indireto de Fungos do Solo prováveis inibidores de Fusarium - Experimento II

Preparavam-se misturas dos seis solos descritos em 3.1. e secados à sombra por 24 horas com areia esterilizada, na proporção de dois volumes de solo para um volume de areia. O solo natural era peneirado antes de se proceder à mistura. Trabalhou-se com a variedade 4000 de feijão, seguindo-se as técnicas descritas em 3.5.1., 3.6. e 4.5., semeando-se diretamente em cada vaso. Quinze dias após a semeadura fôz-se a inoculação de Fusarium, na concentração de N/5. Vinte e cinco dias depois da inoculação de Fusarium colheram-se as plantas que ainda estavam vivas, fazendo-se o isolamento dos fungos que se encontravam no interior destas. (4.6.). O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, fazendo-se seis repetições para cada solo, e consistindo cada parcela de um vaso.

4.11. Estudos do Contrôlo Biológico de Fusarium4.11.1. Estudos de Contrôlo Biológico com Chaetomium, Trichoderma e Cephalosporium inoculados pelo método da imersão em plantas e sementes. - Experimento III.

Para êste ensaio foi usada a variedade 4005 de feijoeiro e três isolamentos dos fungos prováveis inibidores de Fusarium. A inoculação dos três fungos foi feita de acordo com 4.4.2. e 4.4.3. Após a inoculação de plantas de sete dias a temperatura da casa de vegetação era mantida ao redor de 20°C por 48 horas, para a recuperação das plantas, logo depois se voltando aos 28°C.

Os tratamentos do experimento são apresentados no quadro III, tanto para a inoculação das plantas quanto a de sementes.

QUADRO III - Tratamentos do Experimento III

Tratamento	Isolamento nº	Gêneros
1	2	Chaetomium + Fusarium
2	7	Trichoderma + Fusarium
3	30	Cephalosporium + Fusarium
4	-	----- Fusarium
5	2	Chaetomium -----
6	7	Trichoderma -----
7	30	Cephalosporium -----
8	-	----- -----

Fêz-se a inoculação do Fusarium sete dias após a inoculação dêstes fungos, na concentração de N/4. O delineamento do experimento foi de blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições, sendo cada parcela um vaso com 10 plantas. A coleta diária das plantas mortas foi feita por

33 dias, procedendo-se ao reisolamento dos fungos inoculados.

4.11.2. Estudos de contrôlc biológico com 25 isolamentos de fungos, inoculados pelo método da infestação do substrato:-Experimento IV.

Foi usada a variedade 6002 de feijão. A infestação do substrato foi feita conforme 4.4.4. Quinze dias após a semeadura fêz-se a aplicação do Fusarium na concentração de N/3. Durante 45 dias fêz-se a coleta diária das plantas mortas, bem como os respectivos reisolamentos. O delineamento do experimento foi de blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições, sendo cada vaso uma parcela. Houve ao todo 52 tratamentos, apresentados no quadro IV.

## QUADRO IV - Tratamentos do Experimento IV.

Trat.	Isol. nº	Gêneros	Trat.	Isol. nº	Gêneros
1	1	Chaetomium + Fusarium	27	1	Chaetomium
2	12	Chaetomium + Fusarium	28	12	Chaetomium
3	15	Chaetomium + Fusarium	29	15	Chaetomium
4	19	Chaetomium + Fusarium	30	19	Chaetomium
5	20	Chaetomium + Fusarium	31	20	Chaetomium
6	24	Chaetomium + Fusarium	32	24	Chaetomium
7	6	Chaetomium + Fusarium	33	6	Chaetomium
8	29	Chaetomium + Fusarium	34	29	Chaetomium
9	25	Chaetomium + Fusarium	35	25	Chaetomium
10	32	Chaetomium + Fusarium	36	32	Chaetomium
11	27	Trichoderma + Fusarium	37	27	Trichoderma
12	13	Trichoderma + Fusarium	38	13	Trichoderma
13	8	Trichoderma + Fusarium	39	8	Trichoderma
14	7	Trichoderma + Fusarium	40	7	Trichoderma
15	30	Cephalospor. + Fusarium	41	30	Cephalosporium
16	31	Cephalospor. + Fusarium	42	31	Cephalosporium
17	22	Rhizoctonia + Fusarium	43	22	Rhizoctonia
18	21	Penicillium + Fusarium	44	21	Penicillium
19	10	Penicillium + Fusarium	45	10	Penicillium
20	18	Botryodiplodia + Fusarium	46	18	Botryodiplodia
21	17	Lomaantha + Fusarium	47	17	Lomaantha
22	23	Macrophomina + Fusarium	48	23	Macrophomina
23	11	Epicoccum + Fusarium	49	11	Epicoccum
24	35	Aspergillus + Fusarium	50	35	Aspergillus
25	36	Curvularia + Fusarium	51	36	Curvularia
26	--	----- Fusarium	52	--	-----

4.11.3. Estudos de contrôle biológico com 10 isolamentos de fungos, inoculados pelo método da infestação do substrato. - Experimento V.

Usou-se a variedade 6003 de feijoeiro. Em tudo mais o experimento foi conduzido na forma idêntica ao experimento IV. Havia, ao todo, 22 tratamentos, representados no quadro V.

QUADRO V - Tratamentos do Experimento V

Trat.	Isol. No:	Gêneros	Trat.	Isol. No:	Gêneros
1	2	Chaetomium + Fusarium	12	2	Chaetomium
2	3	Chaetomium + Fusarium	13	3	Chaetomium
3	4	Chaetomium + Fusarium	14	4	Chaetomium
4	5	Chaetomium + Fusarium	15	5	Chaetomium
5	26	Chaetomium + Fusarium	16	26	Chaetomium
6	34	Chaetomium + Fusarium	17	34	Chaetomium
7	33	Chaetomium + Fusarium	18	33	Chaetomium
8	9	Trichoderma + Fusarium	19	9	Trichoderma
9	14	Rhizoctonia + Fusarium	20	14	Rhizoctonia
10	28	Penicillium + Fusarium	21	28	Penicillium
11	---	----- Fusarium	22	---	-----

4.11.4. Teste de Antagonismo "in vitro" - Experimento VI

O experimento foi conduzido em caixas de petri, com meio BDA esterilizado. Os fungos testados e o Fusarium foram tratados como em 4.7. Os isolamentos usados neste experimento foram os seguintes:

Chaetomium: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 15, 19, 20, 24, 25, 26, 29 e 34.

Trichoderma: 7, 8, 9, 13 e 27.

Penicillium: 10, 21 e 28.

Rhizoctonia: 14 e 22.

Cephalosporium: 30.

Lomaantha: 17

Aspergillus: 35

Epicoccum: 11

Macrophomina: 23

Botryodiplodia: 18

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Experimento I - Levantamento da População Fúngica de seis solos

Os resultados deste experimento encontram-se representados nos quadros VI e VII.

QUADRO VI - Número de colônias de fungos obtidas por grama de solo no ano de 1967.\*

Solo nº	Meio de Martin Diluições			Meio OAES Diluições		
	1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000
1	10,3	35,2	84,0	11,5	26,0	56,0
2	----	58,8	192,0	16,9	36,9	176,0
3	16,4	67,6	132,0	12,6	38,0	60,0
4	----	70,5 <sup>a</sup>	314,0 <sup>b</sup>	----	66,5 <sup>c</sup>	250,0 <sup>a</sup>
5	----	119,7	188,0	----	126,1	232,0
6	16,5	35,4	52,0	16,7	50,0	57,5

\* Número médio de colônias dividido por  $10^3$  obtido de 10 repetições.

a=Média de 6 repetições; b=média de 7 repetições; c=média de 4 repetições.

O meio de Warcup não foi apresentado no Quadro VI devido a sua alta ineficiência; houve uma contagem mínima de colônias de fungos, geralmente muito camufladas por colônias de bactérias com desenvolvimento exuberante.

QUADRO VII - Número de colônias de fungos obtidas por grama de solo no ano de 1968<sup>+</sup>, com a diluição 1:1000 e no meio de Martin

Solo nº	Nome da Série	Nº Médio de Colônias
1	Quebra-Dente	48,0 . 10 <sup>3</sup>
2	Monte Olimpo	66,7 . 10 <sup>3</sup>
3	Tijuco Preto	68,8 . 10 <sup>3</sup>
4	Luiz de Queiroz	60,1 . 10 <sup>3</sup>
5	Bairrinho	120,3 . 10 <sup>3</sup>
6	Sertãozinho	25,9 . 10 <sup>3</sup>

+ Número médio de colônias obtido de 10 repetições

Os gêneros mais frequentemente isolados dos diferentes solos estão representados no Quadro VIII

QUADRO VIII - Principais gêneros de fungos encontrados nos diferentes tipos de solo.

Gêneros	Solos					
	1	2	3	4	5	6
Trichoderma	+	+	+	+	+	+
Penicillium	+	+	+	+	+	+
Aspergillus	+	+	+	+	+	+
Rhizopus	+	-	+	+	+	-
Absidia	-	+	+	-	+	-
Mucor	-	+	-	-	-	+
Fusarium	+	+	+	-	-	+
Phoma	-	+	+	-	-	-

+ Presença do gênero

- Ausência do gênero

### 5.2. Experimento II - Isolamentos de Fungos do Solo prováveis inibidores de Fusarium

Os resultados deste experimento, visando isolar prováveis inibidores de Fusarium, são apresentados no IX.

QUADRO IX - Número de plantas vivas e mortas, por parcela, para os diferentes solos testados.

Repetições	SOLOS											
	1		2		3		4		5		6	
	M*	V**	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
1	5	3	6	2	6	0	6	1	6	0	6	0
2	5	3	6	3	7	0	4	5	6	1	8	0
3	4	3	7	1	9	3	6	2	7	1	9	0
4	3	3	4	1	3	2	3	2	3	2	5	0
5	4	0	6	0	3	2	6	0	6	0	5	2 <sup>a</sup>
6	3	1	4	0	4	2	6	0	2	2	6	0

M\* = Plantas mortas no final do experimento; V\* = Plantas vivas no final do experimento.

a = Duas plantas vivas, porém demonstrando sintomas típicos da murcha de Fusarium.

O número total de plantas vivas determinado no experimento foi de 47, plantas, tendo o maior número sido fornecido pelo solo 1.

Os fungos prováveis inibidores de Fusarium, isolados das plantas de feijoeiro cultivados nos diferentes solos, são apresentados no quadro X.

QUADRO X - Fungos isolados das plantas de feijeiro, nos diferentes solos e seus respectivos números de identificação.

Solos	Isolamentos	Número de Identificação
1	<u>Chaetomium</u> spp	1 a 6
	<u>Trichoderma</u> spp	7 a 9
	<u>Penicillium</u> sp	10
	<u>Epicoccus</u> sp	11
	<u>Aspergillus</u> sp	35
2	<u>Chaetomium</u> sp	12
	<u>Trichoderma</u> sp	13
	<u>Rhizoctonia</u> sp	14
3	<u>Chaetomium</u> sp	15
	<u>Penicillium</u> sp	16
	<u>Lomaantha</u> sp	17
	<u>Botryodiplodia</u> sp	18
4	<u>Chaetomium</u> spp	19 e 20
	<u>Penicillium</u> sp	21
	<u>Rhizoctonia</u> sp	22
	<u>Macrophomina</u> sp	23
5	<u>Chaetomium</u> spp	24 a 26
	<u>Trichoderma</u> sp	27
	<u>Penicillium</u> sp	28
6	<u>Chaetomium</u> spp	29

5.3. Experimento III - Estudos de Contrôlo Biológico com Chaetomium, Trichoderma e Cephalosporium, inoculados pelo método da imersão, em plantas e sementes.

Os resultados obtidos na forma de índices de resistência, para os diferentes tratamentos, quando os fungos foram inoculados em plantas e em sementes, são apresentados, respectivamente, nos quadros XI e XII.

Nestes quadros estão representados apenas os resultados para os tratamentos com fungos mais Fusarium e só com Fusarium, porque nos outros tratamentos não houve morte de plantas.

QUADRO XI - Índices de resistência obtidos para os diferentes tratamentos quando os fungos foram inoculados em plantinhas de feijoeiro.

Tratamento	R e p e t i ç õ e s			
	1	2	3	4
1	8,217	8,451	8,191	9,140
2	8,802	8,876	9,374	9,351
3	8,851	9,234	7,116	7,757
4	7,977	9,397	8,703	8,753

QUADRO XII - Índices de resistência obtidos para os fungos, inoculados pelo método da imersão, em sementes de feijoeiro.

Tratamento	R e p e t i ç õ e s			
	1	2	3	4
1	8,553	7,977	8,270	8,400
2	8,628	9,140	8,528	7,840
3	8,058	7,977	7,784	8,553
4	9,934	9,000	9,420	8,451

A análise de variância referente aos quadros XI e XII, os quais foram analisados em conjunto, é apresentada no quadro XIII.

QUADRO XIII - Análise de variância para os índices de resistência obtidos quando os fungos foram inoculados em platinhas e em sementes.

Causa da variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	7	3,9948	0,5707	1,887
Blocos	3	0,4633	0,1544	0,510
Resíduo	21	6,3512	0,3024	
Total	31	10,8093		

Coefficiente de Variação: 6,42%

A análise da variância não revelou diferenças significativas entre os oito tratamentos testados. Os diferentes fungos inoculados, por imersão, em sementes e platinhas de feijoeiro foram reisolados, respectivamente, nas seguintes proporções: Chaetomium 80% e 95,8%; Trichoderma 20% e 27,5%; Cephalosporium 2,5% e 2,5%.

#### 5.4. Experimento IV - Estudos de controle biológico com 25 isolamentos de fungos, inoculados pelo método da infestação do substrato.

Neste experimento, foram observadas diferenças quanto ao tempo necessário para a germinação das sementes, isto é, alguns fungos atrasaram de muito o aparecimento das platinhas, enquanto que outros pouco ou nada influenciaram na germinação das sementes.

Os tratamentos que germinaram normalmente, entre o primeiro e o quarto dia depois da semeadura, foram os que seguem: 1, 2, 3, 5, 10, 15, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 28, 29, 31, 36, 41, 42, 43, 47, 48 e 52, enquanto que os tratamentos 13, 20, 23, 24, 39, 46, 49 e 50 apresentaram um atraso de sete

dias ou mais na germinação. Os demais tratamentos se comportaram de maneira intermediária, havendo germinação entre o quarto e o sexto dias.

As porcentagens de germinação para diferentes tratamentos que futuramente iriam ser inoculados com Fusarium são apresentadas no quadro XIV.

QUADRO XIV - Porcentagem de germinação de sementes, por parcela, para os diferentes fungos usados.

Tratamento	R e p e t i ç õ e s				Médias
	1	2	3	4	
1	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3
2	86,7	86,7	86,7	86,7	86,7
3	73,3	100,0	100,0	80,0	88,33
4	73,3	73,3	73,3	100,0	79,98
5	86,7	86,7	86,7	80,0	85,03
6	53,3	60,0	86,7	73,3	68,33
7	86,7	80,0	60,0	40,0	66,68
8	93,3	93,3	93,3	73,3	88,30
9	93,3	80,0	86,7	80,0	85,00
10	86,7	86,7	93,3	100,0	91,68
11	73,3	86,7	86,7	66,7	78,35
12	60,0	26,7	20,0	33,3	35,00
13	26,7	26,7	6,7	33,3	23,35
14	93,3	80,0	86,7	100,0	90,00
15	93,3	93,3	93,3	60,0	84,98
16	80,0	86,7	86,7	86,7	85,03
17	46,7	60,0	53,3	46,7	51,65
18	86,7	73,3	73,3	93,3	81,65
19	80,0	73,3	66,7	80,0	75,00
20	13,3	60,0	60,0	40,0	43,33
21	86,7	73,3	80,0	100,0	85,00
22	86,7	93,3	80,0	93,3	88,33
23	60,0	60,0	40,0	66,7	56,68
24	53,3	53,3	40,0	60,0	51,65
25	66,7	46,7	60,0	53,3	56,67
26	93,3	86,7	80,0	93,3	88,33

A análise de variância da porcentagem de germinação apresentada no quadro XIV, está representada no quadro XV.

QUADRO XV - Análise de Variância para a porcentagem de germinação, para os diferentes tratamentos.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	25	17.496,98	699,879	8,233 <sup>***</sup>
Blocos	3	81,13	27,043	0,318
Resíduo	75	6.375,66	85,009	
Total	103	23.953,77		

Coeficiente de Variação: 15,43%

A análise da variância revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, para os diferentes tratamentos testados.

Com uma diferença mínima significativa de 28,247, ao nível de 1% de probabilidade, o teste de Tukey revelou diferenças significativas entre as médias para a germinação nos tratamentos 17, 24, 20, 12 e 13, os quais não diferiram entre si, e a germinação dos demais tratamentos.

Após a germinação, o aspecto das plantas variou bastante, em alguns tratamentos estas se mostraram saudáveis e fortes, bem desenvolvidas, enquanto que em outros havia muitas plantas fracas, pequenas e com necrose nas bordas das folhas. Os tratamentos que mostraram um pronunciado efeito de enrugamento e necrose de folhas, foram os que seguem: 2,5,6,7, 12 e 15. Dez dias após a germinação foram dadas notas às diferentes parcelas, considerando-se a altura das plantas, tamanho das folhas e número de plantas em cada vaso. As notas foram dadas por três pessoas, independentemente, para os tratamentos que mais tarde iriam ser inoculadas com Fusarium, e as médias das notas para estes tratamentos são apresentados no quadro XVI.

QUADRO XVI - Médias das notas atribuídas aos diferentes tratamentos no Experimento IV.

Tratamento	Média	Tratamento	Média
1	8,84	14	7,85
2	8,00	15	8,67
3	8,42	16	8,83
4	5,75	17	7,75
5	7,58	18	6,25
6	6,17	19	5,08
7	6,16	20	5,75
8	6,08	21	9,92
9	7,75	22	9,67
10	8,67	23	4,17
11	6,92	24	4,09
12	4,52	25	4,00
13	3,08	26	8,75

Com estas notas, os tratamentos foram divididos em três grupos, como segue :

Notas de 7,5 a 10: Ótima germinação e desenvolvimento - 1, 2, 3, 5, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 21, 22 e 26.

Notas de 4,5 a 7,4: Germinação e desenvolvimento razoáveis: 4, 6, 5, 8, 11, 18, 19, 20 e 7.

Notas de 1 a 4,4: Germinação e desenvolvimento ruins - 12, 13, 23, 24 e 25.

A severidade da doença causada por Fusarium nos diferentes tratamentos foi calculada tomando-se por base a porcentagem de plantas mortas por parcela. As porcentagens de plantas mortas para os diferentes tratamentos são apresentadas no quadro XVII.

QUADRO XVII - Percentagens de plantas mortas, para os diferentes tratamentos, obtidas no experimento IV.

Tratamento	Repetições				Médias
	1	2	3	4	
1	25,0	69,2	40,0	25,0	39,80
2	16,7	50,0	8,3	30,0	26,25
3	25,0	27,3	0,0	36,4	22,18
4	36,4	18,2	30,0	14,3	24,73
5	53,3	30,8	53,8	7,7	36,40
6	10,0	66,7	20,0	30,0	31,68
7	54,5	33,3	54,5	9,1	37,85
8	16,7	18,2	20,0	25,0	19,98
9	33,3	76,9	36,4	25,0	42,90
10	58,3	40,0	12,5	58,3	42,28
11	27,3	76,9	72,7	45,5	55,60
12	0,0	28,6	0,0	55,6	21,05
13	25,0	66,7	0,0	40,0	32,93
14,	66,7	66,7	76,9	28,6	59,73
15	78,6	61,5	54,5	36,4	57,75
16	57,1	71,4	50,0	53,8	58,08
17	9,1	0,0	57,1	54,5	30,18
18	33,3	84,6	58,3	37,5	53,43
19	9,1	50,0	12,5	50,0	30,40
20	0,0	75,0	62,5	0,0	34,37
21	11,1	45,5	57,1	11,1	31,20
22	28,6	25,0	36,4	44,4	33,60
23	16,7	75,0	18,2	0,0	27,43
24	14,3	42,8	0,0	11,1	17,05
25	28,6	50,0	25,0	0,0	25,90
26	57,1	80,0	50,0	50,0	59,28

A análise de variância para os dados do quadro XVII foi feita apenas para os tratamentos cujas médias não apresentaram grandes variações de repetição para repetição, e está representada no quadro XVIII.

QUADRO XVIII - Análise de Variância para as porcentagens de plantas mortas, transformadas para arco-seno, para os tratamentos 1, 4, 8, 9, 11, 14, 15, 16, 22 e 26.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	862,50	287,50	3,618±
Tratamentos	9	3.063,70	340,41	4,284±±
4+8 x resto	1	1.977,68	1.977,68	24,889±±
4 x 8	1	17,59	17,59	0,221
22+1+9 x 11+16+15+26+14	1	989,92	989,92	12,458±±
22 x 1+9	1	56,12	56,12	0,706
11+15+16 x 26+14	1	9,70	9,70	0,122
1 x 9	1	8,20	8,20	0,103
11 x 15+16	1	4,45	4,45	0,056
15 x 16	1	0,008	0,008	0,0001±
26 x 14	1	0,050	0,050	0,0006±
Resíduo	27	2.145,45	79,46	
Total	39	6.071,65		

Coefficiente de Variação: 21,20%

A análise da variância revelou um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade, para os diferentes tratamentos testados. O desdobramento dos graus de liberdade para tratamentos revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, para as seguintes comparações: tratamentos 4 e 8 comparados com os demais, como também para a comparação entre os tratamentos 22, 1 e 9 e os tratamentos 11, 16, 15, 26 e 14.

Para tôdas as plantas que morreram durante o experimento e, também, para 30% das plantas que restaram vivas no final, foram feitos reisolamentos, sendo obtidas as seguintes porcentagens para os tratamentos:

1 - 100,0	2 - 100,0	3 - 100,0	4 - 100,0	5 - 83,3
6 - 95,0	7 - 72,1	8 - 62,0	9 - 95,0	10 - 100,0
11 - 95,1	12 - 85,0	13 - 55,6	14 - 77,1	15 - 0,0
16 - 0,0	17 - 45,0	18 - 5,0	19 - 37,4	20 - 0,0
21 - 42,6	22 - 87,4	23 - 18,8	24 - 66,7	25 - 94,5

5.5. Experimento V - Estudos de Contrôles Biológico com 10 isolamentos de fungos, inoculados pelo método da infestação do substrato.

Neste experimento, também, se notaram diferenças na velocidade de germinação das sementes. Houve retardamento da germinação nos tratamentos 8 e 10, por mais de uma semana. No tratamento 10 houve germinação de uma única planta sadia, para tôdas as repetições.

As porcentagens de germinação para os diferentes tratamentos são apresentadas no quadro XIX.

QUADRO XIX - Porcentagens de germinação, por parcela, para os diferentes tratamentos.

Tratamento	R E P E T I Ç Õ E S				Média
	1	2	3	4	
1	93,3	80,0	93,3	100,0	91,65
2	80,0	80,0	93,3	86,7	85,00
3	86,7	86,7	93,3	100,0	91,68
4	93,3	93,3	100,0	93,3	94,98
5	100,0	100,0	86,7	100,0	96,68
6	93,3	93,3	93,3	93,3	93,30
7	86,7	100,0	93,3	100,0	95,00
8	20,0	33,3	6,67	13,3	18,58
9	66,7	80,0	86,7	60,0	73,35
10	0,0	0,0	20,0	0,0	5,00
11	100,0	100,0	100,0	93,3	98,33

A análise de variância das porcentagens de germinação representadas no quadro XIX e transformadas para arco-se no está representada no quadro XX.

QUADRO XX - Análise de variância para as porcentagens de germinação dos diferentes tratamentos. † no experimento V.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	9	11.764,586	1.307,176	16,642††
Blocos	3	79,515	26,505	0,337
Resíduo	27	2.120,761	78,547	
Total	39	13.964,862		

† O tratamento 10 não entrou na análise de variância, por não ter apresentado germinação em sete repetições, diferenciando-se, portanto, qualitativamente, dos demais tratamentos.

Coefficiente de Variação: 12,66%

A análise de variância revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, para os diferentes

tratamentos testados.

Com uma diferença mínima significativa de 26,52, ao nível de 1% de probabilidade, o teste de Tukey revelou diferenças significativas, entre o tratamento 8 e os demais. O tratamento 9 difere da testemunha, ao nível de 1% de probabilidade, mas não difere dos demais tratamentos, os quais não diferem entre si.

Notou-se que diferentes tratamentos, após a germinação, variavam bastante em seu desenvolvimento. Os tratamentos que mostraram alta porcentagem de enrugamento e necrose das folhas foram os que seguem: 1, 2, 4, 5, 6 e 7.

As notas dadas por três pessoas, independentemente, para cada parcela, dez dias após a germinação são apresentados no Quadro XXI.

QUADRO XXI - Médias das notas dadas por parcela para os diferentes tratamentos

Tratamentos	Médias	Tratamentos	Médias
1	8,42	7	8,17
2	8,50	8	2,58
3	8,84	9	8,33
4	8,00	10	1,25
5	6,33	11	9,58
6	8,42		

Pelas notas recebidas, os tratamentos podem ser divididos em três grupos, como se segue: a) Notas de 7,5 a 10,0: ótima germinação e desenvolvimento - tratamentos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 11; b) Notas de 4,5 a 7,4: germinação e desenvolvimento médios - tratamentos 5; c) Notas entre 1,0 e 4,4: baixa germinação e mal desenvolvimento - tratamento: 8 e 10.

A severidade de doença causada por Fusarium nos diferentes tratamentos para o experimento nº V, foi calculada tomando-se por base a porcentagem de plantas mortas por parcela. A porcentagem de plantas mortas está representada no quadro XXII.

QUADRO XXII - Porcentagem de plantas mortas para os diferentes tratamentos, no Experimento V

Tratamentos	Repetições				Médias
	1	2	3	4	
1	50,0	63,6	46,7	41,7	50,50
2	69,0	84,6	60,0	78,6	73,05
3	85,7	76,9	83,3	38,5	71,10
4	54,5	69,2	84,6	50,0	64,57
5	0,0	64,3	64,3	50,0	44,65
6	50,0	73,3	92,9	50,0	66,55
7	21,4	71,4	57,1	56,7	51,65
8	0,0	100,0	50,0	0,0	37,50
9	36,4	41,7	75,0	25,0	44,53
11	60,0	92,9	76,9	66,7	74,13

A análise de variância para parte dos dados apresentados no quadro XXII está apresentada no quadro XXIII.

QUADRO XXIII - Análise de variância para os tratamentos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 11.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	1,242,9847	414,3282	4,9680 <sup>++</sup>
Tratamentos	7	1,449,4246	207,0606	2,4828 <sup>+</sup>
9 . 1 + 7 x resto	1	1,305,9752	1,305,9752	15,6593 <sup>++</sup>
9 x 1 + 7	1	36,8032	36,8032	0,4413
1 x 7	1	0,4705	0,4705	0,00056
4 + 6 x 3 + 2 + 11	1	90,4803	90,4803	1,0849
4 x 6	1	7,3728	7,3728	0,0884
3 x 2 + 11	1	5,0968	5,0968	0,0611
2 x 11	1	3,2258	3,2258	0,0012
Resíduo	21	1,751,3821	83,3992	
Total	31	4,443,7914		

Coeficiente de Variação: 15,79%

A análise de variância revelou que os tratamentos 9 e 7, como um todo, diferiram de todos os outros, ao nível de 1% de probabilidade.

Para todos os casos de plantas mortas e também para 30% das plantas vivas foram feitos reisolamentos, sendo obtidas as seguintes porcentagens para os diferentes tratamentos:

1 - 89,3%	5 - 98,0%	9 - 20,4%
2 - 91,3%	6 - 98,5%	10 - 57,1%
3 - 100,0%	7 - 100,0%	
4 - 97,9%	8 - 81,3%	

#### Experimento VI - Teste de Antagonismo "In vitro"

Verificou-se que houve diferentes tipos de inibição do crescimento observados nas placas de petri onde cresciam dois fungos diferentes, na seguinte forma:

1. Formação de uma zona de inibição entre as duas colônias .

O Fusarium parava seu crescimento, enquanto o antagonista continuava a crescer vagarosamente pela zona de inibição.

Neste grupo encontram-se os seguintes fungos: Chaetomium, isolamentos 34, 2, 5, 4, 15, 3, 1, 12, 26, e 24. Os isolamentos que mostravam êste efeito de forma mais marcante eram: 34, 5, 4 e 15.

2. Desenvolvimento do antagonista muito mais rápido que o de Fusarium, com avanço sôbre a colônia de Fusarium: Trichoderma, isolamentos 8, 7 e 9; Chaetomium, isolamentos 6, 29 e 25; Botryodiplodia 18; e Rhizoctonia 14.

3. Contato das colônias, com pequena zona de inibição entre as duas, raleamento da colônia de Fusarium no contato: Penicillium, isolamentos 10, 21 e 28; Lomaantha 17; Epicoccum 11, Macrophomina 23.

4. Sem inibição aparente: Trichoderma 13 e 27; Aspergillus 35, Chaetomium 20 e 19; Cephalosporium 30 e Rhizoctonia 22.

## 6. DISCUSSÃO

No experimento I, verificamos que a população fúngica varia em número, de solo para solo. No solo da série Bairrinho havia muito maior número de colônias de fungos por grama do solo do que nos outros. Êste fato talvez se deva a ser êste o solo que apresenta os maiores valores de capacidade de dupla troca e que oferece, portanto, melhores condições de nutrição para os fungos. Os solos que apresentaram a menor contagem de microrganismos foram aqueles que apresentam também uma menor quantidade de nutrientes, além de texturas predominantemente arenosa, como sejam os das séries Quebra-Dente e Sertãozinho. Segundo BURGESS (1958), quanto mais a-

renoso o solo, menor será a sua população fúngica, ficando o seu valor em tórno de 20.000 colônias por grama de solo.

Os solos das séries Luiz de Queiroz e Tijuco Preto apresentaram contagens intermediárias. Para o solo Luiz de Queiroz, de textura relativamente argilosa, esperar-se-ia um valor maior. Para o caso de Tijuco Preto, o único solo que a presentava uma vegetação artificial, a plantação de *Grevil-**lia* pode ter influenciado na contagem, sendo que provávelmente haveria um aumento de fungos na rizosfera desta planta.

Neste trabalho, de um modo geral, as contagens foram relativamente baixas, provavelmente devido ao fato de terem sido efetuadas na época de inverno. Nesse período do ano há uma forte dissecação do solo aliada a baixas temperaturas, tendo como resultado uma diminuição em número e em atividade dos fungos nos solos, segundo BURGES (1958).

Estipulou-se como a melhor diluição do solo a de  $10^{-3}$ , porque nesta diluição se obtêm de 30 a 130 colônias por placa de petri, fornecendo uma contagem média aproximadamente uniforme para tódas as repetições. A diluição de  $10^{-4}$  oferece uma contagem muito maior, mas em muitos casos aparecem uma ou duas ou mesmo nenhuma colônia por placa, tendo em outras repetições uma contagem de de 10 colônias. Com um número tão baixo o desuniforme seria arriscado tirarem-se conclusões válidas.

Houve variação, ainda, em gêneros de fungos isolados para cada solo, dentre as colônias que puderem ser identificadas. Fica confirmado também, que o método da diluição e, série oferece uma grande porcentagem de fungos de esporulação abundante, conforme exposto por BURGES (1958), MONTÉ-GUT (1960), JOHNSON e outros (1959), GARRET (1963) e inúmer

ros outros autôres.

No experimento II, constatou-se que uma série de diferentes fungos, além do Fusarium, são capazes de penetrar nas plantas de feijoeiro, chegando algumas a percorrer toda a extensão da planta, até o seu ápice, fato este observado por grande série de pesquisadores e confirmadas, para condições semelhantes às deste experimento, por MOSTAFA (1966). Chaetomium é, em geral, isolado das partes mais altas da planta, sendo pouco frequentemente encontrado na base.

Para os diferentes tipos de solo houve diferenças nos gêneros de fungos isolados, porém, algumas espécies de Chaetomium estavam presentes em todos êles. Entre os diferentes isolamentos de Chaetomium, vários eram provavelmente, da mesma espécie, mostrando outras diferenças profundas, provavelmente, suficientes para classificá-lo em espécies diferentes.

O solo da série Sertãozinho não forneceu plantas vivas e sadias no final do experimento. Além da hipótese de não haver, realmente, , fungos capazes de controlar o Fusarium neste solo, outra explicação poderia ser a maior facilidade de disseminação do Fusarium em solos arenosos, conforme relatam SALGADO e outros (1966). Neste caso, talvez a penetração do Fusarium se desse muito rapidamente, antes de haver a oportunidade para a penetração de outros fungos.

No experimento III, nenhum dos fungos utilizados propiciou um controle da doença. Observou-se que, com o método de inoculação usado, a penetração dos três diferentes gêneros se deu em proporções bastante variáveis, de um fungo para outro, porém não havendo grande variação entre a inocu-

lação da semente e a inoculação da plantinha. O Cephalosporium teve uma porcentagem de reisolamento baixíssima, mostrando sua pequena penetração no feijoeiro, em contraposição aos resultados que PATEL(1964) obteve com o mesmo fungo, porém, trabalhando com o algodoeiro.

PATEL (1964) usou o método da imersão para o Cephalosporium, método este utilizado para os três fungos deste experimento. Para o caso do feijoeiro este método não foi considerado de grande utilidade, pois, as plantas se ressentiam excessivamente do tratamento drástico, mostrando-se murchasefracas por vários dias após a inoculação, chegando mesmo algumas a morrer.

No experimento IV chamou atenção o efeito dos diferentes isolamentos de fungos prováveis controladores de Fusarium sobre a germinação das sementes, de feijoeiro. Foi notado que certos isolamentos, Rhizoctonia 22, Aspergillus 35, Botryodiplodia 18, Trichoderma 13 e Trichoderma 8, reduziram a germinação, tomando-se como base a testemunha. Os tratamentos com Curvularia 36 e com Epicoccum 11 também mostraram uma certa redução na germinação, enquanto que todos os outros isolamentos não tiveram um efeito patogênico sobre a germinação das sementes.

Do que foi dito acima, o efeito sobre a germinação não parece ser específico para algum gênero, verificando-se, no entanto, que de quatro isolamentos de Trichoderma usados no experimento, duas se mostraram patogênicas à semente.

O fato de não se notar um efeito patogênico destes fungos na natureza, sendo que ocorrem abundantemente em quase todos os tipos de solo, mas terem mostrado um efeito na germinação durante o experimento provavelmente seria uma

questão de potencial de inóculo. Na concentração em que foram utilizados, para os fungos citados, o potencial de inóculo era suficientemente alto para que estes se mostrassem patogênicos, enquanto na natureza dificilmente ocorria tal concentração do inóculo. Para os outros fungos, que não tiveram efeito sobre a germinação, o inóculo, provavelmente, ainda não atingira a concentração suficiente para estes se mostrarem patogênicos. As condições de umidade e de temperatura, usadas neste experimento, também podem ter sido especialmente favoráveis aos fungos em questão.

Embora certos isolamentos não apresentassem efeito sobre a germinação, o aspecto das plantas desviava-se bastante do normal, mostrando necrose da borda de folhas. 4 tratamentos com Chaetomium, um com Trichoderma e um com Cephalosporium.

Pelo critério subjetivo de notas dadas ao desenvolvimento das plantas, quase todos os tratamentos se situaram entre desenvolvimento bom e razoável; apenas cinco tratamentos, todos com a germinação afetada, tiveram um aspecto fraco.

O estudo do possível controle biológico do Fusarium por outros fungos revelou existir uma diferença significativa entre as porcentagens de morte causada por Fusarium na presença de diferentes fungos, na variedade 6002. Estudando-se os fungos agrupados segundo uma ordem crescente da porcentagem de morte, para os tratamentos que foram analisados, observou-se que os dois isolamentos de Chaetomium, 19 e 29, diferiram significativamente dos demais tratamentos considerados em conjunto. Por outro lado, foi notado um efeito significativo para o controle biológico quando os isolamentos

23 (Macrophomina), 1 e 25 (Chaetomium) foram comparados com os demais, tomados em conjunto. O fato interessante é de que os isolamentos de Chaetomium, analisados, se mostraram melhores fungos controladores que os demais, tendo a Macrophomina também proporcionado um controle intermediário. Como fungos que não apresentaram controle biológico se destacaram os isolamentos de Trichoderma e Cephalosporium.

Os demais tratamentos não foram analisados porque apresentaram uma variação muito grande de uma repetição para a outra, fornecendo dados muito variáveis para uma análise estatística.

Como medida da eficiência do controle biológico dos diferentes fungos para Fusarium foram feitos ~~reisolamentos~~ isolamentos das plantas que morreram e de um terço das plantas vivas no final do experimento. Observou-se que, de modo geral, os isolamentos de Chaetomium foram reisolados numa proporção que variava de 100% a 62%, dando bom controle. Já para Trichoderma, embora a porcentagem de reisolamento fôsse elevada, variando de 95% a 55%, não apresentou controle e Cephalosporium não foi reisolado. Provavelmente, os isolamentos de Cephalosporium não controlaram por não terem penetrado na planta. Para Trichoderma não houve controle embora o fungo estivesse presente. O maior controle foi proporcionado por Chaetomium, sendo reisolado na maior proporção.

Verificou-se que o método da inoculação dos fungos por meio da infestação do substrato foi um bom método, pelo menos para o caso de Chaetomium, Trichoderma e todos aqueles fungos reisolados em alta proporção, não afetando as plantas, como acontecia com o método da inoculação das plantas por imersão.

Para o experimento V as considerações a fazer seriam as mesmas que foram feitas para o experimento IV.

Quanto à germinação, verificamos que para o tratamento 10, inoculado com Penicillium 28, praticamente não houve germinação, pois quase tôdas as sementes foram apodrecidas pelo fungo antes da germinação. Houve, também, baixa germinação para o tratamento 8, inoculado com Trichoderma 9. Pela análise de variância, os tratamentos 1 e 7 (Chaetomium 2 e 33) e o tratamento 9 (Rhizoctonia 14), como um todo, diferiram dos outros tratamentos analisados, tomados em conjunto. Neste caso, para a variedade 6003, dois isolamentos de Chaetomium e um de Rhizoctonia foram os que apresentaram melhor contrôle. Os outros isolamentos de Chaetomium não mostraram eficiência no contrôle.

Uma vêz que os reisolamentos para todos os isolamentos de Chaetomium foram elevados, para todos êstes houve boa penetração nas plantas, mas apenas a presença de dois dêles influenciou a ação do Fusarium. Portanto, não seria a simples presença de Chaetomium que impediria a ação do Fusarium, mas provàvelmente alguma substância química produzida por alguns dêstes isolamentos, talvez agindo sôbre a planta, como demonstrado por RODEBAUGH (1964) para o caso de Cephalosporium em tomateiro, MOSTAFA (1966) sugere que a ação de Chaetomium no contrôle biológico seja devido a substâncias difusíveis produzidas por êstes fungos e que reduzem o crescimento do Fusarium.

Para o Experimento VI, verifica-se que diferentes isolamentos do mesmo gênero e de gêneros diferentes reagem de maneira diferente, quando em presença do Fusarium, na mesma placa de petri. Puderam ser encontrados três diferentes

tipos de antagonismo, classificados de acôrdo com JOHNSON e outros (1959). Verifica-se que a ação dos fungos "IN vitro" não corresponde ao seu comportamento "IN vivo". Dos fungos que mostraram antagonismos em placas de petri, apenas alguns foram eficientes no contrôle de Fusarium, quando inoculados nas plantas. O isolamento 19 de Chaetomium não mostrou nenhum antagonismo ao Fusarium "IN vitro" mas foi um ótimo controlador dêste na planta.

## 7. CONCLUSÕES

1. O método da infestação do substrato com os fungos inibidores mostrou-se mais eficiente no contrôle do Fusarium que o da imersão das raízes em uma suspensão de esporos daqueles fungos.

2. Todos os fungos isolados do feijoeiro e prováveis inibidores de Fusarium sobrevivem, pelo menos, por 15 meses em solo esterilizado.

3. O solo da série Bairrinho apresenta uma maior população fúngica do que os solos das séries Luiz de Queiróz, Tijuco Preto, Monte Olimpo, Quebra-Dente e Sertãozinho.

4. Três isolamentos de Trichoderma, um de Aspergillus, um de Botryodiplodia, um de Rhizoctonia e um de Penicillium, embora não considerados patogênicos ao feijoeiro, reduziram a germinação de sementes, nas condições do experimento.

5. Cinco isolamentos de Chaetomium, um de Macrophoma e um de Rhizoctonia mostraram-se capazes de diminuir a incidência da Murcha de Fusarium do feijoeiro, quando comparados com os outros tratamentos.

6. Culturas de Cephalosporium isoladas de algodoeiro e de tomateiro não penetraram no feijoeiro.

7. As reações de antagonismo ao Fusarium obtidas "IN vitro" não corresponderam à ação dos fungos prováveis inibidores de Fusarium quando inoculados nas plantas de feijoeiro.

## 8. RESUMO

Fêz-se um levantamento da população fúngica de seis séries de solos do Município de Piracicaba. Com o auxílio do feijoeiro, destes solos foram extraídos alguns fungos, os quais foram testados como inibidores de Fusarium oxysporum f. phaseoli.

Alguns destes fungos quando usados na infestação do substrato da semente, mostraram-se patogênicos à semente, nas condições dos experimentos. Cinco isolamentos de Chaetomium spp., 1 de Rhizoctonia sp. e um de Macrophomina sp. mostraram-se capazes de diminuir a incidência da Murcha de Fusarium do Feijoeiro. Dos métodos de inoculação usados para os fungos testados como controladores do Fusarium mostrou-se mais eficiente o da infestação do substrato do que o da imersão de raízes das plantas em suspensão dos fungos.

Obtiveram-se vários tipos de inibição do Fusarium pelos outros fungos "IN vitro". As reações obtidas "IN vitro" não corresponderam à ação dos fungos no feijoeiro.

## 9. SUMMARY

Six different soil series of Piracicaba were analysed for their fungal populations. Some fungi of these soils, isolated from bean seedlings planted in the soils, were tested for their capacity in inhibiting Fusarium oxysporum f. phaseoli.

Some of these fungi, when they were used for soil infestation before sowing bean seeds, diminished the percentage of germination, under the experimental conditions. Five isolates of Chaetomium spp., one of Rhizoctonia sp. and one of Macrophomina sp. were able to diminish the incidence of the Fusarium wilt of beans. Of the inoculation methods used in the experiments; the infestation of the substrate was more efficient than the dipping of seedlings in the inoculum suspensions.

Some different types of inhibition were obtained when Fusarium and the other fungi were cultivated "in vitro" on the same petri dish. The "in vitro" reactions do not correspond to the action of the fungi when inoculated in plants.

10. BIBLIOGRAFIA

- ALLISON, C.C. e D.V.PHILLIPS, 1963. In Vivo Selection of Bio-  
types of Cephalosporium Inhibitory to the Develop-  
ment of Tomato and Cotton Fusarium Wilt Symptoms.  
Phytopathology 53:869 (Abstract)
- BARNETT, H.L., 1955. Illustrated Genera of Imperfect Fungi -  
Burgess Publishing Co. - Minneapolis - U.S.A.:218 p.
- BEDI, P.S., 1966. Studies on the Biological Control of Verti-  
cillium Wilt of Okra. Tese de "Doctor of Philoso-  
phy" apresentada na Ohio State University: 43 pp.
- BURGES, A., 1958. Micro-Organisms in the Soil. Hutchinson U-  
niversity Library:188 pp.
- CAMPBELL, W.P., 1956. The Influence of Associated Microor-  
ganisms on the Pathogenicity of Helminthosporium.  
Canadian Journal of Botany 34:865-874.
- CARDOSO, C.O.N., 1967. Contribuição ao Estudo das Relações  
entre Fusarium oxysporum f.phaseoli (Schlecht)  
Kendr. e Snyder, e Phaseolus vulgaris L. Tese de "Ma-  
gister Scientiae" apresentada na E.S.A."Luiz de  
Queiróz" - Piracicaba: 48 pp.
- CHISLER, J.A., G.E.SMITH, M.R.MENON e C.C.ALLISON, 1962.  
Symptom Retardation of Fusarium Wilt of Tomato See-  
dlings by a Cephalosporium species. Phytopathology  
52:728 (Abstract).
- CUMMINGS, J., 1954. Antagonistic Activity of Chaetomium glo-  
bosum Against Fungi. Mycologia 46:289-292.
- DAVIS, D., 1964. Cross-protection of Fusarium Wilt Suscept  
With Eight Formae Speciales of Fusarium oxysporum.  
Phytopathology 54:891 (Abstract).
- FRED, E.B. e S.A.WAKSMAN, 1928. Laboratory Manual of General  
Microbiology. McGraw-Hill Book Co. New York.145 pp.
- GARRET, S.D., 1963. Soil Fungi and Soil Fertility. Pergamon  
Press e MacMillan Co. 165 pp.

- GARRET, S.D., 1965. Toward Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens. In Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens. K.F. Baker e W.C.Snyder. University of California Press. 571 pp.
- GILMAN, J.C., 1957. A Manual of Soil Fungi. The Iowa State College Press-Ames, Iowa, U.S.A. 450 pp.
- GOMES, F.P., 1966. Curso de Estatística Experimental, 3a. Edição, USP- E.S.A."Luiz de Queiroz" - Piracicaba - 404 pp.
- JACKSON, C.R., 1965. Reduction of Sclerotium bataticola Infection of Peanut Kernels by Aspergillus flavus. Phytopathology 55:934.
- JOHNSON, L.F., E.A.CURL, J.H.BOND e H.A.FRIBOURG, 1959. Methods for Studying Soil Microflora - Plant Disease Relationships. Burgess Publishing Co. Minneapolis . 172 pp.
- KAUFMAN, D.D. e L.E.WILLIAMS, 1963. Effect of the Carbon: Nitrogen Ratio on Soil Fungi. Phytopathology 53: 956-960.
- KAUFMAN, D.D. e L.E.WILLIAMS, 1964. Effect of Mineral Fertilization and Soil Reaction on Soil Fungi. Phytopathology 54:134-139.
- KAUFMAN, D.D., L.E.WILLIAMS e C.B.SUMMER, 1963. Effect of Planting Medium and Incubation Temperature on Growth of Fungi in Soil-Dilution Plates. Canadian Journal of Microbiology 9:741-751.
- LONG, D.W., 1963. Inhibition of Fusarium Wilt Symptoms in Cowpea by Species of Cephalosporium. Phytopathology 53:881 (Abstract)
- MALAVOLTA, E. e H.P.HAAG, 1964. Curso Internacional de Diagnose Foliar. IICA. E.S.A."Luiz de Queiroz" - Piracicaba. Mimeografado 5 pp.
- MARTIN, J.P., 1950. Use of Acid, Rose Bengal and Streptomycin in the Plate Method for Estimating Soil Fungy. Soil Science 134:1528-1529.

- MENON, S.K. e L.E.WILLIAMS, 1957. Effect of Crop, Crop Residues, Temperature, and Moisture on Soil Fungi. *Phytopathology* 47:559-564.
- MONTÉGUT, J., 1960. Value of the Dilution Method. In the *Ecology of Soil Fungi*. Editado por D.Parkinson e J. S. Waid. Liverpool University Press. 324 pp.
- MOSTAFA, A.M., 1966. Studies on the Control of Vascular Wilt Diseases of Cotton by Fungi Associated With the Cotton Plant. Tese de "Doctor of Philosophy" apresentada na Ohio State University. 37 pp.
- MWANZA, N.P., 1964. Effect of Cephalosporium Isolates on Fusarium Wilt of Seedlings of Three Tomato Varieties. Tese de "Magister Scientiae" apresentada na Ohio State University. 51 pp.
- PATEL, Manjoola S., 1964. Inhibition of Fusarium Wilt of Cotton by Isolates of Cephalosporium Species. Tese de "Magister Scientiae" apresentada na Ohio State University. 41 pp.
- PORTER, C.L., 1924. Concerning the Characters of Certain Fungi as Exhibited by Their Growth in the Presence of Other Fungi. *American Journal of Botany* 11:168-188.
- RANZANI, G., O.FREIRE Le T.KINJO, 1966. Carta de Solos do Município de Piracicaba. E.S.A."Luiz de Queiróz" - Piracicaba. 85 pp.
- RODEBAUGH, J.E., 1964. Effect of Cephalosporium on Several Biochemical Aspects of Fusarium Wilt in Resistant and Susceptible Tomato Plants. Tese de "Doctor of Philosophy" apresentada na Ohio State University. 41 pp.
- ROY, Ira e Manjola PATEL, 1963. Prevention of Symptom Development of Fusarium Wilt of Cotton by Isolates of Cephalosporium Species. *Phytopathology* 53:887 (Abstract).

- SALGADO, C., E.CIA, E.BALMER, A.R.MONTEIRO e C.P.de ABREU, 1966. Influencia da Porcentagem de Areia no Solo e Meloidogyne incognita (Kofoid e White) Chitwood sobre a Incidência de Murcha de Algodoeiro Causada por Fusarium oxysporum f.vasinfectum (Atk.) Snyder e Hansen. Anais da E.S.A, "Luiz de Queiróz" 23:311-323.
- SCHMITTHENNER, A.F. e L.E.WILLIAMS, 1958. Methods for Analysis of Soil-Borne Pathogens and Associated Soil Fungi. Botany e Plant Pathology Mineo. Series nº29-1: 19.
- SMITH, G.E., 1957. Inhibition of Fusarium oxysporum f.lycopersici by species of Micromonospora Isolated from Tomato. Phytopathology 47:429-432.
- STEEL, G.D. e J.H.TORRIE, 1960. Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Book Co., Inc. 426 pp.
- TVEIT, M. e M.B.MOORE, 1954. Isolates of Chaetomium that Protect Oats from Helminthosporium victoriae. Phytopathology 44:686-689.
- TVEIT, M. e R.K.S.WOOD, 1955. The Control of Fusarium Blight in Oat Seedlings With Antagonistic Species of Chaetomium. The Annals of Applied Biology 43:538-552.
- WAKSMAN, S.A. e Elizabeth BUGIE, 1944. Chaetomium, a New Antibiotic Substance Produced by Chaetomium cochliodes. Journal of Bacteriology 48:527-530.
- WARCUP, J.H., 1950. The Soil-Plate Method for Isolation of Soil Fungi from Soil. Nature 166:117-118.
- WEINDLING, R., 1932. Trichoderma lignorum as a Parasite of Other Soil Fungi. Phytopathology 22:837-845
- WEINDLING, R., 1941. Experimental Consideration of The Mold Toxins of Gliocladium and Trichoderma. Phytopathology 31:991-1003.
- WEINDLING, R., 1946. Microbial Antagonism and Disease Control. Soil Science 61:23-30.

- WEINDLING, R. e H.S.FAWCETT, 1936. Experiments in The Control of Rhizoctonia Damping-off of Citrus Seedlings. Hilgardia 10:1-16.
- WILLIAMS, L.E. e A.F.SCHMITTHENNER, 1956. Genera of Fungi in Ohio Soils. Ohio Agricultural Experiment Station Research Circular 39, 7 pp.
- WILLIAMS, L.E. e A.F.SCHMITTHENNER, 1960. Effect of Growing Crops and Crop Residues on Soil Fungi and Seedling Blights. Phytopathology 50:22-25.
- WILLIAMS, L.E. e A.F.SCHMITTHENNER, 1962. Effect of Crop Rotation on Soil Fungus Populations. Phytopathology 52:241-247.
- WOOD, R.K.S. e M.TVEIT, 1955. Control of Plant Diseases by Use of Antagonistic Organisms. The Botanical Review 21:441-492.

## 11. AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Ferdinando Galli, pela orientação e pela revisão dos originais;

aos Professores Dr. E. Balmer e Dr. H. Campos pelas sugestões e críticas nos trabalhos de análise estatística;

aos Professores Dr. H. Tokeshi, Dr. E. Balmer e Dr. C. C. Allison, pelo fornecimento de alguns isolamentos de fungos utilizados neste trabalho;

ao meu marido e colega Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> C. O. N. Cardoso pelo fornecimento de culturas de fungos e pela revisão e sugestões no trabalho.

aos Professores Dr. H. Tokeshi, Dr. P. C. T. Carvalho e Dr. C. C. Allison, assim como aos colegas Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> H. Kimati e Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> C. Salgado por sugestões;

aos estudantes P. F. Aragão e K. Minami assim como ao colega Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> N. G. Fernandes, bolsistas da Cadeira de Fitopatologia da ESALQ, pela ajuda nos trabalhos realizados.

ao convênio USAID/B-OSU/ESALQ pela bolsa concedida;

à Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, à Fundação Rockefeller e à Aliança Para o Progresso, pelos recursos que, em diferentes oportunidades, forneceram à Cadeira de Fitopatologia e que permitiram o desenvolvimento do presente trabalho;

a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.