

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Bipolaris sorokiniana* Sacc. ex
Sorok. EM SEMENTES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

MARIA NENMAURA GOMES PESSOA

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1993

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

Pessoa, Maria Nenmaura Gomes

P475c Controle biológico de *Bipolaris sorokiniana* Sacc. ex. Sorok. em
sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.)

Piracicaba, 1993

134 p. ilus.

Tese - ESALQ

Bibliografia.

1. Fungo fitopatogênico 2. Podridão comum da raiz do trigo -
Controle biológico 3. Trigo - Semente - Doença I. Escola
Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba

CDD 633.11
632.44

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Bipolaris sorokiniana* Sacc. ex
Sorok. EM SEMENTES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

MARIA NENMAURA GOMES PESSOA

Aprovada em: 27.09.1993

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN	ESALQ/USP
Prof. Dr. HIROSHI KIMATI	ESALQ/USP
Prof. Dr. TASSO LÉO KRÜGNER	ESALQ/USP
Dr. BENEDITO DE CAMARGO BARROS	IB/SP
Dr. JACIRO SOAVE	IAC


Prof. Dr. JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN

Orientador

À memória de meu querido pai, FRANCISCO GOMES,
pelo exemplo de amor e dedicação extremada.

À minha mãe, MARIA, e à minha
tia CREUZA, pelo carinho e apoio;
aos meus irmãos EVERARDO E NEURIMÁ

Ofereço

Ao querido esposo EDILBERTO
pelo afeto, compreensão e ajuda
constante, e à nossa filha,
ANA CECÍLIA,

Dedico

À

Professora Dr^a MARIA MENEZES, da
Universidade Federal Rural de Pernambuco,
pelos ensinamentos, apoio e incentivo no
decorrer da minha vida profissional,

Minha Homenagem

AGRADECIMENTOS

A autora agradece:

À Universidade Federal do Ceará (UFC), pela oportunidade concedida ao seu aprimoramento profissional;

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelas facilidades oferecidas durante a realização deste curso;

Em especial, ao Prof. Dr. JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN, pela segura e valiosa orientação, estímulo e constante demonstração de amizade;

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia da ESALQ e aos seus professores, pelos ensinamentos, pelo constante apoio e amizade;

Aos Professores Drs. TASSO LÉO KRÜGNER e IVAN PAULO BEDENDO, pela valiosa revisão crítica dos originais;

Ao Professor Dr. HIROSHI KIMATI pelos esclarecimentos e ajuda prestados;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES,
pelo auxílio concedido;

Aos Drs. BENEDITO DE CAMARGO BARROS da Seção de Doenças das
Plantas Alimentícias Básicas e Olerícolas-IB, São Paulo e AUGUSTO CESAR P.
GOULART, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - UEPAE Dourados,
pelo fornecimento das sementes utilizadas;

Aos Drs. WILMAR CÓRIO DA LUZ, do Centro Nacional de Pesquisa de
Trigo-CNPT/EMBRAPA, Passo Fundo-RS, MARIA MENEZES e ROSA MARIA
RAMOS MARIANO da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Recife-
PE, pelo fornecimento dos isolados de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp. (T₁₁, T₁₄,
T₂₅ e TR₃) e *Pseudomonas* spp. respectivamente. À DANIELA BIAGGIONI LOPES,
aluna do Curso de PG em Fitopatologia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP, pelo
fornecimento do isolado T_{sol}o;

À Prof. Dra. MARIA JOSÉ DOS SANTOS FERNANDES, do Departamento
de Micologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela identificação das
espécies do gênero *Trichoderma*;

À bibliotecária KATIA MARIA DE ANDRADE FERRAZ da ESALQ/
USP, pela normatização das referências bibliográficas;

Ao Prof. Dr. CARLOS TADEU DOS SANTOS DIAS, do Departamento de Bioestatística, UNESP/Botucatu, pela colaboração nas análises estatísticas;

Ao Eng^o Agr^o Dr. ANTONIO DE GÓES, colega do Curso de PG em Fitopatologia, pelas sugestões dadas;

Ao colegas do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela amizade;

Ao Prof. Dr. HASIME TOKESHI pela amizade e ensinamentos;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, especialmente, PEDRO DA SILVA, JOSÉ EDIVALDO BURIOLLA e MARINA APARECIDA G. PAVAN, pela dedicação e presteza;

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse realizado;

A Deus, em especial, pois nada me teria sido dado se não fosse a vontade do Senhor.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Sanidade de sementes de trigo em relação a <i>Bipolaris sorokiniana</i>	4
2.2. Tratamento de sementes com microrganismos antagonistas visando o controle de fitopatógenos.....	7
2.3. Efeito de antagonistas fúngicos e bacterianos sobre <i>B. sorokiniana</i>	10
2.4. Efeito de fungicidas sobre microrganismo antagonistas.....	18
2.5. Eficiência de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>B. sorokiniana</i> através de diferentes modos de aplicação.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Determinação da incidência de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo....	27
3.2. Efeito de microrganismos antagonistas sobre <i>B. sorokiniana</i> "in vitro" e associado a sementes de trigo.....	29
3.2.1. Seleção "in vitro" de antagonistas a <i>B. sorokiniana</i>	29

3.2.1.1. Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>B. sorokiniana</i> in vitro".....	31
3.2.1.2. Antagonismo de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Pseudomonas</i> spp. a <i>B. sorokiniana</i> "in vitro".....	32
3.2.1.3. Compatibilidade "in vitro" de antagonistas fúngicos e bacterianos.....	34
3.2.2. Efeito de antagonistas sobre a incidência de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo.....	34
3.2.3. Avaliação da severidade de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo.	36
3.2.4. Determinação da viabilidade de conídios de <i>B. sorokiniana</i> em B.D.A.....	38
3.2.5. Efeito de antagonistas no controle de <i>B. sorokiniana</i> associado a sementes de trigo em B.D.A.....	38
3.3. Efeito de antagonistas sobre <i>B. sorokiniana</i> associado a sementes de trigo em câmara de crescimento.....	40
3.4. Efeito do tratamento químico e biológico, isolados ou em combinação, no controle de <i>B. sorokiniana</i>	44
3.4.1. Comportamento dos antagonistas e de <i>B. sorokiniana</i> em relação ao fungicida iprodione + thiram "in vitro".....	44
3.4.1.1. Sensibilidade de <i>Trichoderma harzianum</i> (T25 e TC) e <i>B. sorokiniana</i> "in vitro".....	44

3.4.1.2. Sensibilidade de <i>B. subtilis</i> (39/89.19.2) e <i>Pseudomonas fluorescens</i> (P2) "in vitro".....	46
3.4.2. Eficiência dos antagonistas e de iprodione + thiram, isolados ou em combinação, no controle de <i>B. sorokiniana</i> associado a sementes de trigo.....	47
3.5. Eficiência de <i>T. harzianum</i> (T25 e TC) no controle de <i>B. sorokiniana</i> através de diferentes modos de aplicação do antagonista.....	50
3.5.1. Aplicação de suspensão de esporos.....	50
3.5.2. Aplicação em substrato de farelo de arroz.....	51
3.5.3. Avaliação da viabilidade do substrato	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1. Determinação da incidência de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo.....	54
4.2. Efeito de antagonistas sobre <i>B. sorokiniana</i> "in vitro" e associado a sementes de trigo.....	56
4.2.1. Seleção "in vitro" de antagonistas contra <i>B. sorokiniana</i>	56
4.2.2. Compatibilidade "in vitro" de antagonistas fúngicos e bacterianos	60
4.2.3. Efeito de antagonistas sobre a incidência e severidade de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo.....	62
4.2.4. Viabilidade de conídios de <i>B. sorokiniana</i> , isolados de sementes de trigo tratadas com suspensão de <i>T. harzianum</i> , em B.D.A.....	66
4.2.5. Efeito de antagonistas sobre <i>B. sorokiniana</i> associado a sementes de trigo em B.D.A.....	68

4.3. Efeito de antagonistas sobre <i>B. sorokiniana</i> associado a sementes de trigo em câmara de crescimento.....	70
4.4. Efeito do tratamento químico e biológico, isolados ou em combinação no controle de <i>B. sorokiniana</i>	75
4.4.1. Sensibilidade de <i>T. harzianum</i> (T25 e TC) e <i>B. sorokiniana</i> a iprodione + thiram "in vitro".....	75
4.4.2. Sensibilidade de <i>B. subtilis</i> (39/89.19.2) e <i>P. fluorescens</i> (P2) a iprodione + thiram "in vitro".....	78
4.4.3. Eficiência de antagonistas e iprodione + thiram, isolados ou em combinação, no controle de <i>B. sorokiniana</i> associado a sementes de trigo.....	79
4.5. Eficiência de <i>T. harzianum</i> (T25 e TC) no controle de <i>B. sorokiniana</i> , por diferentes modos de aplicação do antagonista.....	84
4.5.1. Avaliação da eficiência de <i>T.harzianum</i> através de diferentes modos de aplicação sobre a emergência de plântulas e transmissão de <i>B. sorokiniana</i>	84
4.5.2. Avaliação da viabilidade do substrato colonizado por <i>T.harzianum</i>	88
5. DISCUSSÃO.....	89
5.1. Determinação da incidência de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de diferentes cultivares de trigo.....	89
5.2. Efeito de antagonistas sobre <i>B. sorokiniana</i> "in vitro" e associado a sementes de trigo.....	91

5.3. Efeito de antagonistas sobre <i>B. sorokiniana</i> associado a sementes de trigo em câmara de crescimento.....	96
5.4. Eficiência do tratamento químico e biológico, isolados ou em combinação, no controle de <i>B. sorokiniana</i> (em sementes de trigo).....	99
5.5. Eficiência de <i>T. harzianum</i> (T25 e TC) no controle de <i>B. sorokiniana</i> através de diferentes métodos de aplicação.....	104
6. CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Efeito de <i>Bacillus subtilis</i> (39/89.19.2) e <i>Pseudomonas fluorescens</i> (P2) sobre o crescimento micelial "in vitro" de <i>Trichoderma harzianum</i> (T25 e TC) e <i>Bipolaris sorokiniana</i>	61
---	----

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Microrganismos testados quanto à habilidade antagônica a <i>B. sorokiniana</i>	30
Tabela 2. Escala de notas de severidade de <i>B. sorokiniana</i> associado a sementes de trigo 'BR-20', após submetidas ao teste de sanidade pelo método do congelamento.....	37
Tabela 3. Características químicas dos solos utilizados.....	41
Tabela 4. Incidência de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de diferentes cultivares de trigo provenientes dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.....	54
Tabela 5. Efeito de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o crescimento micelial de <i>B. sorokiniana</i> "in vitro".....	56
Tabela 6. Efeito de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Pseudomonas</i> spp. sobre o crescimento micelial de <i>B. sorokiniana</i> "in vitro".....	58
Tabela 7. Incidência e severidade de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo 'BR-20' tratadas com diferentes antagonistas e iprodione + thiram.....	64

Tabela 8. Análise de correlação entre incidência e severidade de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo, para os antagonistas estudados.....	66
Tabela 9. Efeito do tratamento de sementes de trigo com suspensão de <i>T. harzianum</i> , sobre a germinação de conídios de <i>B. sorokiniana</i> e recuperação do antagonista em B.D.A.....	67
Tabela 10. Efeito de antagonistas e tratamento químico no controle de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo 'BR-20' em B.D.A.....	68
Tabela 11. Efeito de antagonistas no controle de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo, determinado através do número de plântulas saudias, doentes e mortas, e de sementes não germinadas em B.D.A.....	69
Tabela 12. Efeito de substratos (solo natural e autoclavado) sobre a transmissão de <i>B. sorokiniana</i> , emergência, altura e peso de plântulas de trigo 'BR-20' em câmara de crescimento.....	71
Tabela 13. Comparação de médias para o efeito de antagonistas e iprodione + thiram sobre a transmissão de <i>B. sorokiniana</i> , emergência altura e peso de plântulas em solo natural (SN) e solo autoclavado (SA).....	72
Tabela 14. Teste de velocidade de emergência com sementes de trigo 'BR-20' tratadas com antagonistas fúngicos e bacterianos em diferentes tipos de solo.....	74

Tabela 15. Médias, em cm, para o diâmetro das colônias de <i>T.harzianum</i> (T25 e TC), <i>B.sorokiniana</i> e do variante TC100 em diferentes concentrações de iprodione + thiram.....	76
Tabela 16. Sensibilidade de <i>B.subtilis</i> (39/89.19.2) e <i>P.fluorescens</i> (P2) a diferentes concentrações de iprodione + thiram "in vitro", avaliada através do halo de inibição (em cm).....	78
Tabela 17. Efeito de antagonistas e diferentes doses de iprodione + thiram sobre a transmissão de <i>B.sorokiniana</i> e emergência em plântulas de trigo 'BR-20'	80
Tabela 18. Frequência (%) de <i>T.harzianum</i> em raízes e mesocótilo de plântulas de trigo, oriundas de sementes tratadas com o antagonista, em doses crescentes de iprodione + thiram, após incubação em câmara úmida.....	84
Tabela 19. Efeito do modo de aplicação de <i>T. harzianum</i> (T25 e TC) sobre a emergência de plântulas e taxa de transmissão de <i>B. sorokiniana</i> , em câmara de crescimento.....	84
Tabela 20. Avaliação da eficiência de diferentes modos de aplicação de <i>T.harzianum</i> na transmissão de <i>B. sorokiniana</i>	87

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Bipolaris sorokiniana* SACC. EX SOROK. EM
SEMENTES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.).

Autor: MARIA NENMAURA GOMES PESSOA

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN

RESUMO

Sementes de quatro cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), procedentes dos Estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo, foram analisadas para determinar a incidência de *Bipolaris sorokiniana*, usando o método de papel de filtro com congelamento. *B. sorokiniana* foi o fungo mais frequente, com incidência variando de 0,5 a 92,5%. Outros organismos foram detectados em menor frequência.

A avaliação da atividade antagonística, "in vitro", de *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp. e *Bacillus subtilis* contra *B. sorokiniana* foi efetuada pelo método de culturas pareadas em placas de Petri contendo BDA, para *Trichoderma*, e pelo método do funil, para *Pseudomonas* e *Bacillus*. Os isolados de *T.harziianum* (T25 e TC), *P. fluorescens* (P2) e *B. subtilis* (39/89.19.2) foram os mais eficientes. Os isolados T25, TC, 39/89.19.2 e P2, aplicados no tratamento de sementes de trigo 'BR-20', controlaram a incidência e severidade de *B. sorokiniana* em laboratório e a

transmissão em condições de câmara de crescimento. Os isolados T25 e TC foram os mais eficientes no controle da doença, quando aplicados às sementes, com resultados semelhantes ao do fungicida padrão iprodione + thiram. *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2) também demonstraram atividade antagônica, reduzindo significativamente a transmissão do patógeno em sementes tratadas. O efeito inibidor de iprodione + thiram, a 1, 10, 50 e 100 ppm de ingrediente ativo, avaliado em relação ao crescimento dos microrganismos antagonistas "in vitro" demonstrou que *P. fluorescens* (P2) e *T. harzianum* (TC100) foram os mais tolerantes. Tolerância ao fungicida foi também verificada para T25, TC e *B. subtilis* (39/89.19.2) nas concentrações mais baixas. Iprodione + thiram aumentou a atividade dos antagonistas testados, quando aplicado, em combinação, nas sementes. A análise de variância indicou uma interação não significativa para antagonistas x fungicida, no entanto, foi demonstrado que o controle do patógeno por *T. harzianum* e iprodione + thiram foi sinérgico bem como para *P. fluorescens* a 25, 50 e 100% da dose do fungicida recomendado, observando-se um efeito antagônico ou aditivo para *B. subtilis* aplicado em combinação com o fungicida.

Diferentes métodos de aplicação de *T. harzianum* (T25 e TC), mostraram que o tratamento de sementes, com suspensão de conídios e do solo com preparações de farelo de arroz, controlaram a transmissão do patógeno de modo tão efetivo quanto o tratamento com iprodione + thiram.

BIOLOGICAL CONTROL OF *Bipolaris sorokiniana* SACC. EX SOROK.
IN WHEAT SEEDS (*Triticum aestivum* L.)

Author: MARIA NENMAURA GOMES PESSOA

Adviser: PROF. DR. JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN

SUMMARY

Seeds of four wheat cultivars (*Triticum aestivum*, L.) from Mato Grosso do Sul and São Paulo States, were analysed to determine the incidence of *Bipolaris sorokiniana*, using the deep-freezing test. *B. sorokiniana* was the more frequent fungus with incidence of 0,5% to 92,5%. Other organisms were detected, although at lower frequency.

The evaluation of "in vitro" antagonistic activity of *Trichoderma* spp., for *Pseudomonas* spp. and *Bacillus subtilis* isolates against *B. sorokiniana* was conducted using the method of paired cultures in Petri dishes with P.D.A. for *Trichoderma* isolates, and the glass funnel method *Pseudomonas* and *Bacillus*. *T. harzianum* (T25 and TC), *B. subtilis* (39/89.19.2) and *P.fluorescens* (P2) were the most efficient isolates. The T25, TC, 39/89.19.2 and P2 isolates applied in seed

treatment of wheat cultivar BR-20, controlled the incidence and severity of *B. sorokiniana* in laboratory, and the transmission at growth room conditions. The isolates T25 and TC showed the most effective control when applied to seeds, with similar results to the standard iprodione + thiram fungicide. *B. subtilis* (39/89.19.2) and *P. fluorescens* (P2) also demonstrated a relative antagonistic activity, reducing significantly the pathogen transmission of treated seeds. The inhibitory effect of iprodione + thiram at 1, 10, 50 and 100 ppm of active ingredient evaluated in relation to the growth of antagonistic microorganisms *in vitro* revealed that *P. fluorescens* and *T. harzianum* (TC100) were the most tolerant. Tolerance to this fungicide was verified for T25, TC and *B. subtilis* (39/89.19.2), at the lower concentrations. Iprodione + thiram enhanced the activity of the antagonists tested, when applied in combination to the seeds. Analysis of variance indicated a no significant antagonists x fungicide dosage interaction, however it was demonstrated that disease control by *T. harzianum* and iprodione + thiram was synergistic. The same effect was detected for *P. fluorescens* at 25, 50 e 100% of the fungicide dosage recommended, while it was observed antagonistic or additive effects by *B. subtilis* when applied in combination with this chemical.

The different methods of application of *T. harzianum* (T25 and TC), showed that seed treatment with conidial suspensions and soil treatment with rice-bran preparations controlled the pathogen transmission as effectively as the iprodione + thiram treatment.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.), no Brasil, apresenta uma baixa produtividade devido, entre outros fatores, à incidência de doenças. Dentre estas destacam-se as ocasionadas pelo fungo *Bipolaris sorokiniana* Sacc. ex. Sorok. (Sin. *Helminthosporium sativum* P.K. & B. e *Drechslera sorokiniana* Sacc. ex. Sorok.), forma conidial de *Cochliobolus sativus* Ito & Kuribay, que afetam os órgãos aéreos e radiculares do trigo, causando a helmintosporiose ou mancha marrom e podridão comum das raízes, respectivamente.

O patógeno encontra-se difundido nas principais regiões tritícolas do país, sendo relatado nos Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Distrito Federal (CARDOSO & KIMATI, 1980; LUZ, 1982).

Os danos provocados pela podridão comum das raízes têm sido reportados por diversos autores (REIS, 1982; DIEHL et al., 1985; VECHIATO et

al., 1987; NASSER, 1987). No Estado de São Paulo, essa doença pode acarretar sérios prejuízos, a depender das condições climáticas e suscetibilidade das cultivares utilizadas, sobretudo, na região sul do Estado, normalmente mais úmida, estando sujeita a epidemias por este agente.

A associação fungo-semente pode causar reduções de germinação e vigor, além da morte de sementes e plântulas. A transmissibilidade do fungo através das sementes, permite o estabelecimento de focos de infecção no campo a partir dos quais originam-se os ciclos secundários da doença (FORCELINI et al., 1989), motivo pelo qual *B. sorokiniana* é considerado o mais importante patógeno associado a sementes de trigo e normalmente alvo principal do tratamento de sementes (FORCELINI, 1991).

O emprego de fungicidas tem sido a forma mais frequente de controle de *B. sorokiniana* em sementes de trigo infectadas (BARROS et al., 1982; REIS, 1982). Apesar de eficiente, esta medida nem sempre compensa os custos devidos, nem elimina totalmente o inóculo na semente, podendo ainda promover alterações prejudiciais à população microbiana do solo. Portanto, o sucesso no controle de doenças em lavouras de trigo poderá estar na dependência da utilização de um conjunto de práticas, uma vez que a adoção de uma medida isolada, dificilmente atinge o nível de controle desejado.

Um dos mais novos processos de tratamento de sementes contra patógenos, tem sido o controle biológico com microrganismos antagônicos, podendo constituir uma boa alternativa, principalmente quando o objetivo for o controle integrado.

Alguns trabalhos demonstraram a possibilidade de se encontrar agentes microbianos com potencial antagônico a *B. sorokiniana* (ANWAR, 1949; CAMPBELL, 1956; BILES & HILL, 1988; LUZ, 1990; PESSOA et al., 1991); *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas* spp. despontam como os mais promissores.

Com base nessas considerações, foi desenvolvido o presente estudo que teve como principais objetivos: selecionar microrganismos antagônicos eficientes para controle de *B. sorokiniana* em sementes de trigo, isolados ou em combinação com o fungicida padrão (iprodione + thiram); uma vez selecionado o mais eficaz, determinar um método viável e prático de aplicação deste antagônico para tratamento de sementes de trigo.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sanidade de sementes de trigo em relação a *Bipolaris sorokiniana*

Os danos ocasionados por fungos a sementes de trigo, têm sido reconhecidos em diversas partes do mundo (NEERGAARD, 1979; NOBLE & RICHARDSON, 1979) inclusive no Brasil (LUZ et al., 1976; GOULART & PAIVA, 1993; REIS, 1987). Segundo NASSER (1987) e REIS (1988), a maioria destes organismos é transmitida através de sementes, causando apodrecimento, baixa germinação, baixa emergência, podridões radiculares e redução de densidade de plantas no campo. Sementes portadoras atuam também como meio de sobrevivência desses agentes, servindo de veículo para introdução em novas regiões, ou para manutenção do inóculo de uma estação para outra, proporcionando sérias perdas econômicas.

Trabalhos realizados com sementes de diferentes cultivares de trigo procedentes de diversas regiões, mostraram a presença de diversos fungos; entre os quais *Bipolaris sorokiniana* Sacc. ex Sorok. considerado o mais importante (DIEHL et al., 1985; VECHIATO et al., 1987; GOULART & PAIVA, 1991). Este fungo afeta os órgãos aéreos e radiculares do trigo, causando as doenças helmintosporiose ou mancha marrom e a podridão comum das raízes, responsáveis por perdas significativas na cultura do trigo em todo o mundo (DIEHL, 1982a).

De acordo com Mc KINNEY (1923), E.C. Johnson foi o primeiro a demonstrar a patogenicidade deste fungo em plântulas de trigo. Nos Estados Unidos e Canadá, têm sido relatadas perdas anuais de produção de 4 e 5,7% respectivamente, atribuídas a podridão comum das raízes (DIEHL, 1982b). No Brasil, a doença encontra-se difundida nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Distrito Federal (CARDOSO & KIMATI, 1980; LUZ, 1982).

MEHTA (1978) relata severas perdas à cultura no Estado do Paraná, atribuídas a este fungo. Segundo DIEHL (1982a), os danos provocados pela podridão comum das raízes conduziram a perdas de aproximadamente 20% na produtividade do trigo, em 1979, no Rio Grande do Sul. No Estado de São Paulo, onde o cultivo do trigo vem apresentando razoável expansão, essa doença pode acarretar sérios prejuízos, dependendo das condições climáticas e suscetibilidade das cultivares

utilizadas. De acordo com BARROS et al. (1982), a região sul do Estado, normalmente mais úmida, está sujeita a epidemias causadas por este agente.

Em testes de sanidade de sementes de trigo, MEHTA & NAZARENO (1977) e LUZ et al. (1976), verificaram que *B. sorokiniana* foi o mais importante, devido ao alto percentual de incidência e severidade.

Dados obtidos por MENTEN (1991), em 129 amostras analisadas nos anos 1987-89, indicaram que 100% delas tinham *B. sorokiniana* numa faixa de 0,5 a 82,0% de incidência. Levantamentos de sanidade de sementes de trigo comercializadas no Brasil têm demonstrado a presença constante de *B. sorokiniana*. As incidências variam conforme o ano, local e cultivar, podendo atingir valores próximos a 100%. (NASSER, 1987; REIS, 1988). GOULART & PAIVA (1993), estudando 545 amostras de sementes de 19 cultivares de trigo, produzidas em 1988-89, em oito municípios do Mato Grosso do Sul, detectaram, entre outros organismos, a presença de *B. sorokiniana*, em 99% das amostras analisadas, sendo considerado o fungo patogênico de maior frequência.

A importância da associação fungo-semente foi enfatizada por FORCELINI et al. (1989), que constataram que sementes infectadas por este fungo sofrem perdas de germinação e vigor, podendo ainda ocorrer morte de plântulas de pré ou pós-emergência, sobretudo nos lotes de sementes com alta severidade. Em

áreas novas ou naquelas onde se pratica a rotação de culturas ou pousio e a eliminação de hospedeiros alternativos, a semente representa a única fonte de inóculo capaz de introduzir e estabelecer o patógeno no campo (FORCELINI, 1992).

A possibilidade de transmissão de *B. sorokiniana* através de sementes de trigo foi demonstrada por REIS & FORCELINI (1993). Segundo REIS (1987), o fungo, a partir da semente, coloniza as raízes seminais, o coleóptilo e pode causar lesões nas plúmulas. Deste modo, a semente está diretamente envolvida na continuidade do ciclo biológico de *B. sorokiniana* de uma a outra geração do hospedeiro, motivo pelo qual é considerado o mais importante patógeno associado a semente de trigo e, normalmente, alvo principal do tratamento de sementes (FORCELINI, 1991).

2.2. Tratamento de sementes com microrganismos antagonistas visando o controle de fitopatógenos

O controle biológico de fitopatógenos, utilizando microrganismos antagonísticos, possui um vasto potencial para o controle de doenças, através da redução da densidade da população ou atividade de um patógeno para limites compatíveis com a produtividade da cultura (BAKER & COOK, 1974). O significado das relações antagonistas entre microrganismos, segundo DAINES (1937), foi

ênfâtizado por De Bary em 1879 e, posteriormente, denominado antibiose por Ward em 1899, sugerindo que este fenômeno ocorre entre uma infinidade de organismos, incluindo fungos, bactérias e actinomicetos. ELAD et al. (1980) relataram que o controle biológico de patógenos habitantes do solo, pela adição de microrganismos antagonicos, é uma medida eficiente para o controle de doenças de plantas, dispensando inclusive o emprego de produtos químicos.

Uma das vias de introdução de microrganismos antagonistas no solo é através das sementes. Este é um método considerado eficiente e econômico pois pode oferecer proteção em pré e pós-emergência das plântulas, atuando na destruição do inóculo de patógenos presentes nas sementes e protegendo contra os existentes no solo. Em determinadas circunstâncias pode-se verificar um maior desenvolvimento de plântulas oriundas de sementes tratadas com estes agentes (COOK & BAKER, 1983; KOMMEDAHL & WINDELS, 1978).

Alguns trabalhos relatam a eficiência do tratamento de sementes com microrganismos antagonistas no controle de doenças de plantas (BAKER & COOK, 1974; BROWN, 1974; CUNFER, 1987). A inoculação de antagonistas em sementes antes do plantio pode promover a proteção durante a germinação, emergência, emissão de raízes e brotos, uma vez que durante essa fase são liberados exsudatos que estimulam os patógenos e outros microrganismos da espermosfera (FLENTJE & SAKSENA, 1964).

Os principais antagonistas utilizados no tratamento de sementes são fungos e bactérias. Os antagonistas fúngicos incluem os gêneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Chaetomium* como os mais utilizados. Entre as bactérias, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium radiobacter*, *Streptomyces* sp. e *Pseudomonas fluorescens* são as preferidas (TAYLOR & HARMAN, 1990; LUZ, 1993a).

Está técnica tem se mostrado eficaz no controle de vários patógenos em diversas culturas. São alguns exemplos: *Bacillus subtilis* no controle de *Fusarium roseum* e *Pythium* em milho (KOMMEDAHL & MEW, 1975) e de *Rhizoctonia solani* em trigo e cenoura (MERRIMAN et al., 1974); *Streptomyces griseus* no controle de *R. solani* em trigo (MERRIMAN et al., 1974); *Chaetomium globosum* no controle de *Bipolaris victoriae* em aveia (TVIET & MOORE, 1954); *Trichoderma* spp. contra *R. solani* em sementes de soja (WU, 1982; HOMECHIN, 1987).

Com relação ao controle biológico de *B. sorokiniana* em trigo, a literatura disponível é bastante escassa. Alguns trabalhos, contudo, demonstram a possibilidade de se obter agentes microbianos com potencial antagonista a esse fungo (ANWAR, 1949; CAMPBELL, 1956; OLD, 1965; LUZ, 1990; PESSOA et al., 1991).

2.3. Efeito de antagonistas fúngicos e bacterianos sobre fitopatógenos

O emprego de microrganismos antagonistas visando o controle de doenças de trigo foi relatado pela primeira vez, em 1931, contra o mal-do-pé do trigo, causado por *Gaeumannomyces graminis tritici* (GARRET, 1965). Apesar disso, poucos são os trabalhos realizados sobre o controle biológico de doenças dessa cultura.

LARSON & ATKINSON (1970) e NEAL et al. (1973), avaliando a reação de cultivares de trigo consideradas como resistentes ou suscetíveis a podridão comum das raízes causada por *B. sorokiniana*, observaram diferenças nos percentuais de microrganismos presentes em raízes, rizosfera e rizoplano, verificando uma maior frequência de organismos antagonistas em cultivares resistentes. Para estas cultivares, além do aspecto genético, verifica-se uma resistência indireta dada pelo estímulo do hospedeiro, no sentido de permitir um maior desenvolvimento da população microbiana antagônica na rizosfera e rizoplano.

SANFORD (1933) verificou um baixo nível de incidência de doenças em trigo e cevada, em campos artificialmente infestados por *B. sorokiniana*, atribuindo o fato à microflora natural do solo que exerce um marcante efeito inibidor sobre o crescimento desse patógeno. SANFORD & CORMACK (1940)

demonstraram que a adição de certos fungos, bactérias e actinomicetos ao solo reduz o efeito de *B. sorokiniana* sobre o trigo.

O tratamento de sementes de trigo com antagonistas, em condições de laboratório e de campo, foi efetuado por LUZ (1989), indicando ser esta técnica bastante promissora no controle de patógenos da espermosfera e controlando também patógenos habitantes do solo. *Trichoderma* spp, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* são exemplos de antagonistas que têm sido usados, com sucesso, nesse sistema (RECH FILHO, 1983, LUZ, 1990, 1993b; PESSOA et al., 1991).

Com relação a *Trichoderma*, HENIS et al. (1983) fazem referências a isolados desse antagonista, conhecido há muito por sua capacidade de reduzir doenças de plantas ocasionadas por fungos. O primeiro relato de que *Trichoderma* poderia produzir substâncias tóxicas a outros fungos foi feito por Falk em 1931, citado por BRIAN & HEMMING (1945), ao observar que plantas florestais infectadas por *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz. eram resistentes ao tombamento causado por *Coniophora cerebella* (Pers.) Lentz e *Merulius lachrymans* (Fr.) Gims. Diversos autores destacam este fungo entre os mais promissores agentes biocontroladores de patógenos habitantes do solo (CHET & BAKER, 1981; HADAR et al., 1979; WEINDLING, 1934). HENIS et al. (1983) atribuem a isolados de *Trichoderma* a capacidade de reduzir doenças de plantas causadas por fungos, em razão de sua forte habilidade competitiva, produção de antibióticos e capacidade de lise.

ANWAR (1949), estudando 86 isolados de bactérias, fungos e actinomicetos, verificou que 48 eram antagonistas a *B. sorokiniana*. Dentre estes, *B. subtilis*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *T. lignorum* foram os mais efetivos, produzindo uma grande inibição "in vitro" das colônias do patógeno. O efeito destes antagonistas foi também observado a campo e casa-de-vegetação, protegendo as plântulas de trigo contra a penetração do agente da podridão comum das raízes.

WU (1976) aplicou antagonistas fúngicos em sementes, visando aumentar emergência e vigor de plântulas de trigo, em solos infestados por *B. sorokiniana*, *Fusarium culmorum* e *R. solani*, tendo observado que sementes tratadas com *T. aureoviride* ou *T. harzianum*, mostraram melhor emergência em áreas infestadas com os patógenos, quando comparadas a sementes não tratadas. PATIL et al. (1987) obtiveram, "in vitro", o controle de *B. sorokiniana* isolado de cevada (*Hordeum vulgare* L.) através da utilização de *Streptomyces* sp., *B. subtilis* e *Trichoderma* sp., e recomendaram o tratamento de sementes dessa cultura, com esses antagonistas, para controle da doença em campo.

BILES & HILL (1988) testaram o efeito de *T. harzianum* sobre a esporulação de *B. sorokiniana* em folhas excisadas de plântulas de trigo, verificando uma redução significativa na capacidade de esporulação do patógeno em folhas tratadas com o antagonista.

O controle de *B.sorokiniana* através do tratamento biológico de sementes de trigo IAC-24 com antagonistas foi obtido por PESSOA et al. (1991), que verificaram reduções na transmissão semente-plântula do patógeno em 58% em relação à testemunha, através da imersão de sementes em suspensão de *T. viride*.

Respostas a aplicação de *Trichoderma* spp. são caracterizadas por aumento na percentagem de germinação, altura de plantas e peso de matéria seca, além de maior velocidade de germinação (BAKER et al., 1984; PAULITZ et al., 1986).

Segundo CHANG et al. (1986) e WINDHAM et al. (1986), *T. harzianum*, além de efetivo no controle biológico de inúmeros patógenos, tem sido responsável pelo aumento de germinação e crescimento de plantas.

KLEIFELD & CHET (1992), avaliando a interação de *T. harzianum* com plantas de feijão, rabanete, tomate e pepino, e seu efeito sobre respostas no crescimento, constataram que este antagonista induziu um aumento na emergência, altura, área foliar e peso de matéria seca de plântulas, quando aplicado ao solo através de diferentes modos. Verificaram ainda a presença de *T. harzianum* em raízes de plantas cultivadas em solo tratado com o antagonista, de modo semelhante a fungos micorrízicos. ELAD et al. (1980) observaram um aumento significativo no tamanho e peso de plântulas de feijão, quando da aplicação de *T. harzianum* em solos não infestados, em preparações de farelo de trigo. O emprego deste substrato, sozinho, não exerceu nenhum efeito significativo sobre as plantas.

Nos últimos anos a pesquisa sobre o controle biológico de fitopatógenos, através de antagonistas bacterianos, tem se intensificado. Dentre estas, as pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas fluorescens* têm sido muito estudadas em relação a inibição de fungos fitopatogênicos.

Os mecanismos básicos de antagonismo associado às bactérias, sugerido por BLAKEMAN & BRODIE (1976) e WELLER (1988), podem incluir antibiose, através da produção de antibióticos, bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos prejudiciais ao patógeno, competição trófica por nutrientes e ou disputa por nichos ou sítios ecológicos de sobrevivência e penetração no hospedeiro pelo patógeno, ou ainda, pelo estímulo do hospedeiro, ativando mecanismo de resistência pela produção de substâncias inibidoras à penetração e colonização.

B. subtilis e *P. fluorescens* estão incluídas entre as bactérias antagonistas com elevado potencial de supressão a fitopatógenos. Alguns representantes destes gêneros já demonstraram atividades no biocontrole através de avaliações "in vitro" e "in vivo", apresentando uma eficiente colonização no rizoplano ou atividade de saprogênese na rizosfera, revelando-se promissores para o emprego de estratégias de controle biológico (WELLER, 1988).

As *Pseudomonas* spp. fluorescentes, com potencial antagônico, estão frequentemente associadas a raízes de plantas procedentes de solos supressivos

(WELLER, 1988), podendo induzir aumento no desenvolvimento e produção do hospedeiro, através da produção de hormônios ou pela eliminação dos chamados "patógenos menores", designados rizobactérias deletérias (KLÖPPER et al., 1980). BROWN (1974) e MERRIMAN et al. (1974), por sua vez, sugerem que a promoção de crescimento de plantas por *P. fluorescens* está mais relacionada com a redução de patógenos que com a produção de substâncias promotoras de crescimento.

HOWELL & STIPANOVIC (1980) verificaram que o tratamento de sementes de algodão com *P. fluorescens* resultou em aumentos na sobrevivência e peso de matéria fresca de plântulas, quando cultivadas em solos infestados com *Pythium ultimum*. A inibição "in vitro" deste fungo pela bactéria foi atribuída a pioluteorina. De acordo com REIS (1991), *P. fluorescens* recebeu seu primeiro registro nos Estados Unidos da América, como defensivo biológico em 1988, empregado no tratamento de sementes de algodão para controle de *Pythium* e *Rhizoctonia*.

Vários autores obtiveram o controle do mal do pé do trigo através da aplicação de *P. fluorescens* em sementes ou no solo, atribuindo isto ao fato de que bactérias desse grupo colonizam e se estabelecem nas lesões das raízes, contribuindo para o desalojamento do fungo *G. graminis tritici* (WILKINSON et al., 1982; WELLER, 1983; WELLER & COOK, 1983). Segundo WELLER (1988), *Pseudomonas fluorescentes* empregadas no tratamento de sementes de trigo, visando

o controle de *G. graminis tritici*, são mais numerosas sobre as raízes de plantas onde este cereal é cultivado em monocultura, confirmando serem estas bactérias as principais responsáveis pela supressão da doença.

As espécies *B. subtilis* são bastante conhecidas por sua eficiência no controle biológico de diversos patógenos, fato atribuído à capacidade de produção de antibióticos ou toxinas específicas (GRAHAM-WEISS et al., 1987).

BROADBENT et al. (1971) estudaram um isolado de *B. subtilis*, estirpe A-13, que apresentou uma eficiente habilidade antagônica a fitopatógenos habitantes do solo, inibindo a colonização de tais microrganismos no rizoplano e permitindo um melhor desenvolvimento de plantas tratadas. O emprego de *B. subtilis*, isolado T-99, quando comparado ao efeito das técnicas usuais de controle somente com fungicidas, apresentou efeito similar ao tratamento químico, no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthii* em cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) (BOCHOW, 1989). A utilização deste mesmo isolado por Al Rashid¹ (1988), citado por BOCHOW (1989), para controle de *Phomopsis sclerotioides* em pepino, revelou eficiente redução na incidência da doença, proporcionando um aumento superior a 20% na produção, em relação à testemunha. CUBETA et al. (1985) verificaram que um isolado de *B. subtilis*, de sementes de soja, sintetizou metabólitos ativos contra sete patógenos "in vitro", tendo reduzido infecção causada por *Phomopsis* sp. através

¹ AL RASHID, M. Untersuchungen zur kombinierten biologisch-chemischen Bekämpfung der Schwarzen Wurzelfäule der Gewächshaugurke (*Phomopsis sclerotioides* Kest.). Humboldt, Berlin, 1988. 132p. (M.S. Humboldt Univ.).

do tratamento de sementes dessa cultura em campo, o mesmo não se verificando em casa-de-vegetação. De acordo com UTKHEDE & RAHE (1983), a utilização de *B. subtilis* (B-2) no controle de *Sclerotium cepivorum*, agente da podridão branca da cebola, promoveu excelente controle do patógeno "in vitro" e em plantas em casa-de-vegetação.

RANGASWAMI & RAMALINGAM (1962) testaram *B. subtilis* e *B. mycooides* para o controle de *Helminthosporium* em arroz, constatando que apenas *B. mycooides* mostrou inibição ao fungo, acompanhado de um maior desenvolvimento de plantas. A utilização de *B. subtilis* (A-13), através do tratamento de sementes, aumentou o crescimento e produção de milho doce (*Zea mays* L.), cenoura, cevada e trigo, além de outras espécies de plantas de importância econômica na Austrália, sendo este efeito atribuído ao amplo espectro da atividade antibiótica deste isolado (BROADBENT et al., 1971).

Segundo OLD (1965), inúmeras bactérias isoladas do solo têm-se mostrado antagônicas a *B. sorokiniana*. Todos os isolados testados produziram metabólitos de ação fungistática, difusíveis em meio de cultura, exercendo efeito sobre germinação de esporos e fragmentos de hifas deste fungo, verificando-se, contudo, que os esporos eram mais suscetíveis que as hifas. Vários trabalhos foram desenvolvidos por LUZ (1989, 1990 e 1993a), visando o controle de doenças de trigo através do tratamento de sementes com antagonistas bacterianos. Estes estudos

objetivaram controlar, entre outros fungos, *B. sorokiniana*. Os resultados obtidos, até o momento, indicaram que alguns destes agentes biológicos foram efetivos contra o patógeno "in vitro" e através do tratamento de sementes, aumentando a germinação em laboratório e "stand" no campo, reduzindo a ocorrência da podridão comum das raízes e aumentando significativamente o rendimento de grãos, em relação à testemunha (LUZ, 1989). Estes resultados foram, em alguns casos, superiores ao tratamento com o fungicida padrão iprodione + thiram, atualmente recomendado no sistema de produção do trigo.

2.4. Efeito de fungicidas sobre microrganismos antagonistas

Há mais de 100 anos, inúmeros pesquisadores têm constatado que o controle efetivo de uma doença de planta, geralmente, requer a aplicação de várias medidas de controle, cada uma atuando em diferentes modos ou tempo (BAKER, 1987).

A despeito dos inúmeros trabalhos referentes à utilização de microrganismos antagonistas no controle de fitopatógenos, poucos estudos têm sido efetuados sobre a tolerância destes organismos a fungicidas, visando a integração de controle químico e biológico.

A fumigação do solo com bissulfeto de carbono foi usada em pomares cítricos em 1914, na Califórnia, para controle da podridão de raízes causada por *Armillaria mellea*. Posteriormente D.E. Bliss, em 1951, demonstrou que esta fumigação tornava o micélio do patógeno suscetível à invasão por *T. viride*, sendo este um dos primeiros exemplos da integração do controle químico e biológico (BAKER, 1987; BURPEE, 1990). Segundo BOLLEN (1982), a associação destes métodos poderá ser feita desde que os antagonistas sejam tolerantes ao fungicida empregado para controle do patógeno ou tenham habilidade para colonizar mais rapidamente que o patógeno a rizosfera e rizoplano, após o tratamento químico.

O emprego de antagonistas, juntamente com outros métodos de controle no tratamento de frutos pós-colheita contra *Monilinia fruticola*, foi estudado por PUSEY et al. (1986), tendo observado que a combinação de *B. subtilis*, isolado B-3, com o fungicida dicloran, reduziu a porcentagem de frutos atacados de modo mais eficiente que dicloran ou B-3 isoladamente. A utilização de *B. subtilis*, combinado com quantidades reduzidas de zineb, mostrou uma maior eficiência no controle da murcha de *Fusarium* em cravo, com produções superiores às aquelas encontradas pelo uso do antagonista ou fungicida separados (BOCHOW, 1989). O efeito de *B. subtilis* no tratamento de sementes associado aos fungicidas vinclozolin, iprodione e benomyl, incorporados ao solo antes do plantio para controle de *Sclerotium cepivorum* em cebola, apresentou ótimos resultados em dois anos consecutivos, mas no terceiro ano o tratamento iprodione + *B. subtilis* foi ineficiente

no controle da doença (UTKHEDE & RAHE, 1983). BOCHOW (1989) verificou a eficiência de *B. subtilis* na redução de doenças em tomate e cravo em solos infestados com diversos agentes patogênicos, além de aumentar o crescimento e produção de culturas. Segundo o autor, a eficiência no controle de doenças poderia ser aumentada através da combinação deste antagonista com fungicidas ou outros métodos fitossanitários.

A tolerância de isolados de *Trichoderma* spp. a fungicidas foi estudada por PUNJA et al. (1982), em campos de golfe infestados por *S. rolfii* no Nordeste da Califórnia, tendo eles constatado que três isolados de *Trichoderma* apresentaram tolerância a vários fungicidas comumente usados no controle de outras doenças fúngicas. Estudos realizados por PAPAVIDAS & LEWIS (1981) indicaram a resistência de mutantes de *Trichoderma* (biotipos), induzida através de luz ultravioleta, aos fungicidas benomyl, thiabendazol e tiofanato metílico em concentrações superiores a 100 µg de ingrediente ativo/ml. Estes autores, através de estudos efetuados em laboratório, obtiveram mutantes resistentes a altas concentrações de benomyl (100 - 500 µg/ml) e com capacidade de reduzir o "damping-off" causado por *R. solani* em algodão e rabanete. Segundo ABD-EL MOITY et al. (1982), a exposição de linhagens de *T. harzianum* aos fungicidas chlorothalonil, procimidone, iprodione e vinclozolin, resultou na seleção de vários isolados resistentes a estes produtos. PAPAVIDAS et al. (1982) também desenvolveram um isolado de *T. harzianum* com tolerância múltipla a fungicidas, capaz de suportar altas doses (acima de 2 mg i.a./ml) de captan, captafol, vinclozolin e iprodione.

De acordo com BILES & HILL (1988), a aplicação de *T. harzianum* em sementes de trigo, quando do aparecimento inicial da podridão comum das raízes, poderá restringir disseminações secundárias e resultar em redução do inóculo primário para estação seguinte. Segundo estes autores, uma outra possibilidade é o uso de fungicidas combinado com um isolado tolerante de *T. harzianum*, citando como exemplo o imazalil, que apresenta pequeno efeito sobre a esporulação de *B. sorokiniana*, mas que reduz significativamente a eficiência da infecção quando combinado com o antagonista (HILL & BILES, 1984).

HADAR et al. (1979), estudando a associação de PCNB e *T. harzianum* no controle de "damping-off" em berinjela, ocasionado por *R. solani*, verificaram que baixas concentrações do fungicida, ineficazes quando aplicadas isoladamente, mostraram eficiência quando empregadas junto ao antagonista no solo, reduzindo a incidência da doença de 40% para 13%. De modo semelhante, HENIS et al. (1978) constataram que este mesmo fungicida, na proporção de 4 µg de i.a./kg de solo, adicionado a preparações de *T. harzianum*, proporcionou um efeito aditivo sobre o controle de *R. solani* em rabanete, além de um efeito sinérgico sobre a redução da densidade de inóculo. SAWANT & MUKHOPADHYAY (1990), avaliando a integração de metalaxyl com *T. harzianum* para o controle de *Pythium aphanidermatum* em beterraba, constataram um efeito aditivo na combinação antagonista-fungicida, reduzindo em 84-100% a incidência da doença, sendo estes efeitos superiores ao controle químico ou biológico, avaliados separadamente.

Segundo AL RASHID² (1988), citado por BOCHOW (1989), efeitos aditivos ou sinérgicos poderão ser obtidos com o uso de microrganismos antagônicos em combinação com outros antagonistas, relacionados ou não (*B. subtilis* x *B. subtilis*, *B. subtilis* x *Trichoderma*) ou outras técnicas de manejo, como a integração com certos fungicidas.

A integração de métodos biológicos e químicos poderá aumentar a eficiência no controle de doenças, além de reduzir a quantidade necessária do fungicida aplicado, minimizando os custos e permitindo seu emprego em culturas menos rentáveis, com vantagens de se obterem menores riscos ou impactos no meio ambiente (HENIS & CHET, 1975).

2.5. Eficiência de *Trichoderma* spp. no controle de *B.sorokiniana* através diferentes métodos de aplicação

A eficiência dos tratamentos com agentes de controle biológico de doenças de plantas é altamente influenciada pelo modo de aplicação.

O sucesso do controle de um patógeno, através da introdução do antagonista no solo ou aplicação nas sementes, dependerá do estabelecimento e da

² AL RASHID, M. Untersuchungen zur kombinierten biologisch-chemischen Bekämpfung der Schwarzen Wurzelfäule der Gewächshaugurke (*Phomopsis sclerotioides* Kest.). Humboldt, Berlin, 1988. 132p. (M.S. Humboldt Univ.).

manutenção de um limiar populacional do antagonista sobre as raízes ou solo. Um decréscimo da população, abaixo desse nível, poderá eliminar a possibilidade de controle (WELLER & COOK, 1983).

Um antagonista ideal deverá ser capaz de multiplicar-se nas sementes, colonizar e proteger as plântulas. Deste modo, o conhecimento e a resolução dos problemas relacionados ao crescimento, distribuição e sobrevivência dos antagonistas testados poderá aumentar o nível de consistência dos experimentos a nível de campo. Para isto, devem-se testar métodos de aplicação apropriados para assegurar a melhoria de suas atividades e sobrevivência, principalmente na espermosfera e rizosfera.

Segundo MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986), o desenvolvimento de um sistema prático e eficiente para aplicação de agentes de controle biológico é tão importante quanto a identificação de antagonistas superiores. Os sistemas de aplicação deverão ser econômicos, fáceis de usar e adaptáveis à maquinária agrícola.

O revestimento de sementes com suspensão de conídios tem sido amplamente testado como um sistema potencial para aplicação de antagonistas (CHU & WU, 1981; ELAD et al., 1981; HARMAN et al., 1980).

A sobrevivência de conídios de *Trichoderma* spp., aplicados na forma de suspensão em sementes de rabanete, testada por MIHUTA-GRIMM &

ROWE (1986), variou entre os isolados utilizados, sendo estas diferenças devidas, provavelmente, a variabilidade natural de cada isolado e não devido a outros fatores tais como nutrição ou número de conídios.

PAPAVIZAS et al. (1984) reportaram que *Trichoderma* spp., aplicado ao solo sobre uma base alimentar completamente colonizada, proporcionou melhor controle que preparações conidiais aplicadas sem adição de nutrientes. Resultados semelhantes foram obtidos por MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986), ao compararem estes dois sistemas de aplicação no controle *R. solani* em rabanete.

Um controle efetivo da podridão de sementes e "damping-off" causados por *R. solani* e *Pythium* spp. em rabanete, foi obtido com *T. hamatum* (Bon.) Bain., aplicado a sementes em estudos de casa-de-vegetação (HARMAN et al., 1980).

A avaliação da sobrevivência de *T. harzianum* no solo e na rizosfera de plântulas de feijão e ervilha, revelou que este organismo foi capaz de sobreviver por 130 dias no solo, na ausência de uma boa base alimentar, não sendo, contudo, capaz de se multiplicar na rizosfera dessas plântulas, quando não dispunha de substrato e condições favoráveis para tal (PAPAVIZAS et al., 1982). Entretanto, a adição de substrato colonizado pelo antagonista poderá não ser útil, se os nutrientes nele contido estimularem o crescimento do patógeno (COOK & BAKER, 1983).

NEYPES et al. (1988) demonstraram a eficiência do controle da podridão do pé do trigo causada por *Sclerotium rolfsii*, através da aplicação de preparações de *T. glaucum* em sementes ou aplicado ao solo, tendo ambos os métodos se mostrado superiores ao efeito das aplicações com fungicidas, resultando em maior produção da cultura.

A viabilidade do tratamento de sementes de trigo com suspensões de *T. viride*, para o controle da podridão comum das raízes causadas por *B. sorokiniana*, foi testada por PESSOA et al. (1991), em São Paulo. Os resultados demonstraram que *Trichoderma* possui potencial antagônico sobre aquele patógeno em condições de laboratório e casa-de-vegetação, reduzindo significativamente a transmissão semente-plântula do patógeno em relação à testemunha.

Diferentes substratos têm sido desenvolvidos na produção de inóculo de antagonistas, principalmente para espécies de fungo do gênero *Trichoderma*, como farelo de trigo (CHANG et al., 1986; ELAD et al., 1980), grãos de centeio (WELLS et al., 1972) e farelo de arroz (HOMECHIN, 1987).

HOMECHIN (1987), utilizando diferentes substratos para produção de esporos de *T. harzianum*, verificou que estes exerceram influência sobre a ação do antagonista, quando de sua utilização no tratamento de sementes de soja, observando aumento de emergência e sanidade de raízes de plântulas, sendo o farelo de arroz o mais favorável.

Segundo KLEIFELD & CHET (1992), o aumento da resposta do crescimento de plantas, causado por *T. harzianum*, depende da habilidade do fungo sobreviver e se desenvolver na rizosfera. Deste modo, verificaram que a utilização de preparação de turfa e farelo, como base nutritiva para o fungo, proporcionou uma vantagem maior que a utilização somente da suspensão de conídios.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos em laboratório e câmaras de crescimento do Departamento de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), em Piracicaba, SP, no período de fevereiro a dezembro de 1992.

3.1. Determinação da incidência de *B.sorokiniana* em sementes de trigo

Foram recebidas amostras de sementes de trigo, provenientes de campos de produção dos Estados de São Paulo (IAC 24) e Mato Grosso do Sul (BR 20, BH 1146 e IAPAR 6 Tapejara), colhidas na safra de 1992. As amostras foram mantidas em câmara fria ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$), sendo retiradas somente por ocasião dos testes experimentais.

A incidência de *B. sorokiniana* foi detectada em amostras de cada cultivar, empregando-se o método do papel de filtro com congelamento, sugerido por LASCA et al. (1987) e MENTEN (1988). As sementes foram distribuídas em placas de Petri plásticas, com 9 cm de diâmetro, contendo três discos de papel de filtro com 80g/m² embebidos em água destilada. Para cada amostra foram utilizadas 200 sementes (25 por placa), num total de oito repetições. Após plaqueamento, as sementes foram incubadas durante 24 horas à temperatura de 20 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas, obtido mediante o emprego de lâmpadas fluorescentes tipo "day light" de 40 watts, dispostas 40 cm acima das placas. Em seguida, foram submetidas a congelamento à temperatura de -18°C, por 24 horas, e reconduzidas à câmara de incubação por mais cinco dias, nas mesmas condições anteriormente descritas.

A avaliação constou da determinação do número de sementes com *B. sorokiniana*, registrando-se também a ocorrência dos demais fungos incidentes nas amostras. A identificação de cada fungo foi efetuada de acordo com as características morfológicas observadas, empregando-se microscópio estereoscópico e composto. Essas características foram também comparadas àquelas citadas na literatura (CHIDAMBARAM et al., 1973 e ALCORN, 1988). Os dados de sementes portadoras de *B. sorokiniana* foram expressos em percentagem.

3.2. Efeito de microrganismos antagonistas sobre *B. sorokiniana* "in vitro" e associado a sementes de trigo

Preliminarmente, foi efetuada a seleção dos microrganismos com maior habilidade antagônica, avaliando-se a capacidade de inibição "in vitro" e redução da incidência e severidade de *B. sorokiniana* associado à sementes de trigo da cultivar BR-20, com 92,5% de incidência do patógeno.

3.2.1. Seleção "in vitro" de antagonistas contra *B. sorokiniana*

Foram utilizados sete isolados fúngicos (*Trichoderma* spp.) e oito bacterianos (três de *Bacillus subtilis* e cinco de *Pseudomonas* spp.) cuja denominação, localidade de origem e substrato de isolamento são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Microrganismos testados quanto à habilidade antagônica a *Bipolaris sorokiniana*.

Microrganismo	Denominação	Localidade de Origem	Substrato de Isolamento
<i>T. koningii</i>	T solo	Piracicaba-SP	solo
<i>T. harzianum</i>	T 2	Piracicaba-SP	solo
<i>T. harzianum</i>	T composto(TC)	Piracicaba-SP	esterco bovino fermentado
<i>T. harzianum</i>	T 25	Petrolina-PE	solo
<i>T. pseudokoningii</i>	T 14	Petrolina-PE	solo
<i>T. polysporum</i>	T 11	Petrolina-PE	solo
<i>T. viride</i>	T R3	Recife-PE	semente de feijão
<i>B.subtilis</i>	39/89.19.2	Passo Fundo-RS	-
<i>B.subtilis</i>	64/88.2	Passo Fundo-RS	-
<i>B.subtilis</i>	178/86.1	Três Passos-RS	solo
<i>P. marginalis</i>	C 21	Carpina-PE	solo
<i>P. fluorescens</i>	P 2	Petrolina-PE	solo
<i>P. fluorescens</i>	SDR 2	Petrolina-PE	solo
<i>P. fluorescens</i>	JA 1	João Alfredo-PE	solo
<i>P. fluorescens</i>	BJ 22	Bom Jardim-PE	solo

O isolado de *B. sorokiniana* usado em todos os ensaios foi obtido de sementes de trigo cv. BR 20, proveniente do MS naturalmente infectadas, com incidência de 92,5% do patógeno.

A seleção foi realizada individualmente para cada grupo de antagonista testado (*Trichoderma* spp., *B. subtilis* e *Pseudomonas* spp.), sendo os resultados expressos através da percentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno.

3.2.1.1. Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *B. sorokiniana* "in vitro"

O teste foi efetuado pelo método de culturas pareadas, semelhantemente ao sugerido por BELL et al. (1982), e consistiu na utilização de discos de ágar de 5 mm de diâmetro, removidos das margens das colônias de ambos os fungos com 6 dias de idade, para placas de Petri contendo BDA. Os discos, contendo estruturas de *B. sorokiniana* ou do antagonista, foram colocados em lados opostos e distanciados de 7cm entre si. As placas, assim preparadas, foram mantidas à temperatura ambiente de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Como testemunha, foram utilizadas placas contendo somente discos de *B. sorokiniana* ou *Trichoderma* spp., pareadas com disco de ágar.

A avaliação foi efetuada cinco dias após incubação, através da medição do crescimento linear das colônias do patógeno, determinando-se a percentagem de redução do crescimento através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Cresc. da test.} - \text{Cresc. do trat.}}{\text{Cresc. da Testemunha}} \times 100$$

Avaliou-se, ainda, a formação de zonas de demarcação entre as colônias dos fungos estudados, observando-se, também, a possível produção de pigmentação no meio pelos isolados de *Trichoderma* spp. ou produção de odor.

Para cada tratamento foram feitas 5 repetições, sendo o experimento realizado em delineamento inteiramente casualizado.

3.2.1.2. Antagonismo de *B. subtilis* e *Pseudomonas* spp. a *B. sorokiniana* "in vitro"

As colônias utilizadas para preparo da suspensão das bactérias foram cultivadas em meio 1/4 BDA (LUZ, 1990), durante 48 h, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. As células bacterianas foram removidas através da adição de 5 ml de água destilada esterilizada à superfície do meio em cada placa, efetuando-se posteriormente a raspagem, mediante o emprego de um pincel de cerdas macias. A concentração da suspensão dos antagonistas foi ajustada para 10^8 ufc/ml ao espectrofotômetro, para OD 600 = 0,30 (LELLIOT & STEAD, 1987).

Nesse estudo, empregou-se o método do funil, proposto por LUZ (1990), usando-se um funil de vidro, com boca de 7 cm de diâmetro, o qual foi imerso nas

suspensões das respectivas bactérias. A suspensão retida nos bordos da boca do funil era transferida para placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo BDA. A cada imersão nas suspensões das respectivas bactérias, o funil era eficazmente desinfestado através de lavagem com detergente, imersão em álcool e posterior flambagem. Vinte e quatro horas após o plaqueamento dos antagonistas foram escolhidas as placas onde se verificava o crescimento uniforme das colônias bacterianas em todo o círculo. A seguir, procedeu-se a deposição, no centro dessas placas, de um disco de ágar de 5 mm de diâmetro, contendo estruturas de *B. sorokiniana*, obtido de colônias com 6 dias de idade. Como testemunha, foram utilizadas placas de Petri contendo meio 1/4 BDA, onde as suspensões bacterianas foram substituídas por água destilada esterilizada e inoculadas com discos de ágar contendo estruturas do patógeno. A incubação foi efetuada à temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Cada tratamento, 3 para *B. subtilis* e 5 para *P. fluorescens* foi constituído de 5 repetições mais a testemunha, arranjadas em delineamento inteiramente casualizado. Cada unidade experimental foi representada por uma placa de Petri.

A avaliação foi efetuada 5 dias após incubação, através da medição do crescimento do diâmetro da colônia de *B. sorokiniana*, determinando-se o percentual de inibição conforme descrito no ítem 3.2.1.1.

3.2.1.3. Compatibilidade "in vitro" de antagonistas fúngicos e bacterianos

Visando investigar a possibilidade de associação entre os isolados mais eficientes no controle do patógeno, procedeu-se a determinação da compatibilidade entre os mesmos, empregando-se o método do funil (LUZ, 1990), com procedimento idêntico ao do item anterior. Nesse estudo, foram avaliados os isolados bacterianos mais eficazes de *B. subtilis* (39/89.19.2) e de *P. fluorescens* (P2) contra os dois isolados de *T. harzianum* (T 25 e TC). A efetividade desses isolados foi previamente determinada mediante avaliações "in vitro".

Foram efetuados 6 tratamentos e 5 repetições sendo cada repetição representada por uma placa, perfazendo um total de 30 unidades experimentais. A avaliação efetuada foi semelhante àquela utilizada no item 3.2.1.1.

3.2.2. Efeito de antagonistas sobre a incidência de *B.sorokiniana* em sementes de trigo

As suspensões das bactérias (*B. subtilis* e *Pseudomonas* sp.) foram obtidas de acordo com a metodologia empregada no item 3.2.1.2. No caso de *Trichoderma* spp., através do cultivo dos isolados desse fungo em meio BDA, durante 6 dias em

condições de laboratório, à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e luz contínua. Após este tempo, adicionou-se a cada placa 5 ml de água destilada esterilizada, efetuando-se a raspagem das estruturas de cada isolado, com auxílio de um pincel, transferindo-se para "beckers" com 100 ml de capacidade. A homogeneização foi feita com um bastão de vidro, filtrando-se, em seguida, através de uma camada dupla de gaze fina. A concentração de cada suspensão foi determinada pelo emprego da câmara de Neubauer e posteriormente ajustada para, aproximadamente, 10^8 conídios/ml.

Posteriormente, sementes de trigo 'BR-20', apresentando 92,5% de incidência de *B. sorokiniana*, foram imersas nas suspensões de cada antagonista, durante 5 minutos, na proporção de 5 ml para cada 10 g de sementes. Em seguida, essas sementes foram secas durante duas horas à temperatura ambiente, em placas de Petri, contendo duas camadas de papel de filtro. Sementes não tratadas, embebidas somente em água destilada esterilizada por 5 minutos e secas como as demais, serviram como testemunha. Um tratamento adicional consistiu no uso do fungicida padrão composto por iprodione (Isopropilcarbamoil-1-(diclo-3,5-fenil)-3-hidantoina, 200 g/kg + thiram (bissulfeto de tetrametil tiuram) 600 g/kg (Rovrin), na dosagem de 250 g/100 kg de sementes, cuja aplicação foi feita misturando-se a quantidade proporcional àquela dose em 10g de sementes, num frasco Erlenmeyer, seguido de agitação manual, por 5 minutos.

As sementes, após tratadas, foram plaqueadas e incubadas pelo método de congelamento, descrito no ítem 3.1. Cada tratamento representado pelos 7 isolados de *Trichoderma* spp., 3 de *B. subtilis* e 5 de *Pseudomonas* spp.; além do controle com iprodione + thiram e testemunha para cada grupo de antagonista, foi constituído de 8 repetições com 25 sementes cada, sendo cada unidade experimental representada por uma placa de Petri, num total de 200 sementes por tratamento.

A avaliação foi efetuada após 7 dias de incubação, através da determinação do número de sementes portadoras de *B. sorokiniana* nos diferentes tratamentos. Os dados obtidos foram expressos em percentagem de incidência, em relação ao número de sementes analisadas.

3.2.3. Avaliação da severidade de *B. sorokiniana* em sementes de trigo

Além da incidência, as sementes foram avaliadas de acordo com a percentagem de área coberta pelas estruturas de *B. sorokiniana* através do estabelecimento de uma escala de notas de 0 a 5 (Tabela 2), determinando-se assim, o índice de severidade (IS), após tratamento das sementes com os antagonistas e fungicida.

Tabela 2 - Escala de notas de severidade de *B. sorokiniana* associado a sementes de trigo 'BR-20', após submetidas ao teste de sanidade pelo método do congelamento.

Nota	Área de semente coberta por <i>B.sorokiniana</i> (%)
0	0
1	> 0 - 10
2	> 10 - 25
3	> 25 - 50
4	> 50 - 75
5	> 75

O Índice de Severidade foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{\sum(\text{Nota} \times \text{Número de sementes com esta nota})}{\text{Número de sementes por repetição}}$$

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com os mesmos tratamentos do ítem 3.2.2. A análise estatística foi efetuada separadamente para cada grupo de antagonista (*B.subtilis*, *Pseudomonas* spp. e *Trichoderma* spp.) incluindo o tratamento químico e a testemunha. Os valores do percentual de incidência e dos índices de severidade foram submetidas a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para comparação da eficiência dos métodos empregados, procedeu-se uma análise de correlação simples para as variáveis percentagem de incidência e índices de severidade.

3.2.4. Determinação da viabilidade de conídios de *B.sorokiniana* em BDA

Por ocasião da avaliação de incidência e severidade, sob microscópio estereoscópico, verificaram-se alterações morfológicas de conídios de *B. sorokiniana* produzidos em sementes tratadas com os isolados de *T. harzianum* (T25 e TC), quando comparados aos conídios de sementes não tratadas. A viabilidade destes conídios foi então avaliada, através da remoção individual de 125 conídios, extraídos de sementes de cada tratamento, transferidos com auxílio de estilete para placas de Petri contendo BDA, num total de 25 conídios por placa. A viabilidade foi determinada através da contagem do número de colônias formadas em cada tratamento, 5 dias após incubação a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, sendo os resultados expressos em percentagem.

3.2.5. Efeito de antagonistas no controle de *B.sorokiniana* associado a sementes de trigo em BDA

Isolados de *T. harzianum* (T25 e TC), *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2) selecionados pela sua capacidade antagônica, determinada através dos testes de inibição do crescimento micelial "in vitro" e redução da incidência e severidade do patógeno associado a sementes de trigo, foram comparados quanto a eficiência no controle de *B. sorokiniana* em meio BDA.

A metodologia consistiu no emprego de sementes de trigo 'BR-20' apresentando 92,5% de incidência do patógeno, sendo previamente desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio (1%) durante 2 minutos e, a seguir lavadas em água destilada esterilizada por duas vezes consecutivas.

Posteriormente essas sementes foram imersas nas suspensões dos respectivos antagonistas empregando-se a mesma técnica descrita no item 3.2.1., para bactérias, e 3.2.2., para o fungo.

Após tratamento, as sementes foram plaqueadas em BDA, utilizando-se 100 sementes para cada isolado, distribuídas em número de dez por placa. Com vistas a se fazer comparações, um dos tratamentos foi constituído pela mistura fungicida (iprodione + thiram), na dose comercialmente recomendada. Sementes imersas somente em água destilada serviram como testemunha.

As sementes foram incubadas à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 5 dias, e a avaliação consistiu na contagem do número de colônias de *B. sorokiniana* nos diferentes tratamentos, efetuando-se também observações com relação ao número de plântulas emergidas (sadias, doentes ou mortas) e sementes não germinadas.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, constando de seis tratamentos e dez repetições. Os dados expressos em percentagem, foram

transformados em arco sen $\sqrt{x/100}$ e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Efeito de antagonistas sobre *B. sorokiniana* associado a sementes de trigo em câmara de crescimento

Neste experimento foi utilizado um representante de cada grupo de antagonista, considerado como mais eficiente no controle do patógeno, de acordo com os resultados obtidos em avaliações anteriores. Os isolados utilizados foram *T. harzianum* (T25), *B. subtilis* (39/89.19.2), *P. fluorescens* (P2), além do tratamento químico com iprodione + thiram e da testemunha.

Sementes de trigo 'BR 20', com 92,5% de *B. sorokiniana*, foram tratadas com o fungicida e suspensão dos respectivos antagonistas, empregando-se a mesma metodologia descrita nos itens 3.2.1. e 3.2.2.

A semeadura foi realizada em caixas de plástico rígido, de dimensões 40 x 35 x 10 cm e com fundo perfurado. Nessas caixas foram colocados os substratos, constituídos de solo coletado em áreas do campo experimental do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, anteriormente cultivadas com trigo. O solo foi peneirado

e dividido em duas porções, sendo uma mantida nas condições de campo (solo natural) e outra autoclavada, durante 1 h a 120°C, em dois dias consecutivos. Após preparo do substrato, na superfície do solo foram efetuados 50 orifícios em cada caixa, com auxílio de uma grade de madeira utilizada nos testes de germinação de sementes, com 1 cm de diâmetro e 3 cm de profundidade, equidistantes 4 cm entre si, cada qual recebendo uma semente. Para cada tratamento foram utilizadas quatro caixas, constituindo uma repetição, num total de 200 sementes por tratamento.

Amostras dos dois tipos de solo (natural e autoclavado) foram submetidas a análises pelo Laboratório de Análises de Solos do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ, cujas características físicas apresentaram uma distribuição do tamanho das partículas de 30, 12 e 58% de areia, silte e argila, respectivamente. As características químicas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Características químicas dos solos utilizados.

Solo	pH	MO	P	Concentração de Nutrientes (meq/cm ³)						
	CaCl ₂	(%)	μg/cm ³	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V%
Natural	4,9	3,7	192	0,61	7,0	1,9	5,2	9,5	14,7	65
Autoclavado	5,1	3,3	149	0,59	7,3	4,2	4,2	12,1	16,3	74

Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 5 x 2, com quatro repetições, perfazendo um total de 40 unidades experimentais.

O ensaio foi conduzido em câmara de crescimento de aproximadamente 7 m², à temperatura constante de 24°C, mantida por um condicionador de ar "Springer Admiral" de 12000 BTUs, regulado por termosensor. O fotoperíodo foi de 12h, fornecido por um conjunto de 40 lâmpadas de 2 tipos (20 fluorescentes do tipo Super luz do dia, GE de 40w e 20 do tipo Gro-lux, Sylvania F-40T12/Gro), dispostas alternadamente em um suporte metálico de altura regulável, sendo mantido a cerca de 1,80 m acima das caixas. O fotoperíodo foi regulado através de um "timer" Timeswitch Cronomat, marca SERMAR, modelo 7900, 60 Hz. O número de plântulas emergidas, foi registrado diariamente, para determinação da velocidade de emergência em cada tratamento.

A avaliação foi efetuada 21 dias após o plantio, de acordo com o recomendado por FORCELINI (1992), através dos seguintes parâmetros: velocidade de emergência, percentagem de emergência, altura das plântulas, peso de matéria fresca e taxa de transmissão de *B. sorokiniana*.

A velocidade de emergência (VE), para cada tratamento, foi determinada através de somatória do número de plântulas emergidas em cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a emergência (MARCOS FILHO et al., 1987). A percentagem de emergência foi determinada pela contagem do número total de plântulas emergidas em cada tratamento, expresso em percentagem, em relação ao número de sementes utilizadas. Para determinação de altura (cm) e peso

de matéria fresca, foram escolhidas, aleatoriamente, 40 plantas em cada tratamento. A altura foi determinada a partir do ponto de inserção das raízes até o ápice da folha mais alta e o peso da matéria fresca da parte aérea foi determinada para estas mesmas plantas. A taxa de transmissão foi determinada dividindo-se o número de plântulas doentes pelo número de plântulas emergidas, sendo os resultados expressos em percentagem.

Foram consideradas infectadas pelo patógeno somente plântulas lesionadas que, submetidas à câmara úmida, produziram as estruturas do mesmo. A câmara úmida foi realizada após coleta e lavagem das plântulas doentes em água corrente, e posterior seccionamento das partes lesionadas, submetidas a desinfestação superficial com álcool 50%, hipoclorito de sódio (1%) durante 2 minutos e lavagem, por duas vezes consecutivas, em água destilada esterilizada. Em seguida, foram distribuídas em placas de Petri contendo três camadas de papel de filtro embebido em água destilada esterilizada, e incubadas a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 5 dias, efetuando-se, em seguida, as avaliações para determinação da taxa de transmissão de *B. sorokiniana* em cada tratamento.

Os dados obtidos em cada avaliação foram submetidos a análise de variância, sendo os dados expressos em percentagem, transformados em arco sen $\sqrt{x/100}$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

3.4. Efeito do tratamento químico e biológico, isolados ou em combinação, no controle de *B. sorokiniana*

3.4.1. Comportamento dos antagonistas e de *B. sorokiniana* em relação ao fungicida iprodione + thiram "in vitro"

Avaliou-se, inicialmente, o comportamento dos antagonistas T25, TC, P2 e 39/89.19.2 frente a diferentes concentrações do fungicida.

A metodologia para cultivo dos microrganismos foi semelhante a utilizada nos itens 3.2.1. e 3.2.2. Os testes foram conduzidos, separadamente, para organismos fúngicos (T 25, TC e *B. sorokiniana*) e bacterianos (P2 e 39/89.19.2), empregando-se a metodologia apropriada para cada grupo.

3.4.1.1. Sensibilidade de *T. harzianum* (T25 e TC) e *B. sorokiniana* "in vitro"

O meio de cultura contendo o fungicida foi preparado de acordo com a técnica descrita por EDGINTON et al. (1971), modificada por MENTEN et al. (1976), dissolvendo-se o produto em acetona (5 ml), completando-se o volume para

100 ml com água destilada esterilizada, obtendo-se desta forma a solução estoque. Alíquotas apropriadas dessa solução foram adicionadas a 100 ml de BDA fundente ($45 \pm 2^\circ\text{C}$), de modo a se obter concentrações de 1, 10, 50 e 100 ppm. Aproximadamente 20 ml de meio das diferentes concentrações foram vertidos, separadamente, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após solidificação, discos de ágar de 5 mm de diâmetro, contendo estruturas de *B. sorokiniana*, T25 ou TC, obtidos de colônias com 6 dias de idade, foram transferidos assepticamente para o centro de cada placa, as quais foram incubadas durante 5 dias a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Placas contendo somente BDA (sem fungicida) foram utilizadas como testemunha. Cada tratamento constou de cinco repetições, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. Cada unidade experimental foi representada por uma placa de Petri.

A avaliação foi feita através da medição do diâmetro das colônias, em dois sentidos perpendiculares entre si, estabelecendo-se a média do crescimento do patógeno e antagonistas em cada concentração.

Um variante de TC, denominado de TC100 por ter sido detectado numa das repetições de 100 ppm, desenvolvendo intenso crescimento e abundante esporulação, foi isolado, multiplicado e em seguida testado separadamente, nas mesmas concentrações utilizadas para os outros fungos.

3.4.1.2. Sensibilidade de *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2) "in vitro"

A sensibilidade dos antagonistas bacterianos ao fungicida foi avaliada através da adaptação dos testes empregados em antibiogramas qualitativos (MOURA, 1992), descrito a seguir.

Em placas de Petri de 9 cm de diâmetro foram vertidos 20 ml de meio nutriente ágar (2%), de modo a formar uma camada básica. Sobre esta camada foi adicionada uma sobrecamada de 10 ml de meio básico semi-sólido de King B (0,8% de ágar), fundente e resfriado a $\pm 48^{\circ}\text{C}$, ao qual foi previamente incorporado 100 μl de crescimento bacteriano cultivado em meio básico líquido de King B, com 24 h de idade (KADO & HESKETT, 1970; KADO, 1971).

Após solidificação da sobrecamada, 3 orifícios de 5 mm de diâmetro foram feitos em cada placa, com auxílio de um furador de rolha, previamente esterilizado, dispostos equidistantemente mediante esquema gráfico, de formato triangular, colocado sob as placas.

Em cada orifício foram colocados 10 μl (0,01 ml) da solução fungicida nas concentrações correspondentes (0, 1, 10, 50, 100 e 1000 ppm), sendo 3 concentrações por placa (0, 1, 10 ppm e 50, 100 e 1000 ppm).

Os antagonistas foram incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, durante 48 h, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 5 repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri.

A avaliação foi realizada através da observação da presença ou ausência de halo de inibição, sendo os isolados classificados como sensíveis (S) ou resistentes (R), respectivamente, de acordo com a reação apresentada. Em caso de sensibilidade positiva, registrou-se, em cm, o raio dos halos supra mencionados.

3.4.2. Eficiência dos antagonistas e de iprodione + thiram, isolados ou em combinação, no controle de *B.sorokiniana* associado a sementes de trigo

O experimento foi implantado em câmara de crescimento de aproximadamente 20 m²/, localizada na área experimental do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, à temperatura ambiente determinada diariamente através de termômetro de máxima e mínima, oscilando entre 19 e 27°C, sob regime de luz alternada, com fotoperíodo de 12 h, fornecido conforme descrito no ítem 3.3.

A metodologia consistiu no tratamento de sementes de trigo 'BR 20' com 92,5% de incidência de *B. sorokiniana*, tratadas com as suspensões dos antagonistas *T. harzianum* (T25, TC100), *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P.fluorescens* (P2), conforme descrito anteriormente, ou combinados com a mistura fungicida iprodione + thiram, adicionando-se quantidades apropriadas do produto, de modo a se obter os níveis de 5, 25, 50 e 100% da dose comercialmente indicada para o tratamento de sementes de trigo, os quais correspondem respectivamente às dosagens de 12,5; 62,5; 125 e 250g/ 100 kg de sementes. Um tratamento constituído de sementes de trigo submetidas à aplicações apenas do fungicida (sem antagonistas), nas mesmas proporções (5, 25, 50 e 100%), foi também testado. Sementes imersas somente em água destilada esterilizada (sem fungicida e sem antagonistas), foram empregadas como testemunha.

Nos tratamentos combinados, as sementes foram pré-tratadas com os antagonistas nas suspensões, concentrações e tempo indicados nos ítems 3.2.1. e 3.2.2., adicionando-se então quantidades adequadas do fungicida para obtenção das doses desejadas. Em seguida, efetuou-se a mistura do fungicida às sementes, através de agitação manual durante 5 minutos para a distribuição uniforme do produto sobre as mesmas, que foram mantidas para secagem em laboratório, durante aproximadamente 12 h antes do plantio. A semeadura foi efetuada em vasos de alumínio com 2 kg de capacidade, contendo solo autoclavado, cujas características físicas e químicas estão contidas na Tabela 3. As sementes foram depositadas em orifícios com 3 cm de profundidade, colocando-se 10 sementes/vaso, empregando-se um total de 5 vasos para cada tratamento.

A avaliação foi efetuada aos 21 dias segundo técnica preconizada por FORCELINI (1992), através da contagem do número de plântulas emergidas e da determinação da taxa de transmissão de *B. sorokiniana*, sendo a presença do patógeno confirmada através de testes de câmara úmida, como descrito no ítem 3.3.; registrou-se também a frequência de *Trichoderma*, detectado nas raízes e mesocótilos das plântulas emergidas (infectadas ou não), através de observações a olho nu e com auxílio de microscópio estereoscópico.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, arranjado num esquema fatorial 5 x 5 com 5 repetições, perfazendo um total de 125 unidades experimentais. Os resultados, expressos em percentagem, foram transformados em $\text{arc. sen. } \sqrt{x/100}$ e as médias comparadas através do teste de Tukey a 5% de significância.

A avaliação do efeito das combinações entre antagonistas e dose da mistura iprodione + thiram, foi efetuada através da comparação da eficiência de controle observada (ECO) obtida no presente ensaio, com a eficiência de controle esperada (ECE), calculada através da fórmula proposta por COLBY (1967), $E = X + Y(100 - X)/100$, onde:

E = Eficiência de controle esperada para mistura dos componentes X e Y, sendo X = % de eficiência de controle observado para o componente A na dose (a),

isoladamente, $Y = \%$ de eficiência de controle do componente B na dose (b), isoladamente.

O resultado de ECO/ECE indica o tipo de interação existente para a mistura, permitindo determinar o Fator Sinérgico (FS) desta mistura que, de acordo com SCARDAVI (1966) e GISI et al. (1985), poderá ser sinérgico, aditivo ou antagônico, para FS de valores maior, igual ou menor que 1 respectivamente.

3.5. Eficiência de *T. harzianum* (T 25 e TC) no controle de *B. sorokiniana* através de diferentes modos de aplicação

Os antagonistas foram aplicados às sementes, ou ao solo destinado ao plantio dessas, na forma de suspensão de esporos ou substrato de farelo de arroz colonizado por aqueles microrganismos.

3.5.1. Aplicação através de suspensão de esporos

Suspensões na concentração de 10^8 conídios/ml foram obtidas de colônias de cada isolado do antagonista com 6 dias de idade, cultivadas em BDA e aplicadas às sementes de acordo com a técnica descrita no ítem 3.2.2. A aplicação no solo foi

realizada com um pulverizador tipo "De Vilbiss", na proporção de 10 ml/vaso, efetuando-se a sua incorporação ao solo a uma profundidade correspondente à região de semeadura, que foi de aproximadamente 3 cm.

3.5.2. Aplicação em substrato de farelo de arroz

Os antagonistas foram cultivados em substrato constituído de farelo de arroz umedecido com água destilada, distribuído em sacos de polipropileno (na proporção de 100g de substrato/40-50 ml de água), autoclavados durante 1/2 hora a 120°C, por dois dias consecutivos. Após resfriamento procedeu-se a inoculação, com suspensão de conídios dos respectivos antagonistas (2 ml/saco) as quais foram introduzidas com auxílio de seringas descartáveis, empregando-se a mesma concentração do ítem anterior. A incubação foi efetuada sob regime de luz contínua, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 14 dias, revolvendo-se diariamente os sacos inoculados para melhor distribuição do inóculo.

Após colonização, o substrato foi aplicado às sementes ou ao solo. A aplicação às sementes foi feita pela adição de 3g do substrato/10g de sementes, previamente aspergidas com água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80, na proporção de 2 gotas para 100 ml de água, e, agitados manualmente por 5 minutos em frascos Erlenmeyers para obtenção de uma boa distribuição do

inóculo. Este mesmo substrato foi aplicado ao solo, na proporção de 10g/vaso, incorporado a uma profundidade de cerca de 3cm, correspondente a região de semeadura.

Tratamentos com água destilada esterilizada ou substrato sem antagonistas, aplicados às sementes ou ao solo, foram usados como testemunha. Sementes tratadas com iprodione + thiram, na dose comercialmente recomendada, foram avaliadas para fins de comparação.

A semeadura foi efetuada em vasos de alumínio com capacidade de 2 kg, contendo solo autoclavado, previamente umedecido, com as mesmas características descritas na Tabela 3. As sementes foram distribuídas em número de 10/vaso, empregando-se 50 sementes/tratamento. Os vasos foram mantidos em câmara de crescimento nas mesmas condições de temperatura e luminosidade descritas no item 3.3.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com 13 tratamentos e 5 repetições, e a avaliação realizada 21 dias após o plantio, pela contagem do número de plântulas emergidas e com sintomas de *B. sorokiniana* nos diferentes tratamentos, sendo a presença do patógeno confirmada através da realização de câmara úmida como mencionado no item 3.3. Os resultados, expressos em percentagem, foram transformados em arco seno $\sqrt{x/100}$ e as médias comparadas através do teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.5.3. Avaliação da viabilidade do substrato

Substratos colonizados pelo antagonista foram mantidos em prateleira, em condições de laboratório à temperatura ambiente de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz difusa, durante 90 dias, sendo então avaliados com relação à viabilidade germinativa de esporos em B.D.A. e a eficiência do controle de *B. sorokiniana* em sementes de trigo, pelo método do congelamento, descrito no ítem 3.1, determinando-se o percentual de incidência em relação às sementes não tratadas.

4 - RESULTADOS

4.1. Determinação da incidência de *B. sorokiniana* em sementes de trigo

Os resultados da incidência de *B. sorokiniana* em diferentes cultivares de trigo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Incidência de *B. sorokiniana* em sementes de diferentes cultivares de trigo provenientes dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.

Cultivar	Procedência	Incidência ^{1/} (%)
IAC 24	Florinea - SP	91,5
IAPAR 6 TAPEJARA	Dourados - MS	92,5
BR 20	Dourados - MS	92,5
BH 1146	Dourados - MS	0,5

^{1/} Dados referentes a análise de 200 sementes por cultivar

Das quatro cultivares analisadas, três mostraram uma alta frequência de *B. sorokiniana*, detectado pelo método do papel de filtro com congelamento. As percentagens mais elevadas foram registradas para as cultivares IAPAR 6 Tapejara e BR 20, procedentes do Mato Grosso do Sul, com 92,5% de incidência cada. A cultivar IAC 24, procedente do Estado de São Paulo, apresentou nível semelhante às anteriormente citadas, com 91,5% das sementes portadoras do patógeno. Sementes da cultivar BH 1146, provenientes de Dourados-MS, apresentaram um baixo nível de *B. sorokiniana*, com apenas 0,5% das sementes colonizadas.

Outros fungos, tais como *Alternaria tenuis*, *Fusarium* spp., *Drechslera* spp., *Phoma* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp. e *Epicoccum* sp., foram também encontrados associados às sementes, sendo *B. sorokiniana*, entretanto, o mais prevalente entre os organismos constatados.

Considerando a elevada frequência do fungo em estudo, em três das cultivares analisadas, a escolha daquela a ser usada nos experimentos subsequentes recaiu sobre 'BR 20', por representar a amostra com maior quantidade de sementes e com qualidade fisiológica adequada.

4.2. Efeito de antagonistas sobre *B. sorokiniana* "in vitro" e associado a sementes de trigo

4.2.1. Seleção "in vitro" de antagonistas contra *B. sorokiniana*

Os resultados obtidos no presente experimento, apresentados nas Tabelas 5 e 6, revelaram diferenças entre os agentes antagonistas (*Trichoderma* spp., *B. subtilis* e *Pseudomonas* spp.), bem como entre isolados de um mesmo antagonista, quanto a capacidade para inibir o crescimento micelial do patógeno.

Tabela 5 - Efeito de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *B. sorokiniana* "in vitro".

Isolado	Crescimento ^{1/} micelial (cm)	Inibição ^{2/} (%)
<i>T. harzianum</i> (T25)	2,75 a ³	69,4
<i>T. harzianum</i> (TC)	3,04 ab	66,2
<i>T. harzianum</i> (T2)	3,48 bc	61,3
<i>T. koningii</i> (Tsolo)	3,70 c	58,8
<i>T. viride</i> (TR3)	3,70 c	58,8
<i>T. polysporum</i> (T11)	3,75 c	58,3
<i>T. pseudokoningii</i> (T14)	4,35 d	51,6
Testemunha	9,00 e	0,0
C.V. (%) =	14,854	

^{1/} Médias de 5 repetições após 5 dias de incubação a 26 ± 2°C/12 h de fotoperíodo

$$^2/ \% \text{ inibição} = \frac{\text{Cresc. testem.} - \text{Cresc. tratam.}}{\text{Crescimento da Testemunha}} \times 100$$

^{3/} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05)

Nos ensaios efetuados com *Trichoderma* spp. (Tabela 5), verificou-se que *T. harzianum* (T 25 e TC) foram os que apresentaram maior capacidade antagônica a *B. sorokiniana* com percentuais de inibição de 69,4 e 66,2%, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. Estes foram seguidos em ordem de eficiência por *T. harzianum* (T2), com 61,37%, que embora não tenha diferido de TC, comportou-se de modo semelhante à *T. koningii* (Tsolo), *T. viride* (TR3) e *T. polysporum* com níveis de redução do patógeno de 58,8; 58,8 e 58,3% não diferindo entre si. A menor eficiência foi atribuída a *T. pseudokoningii* (T14), que diferiu de todos os isolados de *Trichoderma* testados sendo, contudo, superior à testemunha.

Nos ensaios efetuados com *B. subtilis* (Tabela 6), o maior percentual de inibição foi constatado para o isolado 39/89.19.2 (77,5%), que diferiu significativamente dos demais, sendo seguido por 178/86.1 (60,4%) e 64/88.1 (22,2%), que diferiram entre si e da testemunha.

Tabela 6 - Efeito de *B. subtilis* e *Pseudomonas* spp. sobre o crescimento micelial de *B. sorokiniana* "in vitro".

Isolado	Diâmetro da ^{1/} colônia (cm)	Inibição ^{2/} (%)
<i>B. subtilis</i>		
39/89.19.2	2,02 a ^{3/}	77,5
178/86.1	3,56 b	60,4
64/88.2	7,00 c	22,2
Testemunha	9,00 d	0,0
C.V. (%) =	2,062	
<i>Pseudomonas</i> spp		
<i>P. fluorescens</i> (P2)	3,98 a	55,7
<i>P. fluorescens</i> (SDR ₂)	5,26 b	41,5
<i>P. fluorescens</i> (JA ₁)	5,80 c	35,5
<i>P. marginalis</i> C21)	6,84 d	24,0
<i>P. fluorescens</i> (BJ22)	7,12 d	20,8
Testemunha	9,00 e	0,0
C.V. (%) =	2,989	

^{1/} Médias de 5 repetições após 5 dias de incubação a $26 \pm 2^\circ\text{C}/12$ h fotoperíodo

^{2/} % inibição = $\frac{\text{Cresc. testem.} - \text{Cresc. tratam.}}{\text{Crescimento da Testemunha}} \times 100$

^{3/} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05)

Em se tratando de *Pseudomonas* spp., a maior capacidade de inibição foi obtida com o isolado *P. fluorescens* (P2) com 55,7%, seguido, em ordem decrescente de eficiência, por SDR2 (41,5%) e JA1 (35,52%), que diferiram significativamente

entre si e de P2. *P. marginalis* (C21) e BJ22 apresentaram os menores percentuais de inibição, não diferindo entre si, comportando-se, no entanto, como superiores à testemunha, como indicado na Tabela 6.

Alguns isolados bacterianos como 64/88.2, de *B. subtilis*, e C21 e BJ22, de *Pseudomonas*, não foram capazes de conter a expansão da colônia de *B. sorokiniana*, que cresceu sobre a colônia do antagonista. Estes antagonistas, embora não induzindo a formação de halo de inibição, reduziram a velocidade de crescimento do patógeno, quando comparados à testemunha.

Observações adicionais, efetuadas para os isolados de *Trichoderma* spp., indicaram que estes apresentaram um crescimento contínuo sobre o meio de cultura, recobrando toda a colônia do patógeno, verificando-se, no entanto, diferenças na velocidade de crescimento entre os mesmos. *B. sorokiniana* cessou seu crescimento, invariavelmente, após contacto com o antagonista, apresentando uma evidente zona de demarcação na área de encontro dos dois organismos. Esta zona, contudo, desaparecia gradativamente, à medida que *Trichoderma* crescia sobre a área colonizada pelo patógeno.

As características culturais dos isolados de *Trichoderma*, com relação à produção de pigmento, odor e velocidade de crescimento, são descritas a seguir:

Os isolados *T. koningii* (Tsolo) e *T. pseudokoningii* (T14) produziram pigmento no meio de cultura de cor amarela e verde-limão, respectivamente (sendo os que apresentaram a menor velocidade de crescimento quando pareados com *B. sorokiniana*). Os isolados de *T. harzianum* (T25, TC e T2) bem como *T. polysporum* (T11) e *T. viride* (TR3), não produziram pigmento, observando-se sempre a cor natural do meio de cultura. Alguns destes, como T2, TC e T25, produziram um forte odor de "côco".

Com relação a velocidade de crescimento, obtida com base na medição de crescimento micelial do antagonista, quando pareado com *B. sorokiniana*, verificou-se que os mais eficientes foram, em ordem decrescente, T25, TC, T11, TR3 e T2, sendo T14 e Tsolo, como já mencionado, os menos velozes.

4.2.2. Compatibilidade "in vitro" de antagonistas fúngicos e bacterianos

Os resultados do efeito dos antagonistas *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2) sobre *T. harzianum* (T25 e TC) e *B. sorokiniana* (B.s.), obtido através do método do funil, são apresentados na Figura 1.

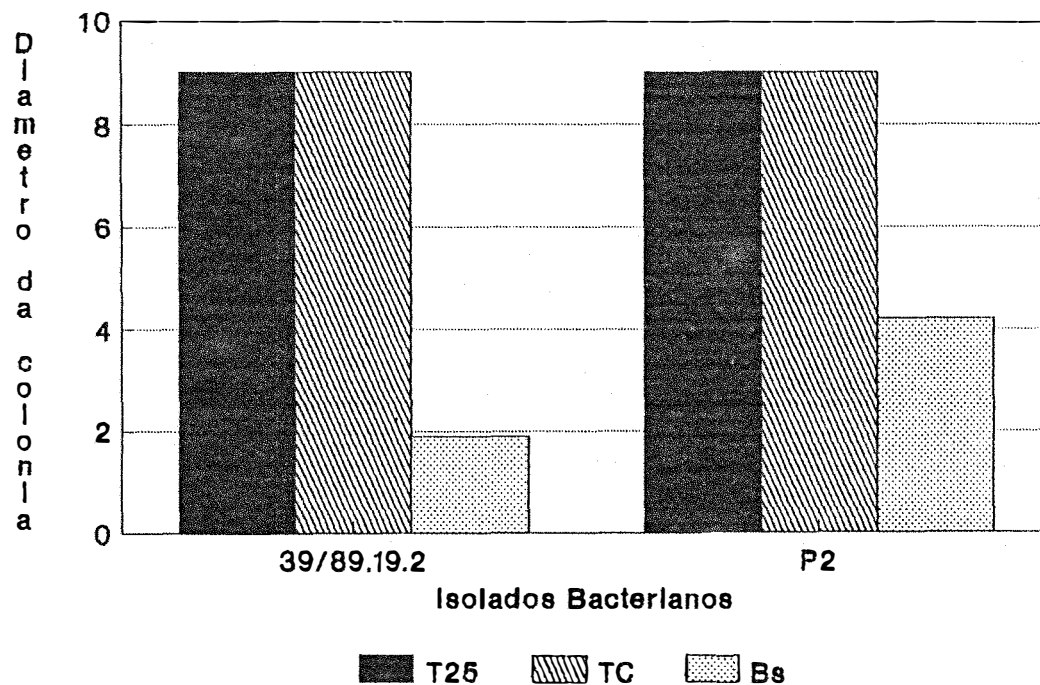


Figura 1 - Efeito de *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2) sobre o crescimento micelial "in vitro" de *T. harzianum* (T25 e TC) e *B. sorokiniana*.

O crescimento de *Trichoderma* foi observado em toda a placa, expandindo-se por sobre a colônia das bactérias, não se verificando alterações com relação à velocidade de crescimento ou produção de esporos, quando comparados à testemunha. Estes resultados indicam serem os mesmos compatíveis com os isolados de *B. subtilis* e *P. fluorescens* testados.

Os resultados obtidos, com relação à *B. sorokiniana*, embora não analisados estatisticamente, são semelhantes aos observados anteriormente (Tabela 6), confirmando a ação antagonica dessas bactérias ao patógeno "in vitro".

4.2.3. Efeito de antagonistas sobre incidência e severidade de *B.sorokiniana* em sementes de trigo

Os dados relativos ao efeito de *Trichoderma* spp., *B. subtilis* e *Pseudomonas* spp. sobre a incidência e severidade de *B. sorokiniana* em sementes de trigo 'BR-20', comparado à eficiência do tratamento químico e ao de sementes não tratadas, são apresentadas na Tabela 7.

Em se tratando do efeito de *Trichoderma* spp., observou-se que as menores percentagens de incidência e notas de severidade foram obtidas para o tratamento de sementes com iprodione + thiram e T25 com incidência de 33,0 e 42,0% e notas de 0,36 e 0,70 respectivamente, não diferindo significativamente entre si, sendo superiores aos demais isolados. Estes tratamentos foram seguidos, em ordem de eficiência pelo TC e TR3, não se detectando diferenças significativas entre os mesmos e Tsolo quanto a percentagem de incidência e nem de T2 com relação à severidade. A menor habilidade antagonica foi atribuída a T14 que apresentou uma incidência semelhante a de sementes não tratadas, diferindo destas, porém, com relação à severidade.

As médias de incidência e severidade de *B. sorokiniana* em sementes de trigo tratadas com *B. subtilis* e *Pseudomonas* spp., revelaram que iprodione + thiram foi mais eficiente que estes antagonistas, diferindo significativamente de todos os isolados testados (Tabela 7).

Tabela 7 - Incidência e severidade de *B. sorokiniana* em sementes de trigo 'BR-20' tratadas com diferentes antagonistas e iprodione + thiram, incubadas pelo Método do Papel de Filtro com congelamento.

Tratamento	Incidência ^{1/} (%)	Notas de ^{2/} Severidade
<i>Trichoderma</i> spp.		
<i>T. harzianum</i> (T25)	42,0 a ³	0,70 a ³
<i>T. harzianum</i> (TC)	64,5 b	1,30 b
<i>T. viride</i> (TR3)	63,0 b	1,38 b
<i>T. koningii</i> (Tsolo)	73,5 bcd	1,94 c
<i>T. harzianum</i> (T2)	76,5 cd	1,70 bc
<i>T. polysporum</i> (T11)	79,0 cd	2,00 bc
<i>T. pseudokoningii</i> (T14)	83,0 de	2,74 d
Testemunha	92,5 e	3,37 e
Iprodione + thiram	33,0 a	0,36 a
C.V. (%) =	10,249	14,854
<i>B. subtilis</i>		
<i>B. subtilis</i> (39/89.19.2)	67,0 b	2,13 b
<i>B. subtilis</i> (178/86.1)	86,0 c	2,70 c
<i>B. subtilis</i> (64/88.2)	89,0 c	3,23 d
Testemunha	91,5 c	3,68 e
Iprodione + thiram	36,0 a	0,38 a
C.V. (%) =	12,133	11,497
<i>Pseudomonas</i> spp		
<i>P. fluorescens</i> (P2)	63,0 b	1,23 b
<i>P. fluorescens</i> (SDR ₂)	78,0 c	1,88 c
<i>P. fluorescens</i> (JA ₁)	82,0 cd	2,09 c
<i>P. fluorescens</i> (BJ22)	86,0 cd	3,32 e
<i>P. marginalis</i> (B21)	89,0 cd	2,45 d
Testemunha	92,5 d	3,92 f
Iprodione + thiram	34,0 a	0,39 a
C.V. (%) =	11,916	9,771

^{1/} Médias de 8 repetições de 25 sementes (200/tratamento)

^{2/} Obtida através da Escala de Notas de 0 - 5, de acordo com a % de área da semente coberta pelo patógeno

^{3/} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P = 0,05).

As médias obtidas para os efeitos dos antagonistas bacterianos mostraram diferenças significativas para os isolados 39/89.19.2 e P2, de *B. subtilis* e *P. fluorescens* respectivamente, sendo considerados os mais eficientes na redução da incidência e severidade do patógeno, diferindo significativamente dos demais isolados testados dentro de seus respectivos grupos. Os isolados 178/86.1 e 64/88.2 de *B. subtilis* e JA₁, BJ22 e C21 de *Pseudomonas* não diferiram significativamente das sementes não tratadas com relação a incidência, sendo, no entanto, superiores a esta quanto à capacidade de inibição da esporulação, apresentando médias de severidade estatisticamente menores.

Os resultados obtidos através de análises de correlação simples em cada antagonista (Tabela 8) indicaram uma correlação positiva e altamente significativa entre incidência e severidade, o que permite a escolha de qualquer destes parâmetros para avaliação do efeito de antagonistas no tratamento de sementes de trigo, com relação a *B. sorokiniana*, em condições de laboratório.

Tabela 8 - Coeficiente de correlação entre incidência e severidade de *B. sorokiniana* em sementes de trigo, para os antagonistas estudados.

Antagonista	Correlação entre % de incidência e notas de severidade
<i>Trichoderma</i> spp.	0,9377 **
<i>Bacillus subtilis</i>	0,9828 **
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,9107 **

** Significativo a 1% pelo teste T.

4.2.4. Viabilidade de conídios de *B. sorokiniana* isolados de sementes de trigo tratadas com suspensão de *T. harzianum* em BDA

Por ocasião da avaliação de incidência e severidade, uma observação mais detalhada, sob microscópio composto dos conídios de *B. sorokiniana* produzidos sobre sementes tratadas com T25 e TC, foi possível constatar que vários conídios apresentavam formato irregular, retorcidos, outros aparentemente desidratados, e com vacuolação ou desintegração da parede celular.

Quando da avaliação da viabilidade destes conídios, verificou-se uma grande capacidade inibidora da germinação, quando plaqueados, individualmente, em BDA (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito do tratamento de sementes de trigo com suspensão de *T. harzianum*, sobre a germinação de conídios de *B. sorokiniana* e recuperação do antagonista em BDA.

<i>T. harzianum</i>	Conídios germinados ^{1/} (%)	Colônias de <i>Trichoderma</i> ^{2/} (%)
T25	4,0	99,2
TC	8,0	96,0
Testemunha	97,6	0,0

^{1/} Dados obtidos de 5 repetições com 25 conídios cada

^{2/} Dados obtidos pela contagem do número de colônias do antagonista em cada tratamento

Foram considerados germinados conídios que, após incubação, deram origem à colônias do patógeno. A maior inibição foi obtida para o isolado T25 que, de 125 conídios plaqueados, somente 5 produziram colônias de *B. sorokiniana*, 4 das quais colonizadas pelo antagonista. TC também apresentou excelente capacidade inibidora, permitindo o crescimento de apenas 10 colônias do patógeno, sendo 6 destas colonizadas por *Trichoderma*. Estes tratamentos contrastaram sensivelmente com a testemunha, onde a percentagem de conídios germinados foi de 97,6%.

Conídios de *B. sorokiniana* não germinados, nos tratamentos com T25 e TC, deram lugar a colônias destes antagonistas, recuperados em 99,2 e 96,0%, respectivamente.

4.2.5. Efeito de antagonistas sobre *B. sorokiniana* associado à sementes de trigo em BDA.

Os dados referentes ao efeito de organismos antagonistas e de iprodione + thiram no controle de *B. sorokiniana*, em sementes de trigo, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Efeito de antagonistas e tratamento químico no controle de *B. sorokiniana* em sementes de trigo 'BR-20' em B.D.A.

Tratamento	Sementes com <i>B. sorokiniana</i> ^{1/} (%)
<i>T. harzianum</i> (T25)	0,0 a ^{2/}
<i>T. harzianum</i> (TC)	1,0 a
<i>B. subtilis</i> (39/89.19.2)	49,0 c
<i>P. fluorescens</i> (P2)	57,0 c
Iprodione + thiram	12,0 b
Testemunha	86,0 d
C.V. (%) =	33,511

^{1/} Dados obtidos de 10 repetições com 10 sementes cada

^{2/} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05)

Todos os tratamentos reduziram significativa-mente a percentagem de colônias de *B. sorokiniana*, em sementes de trigo 'BR-20', em comparação com a

testemunha. Os melhores resultados foram observados para os isolados T25 e TC, de *T. harzianum*, reduzindo para 0 e 1%, respectivamente, o desenvolvimento do patógeno nas condições estudadas, não se constatando diferenças significativas entre os mesmos. Os tratamentos com iprodione + thiram, *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2), por sua vez, foram menos eficientes no controle de *B. sorokiniana*, sendo o tratamento químico, contudo, superior aos antagonistas bacterianos, dos quais diferiu significativamente.

Os efeitos dos antagonistas sobre o número de sementes germinadas, plântulas saudas, doentes ou mortas são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Efeito de antagonistas no controle de *B. sorokiniana* em sementes de trigo, determinado através do número de plântulas saudas, doentes e mortas e de sementes não germinadas, em BDA.

Tratamento	Plântulas			Sementes não germinadas	Total
	saudas	doentes	mortas		
<i>T. harzianum</i> (T25)	99	0	0	1	100
<i>T. harzianum</i> (TC)	98	0	1	1	100
<i>B. subtilis</i> (39/89.19.2)	31	24	4	41	100
<i>P. fluorescens</i> (P2)	37	23	6	34	100
Iprodione + thiram	73	13	2	12	100
Testemunha	12	21	11	56	100

Os dados obtidos permitiram constatar que não houve uma correspondência direta entre número de sementes com *B. sorokiniana* em B.D.A. e número de sementes não germinadas. Sementes colonizadas pelo patógeno, em alguns casos, germinaram, dando origem a plântulas saudias; outras originaram plântulas com sintomas ou que emergiram mas posteriormente sofreram "damping-off" (plântulas mortas). A maioria das sementes não germinadas teve como causa a presença do patógeno, enquanto outras, sem o patógeno, deixaram de germinar devido a fatores provavelmente fisiológicos.

4.3. Efeito de antagonistas sobre *B. sorokiniana* associado a sementes de trigo em câmara de crescimento

Os resultados da taxa de transmissão de *B. sorokiniana*, emergência, altura e peso de plântulas de trigo, em solo natural e autoclavado, são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Efeito de substratos (solo natural e autoclavado) sobre a transmissão de *B.sorokiniana*, emergência, altura e peso de plântulas de trigo 'BR-20' em câmara de crescimento.

Substrato	Transmissão (%)	Emergência (%)	Altura (cm)	Peso de matéria fresca (g)
	^{1/}			
solo natural	39,24	80,3	33,20	0,288 a
solo autoclav.	39,19	76,2	32,75	0,255 b
C.V. (%)	21,893	11,492	5,134	14,406

^{1/} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05)

As médias obtidas para solo natural e autoclavado em relação aos parâmetros avaliados não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey (P = 0,05), com exceção do peso de matéria fresca de plântulas, constantando-se maior desenvolvimento de plântulas em solo natural.

Os dados sobre o efeito de antagonistas aplicados a sementes de trigo em diferentes tipos de solo são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Comparação de médias para o efeito de antagonistas e iprodione + thiram sobre a transmissão de *B.sorokiniana*, emergência, altura e peso de plântulas em solo natural (SN) e solo autoclavado (SA) em câmara de crescimento.

Tratamento	Transmissão ^{1/} (%)		Emergência ^{2/} (%)		Altura ^{3/} (cm)		Peso matéria ^{3/} fresca (g)	
	SN	SA	SN	SA	SN	SA	SN	SA
T 25	26,1	33,6ab ⁴	81,6	73,1ab	35,2ab	33,9ab	0,352a	0,277ab
39/89.19.2	47,3	41,3ab	82,9	79,4ab	31,9bc	32,7bc	0,295a	0,255ab
P2	39,9	49,8b	80,0	70,4ab	31,6c	31,8bc	0,295a	0,237ab
Iprodione + thiram	31,8	19,2a	84,3	89,3a	38,6a	35,8a	0,300a	0,295a
Testemunha	51,9	54,4b	71,7	65,7b	28,8c	29,6c	0,198b	0,212b
C.V. (%)	21,893		11,492		5,134		14,406	

^{1/} Dados obtidos através do número de plântulas doentes/plântulas emergidas x 100

^{2/} Médias de 4 repetições de 50 sementes cada

^{3/} Médias de 10 plantas/repetição

^{4/} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05)

Os efeitos dos antagonistas e fungicida não apresentaram diferenças significativas entre si e com relação a testemunha, dentro do solo natural, quanto a eficiência no controle da transmissão de *B. sorokiniana* em sementes de trigo 'BR 20' com 92,5% de incidência.

As diferenças encontradas entre os antagonistas, no solo autoclavado, com relação a transmissão de *B. sorokiniana*, por sua vez, refletem o efeito dos respectivos tratamentos aplicados às sementes, evidenciando-se o emprego do iprodione + thiram, *T. harzianum* (T 25) e *B. subtilis* (33/89.19.2) como os mais eficazes, não diferindo estatisticamente entre si. A menor eficiência foi verificada para *P. fluorescens* (P2), com resultados idênticos ao da testemunha, não tendo diferido, contudo, de T 25 e 39/89.19.2.

Estes mesmos efeitos podem ser observados para as variáveis emergência e peso de matéria fresca em solo natural, onde os tratamentos também não diferiram estatisticamente entre si; constataram-se diferenças somente para a variável altura, onde o efeito do iprodione + thiram e T 25 foram significativamente superiores aos demais tratamentos. As menores médias foram obtidas para *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2), que não diferiram entre si e da testemunha.

No solo autoclavado verificaram-se, mais uma vez, diferenças entre os tratamentos, para as variáveis emergência, peso e altura de plântulas, destacando-se

a mistura iprodione + thiram, como o mais eficiente, seguido, em média, por *T. harzianum* (T25), *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2), em ordem decrescente de eficiência, embora não apresentassem diferenças estatisticamente significativas.

Este comportamento foi também observado quando da avaliação da velocidade de emergência, fator indicativo do vigor das plântulas, para os antagonistas utilizados nos diferentes tipos de solo (Tabela 14).

Tabela 14 - Teste de velocidade de emergência com sementes de trigo 'BR-20' tratadas com antagonistas fúngicos e bacterianos em diferentes tipos de solo.

Tratamento	Índice de velocidade de emergência ¹	
	Solo natural	Solo autoclavado
<i>T. harzianum</i> (T 25)	46,53	34,80
<i>B. subtilis</i> (39/89.19.2)	45,53	33,01
<i>P. fluorescens</i> (P2)	42,95	32,48
Iprodione + thiram	49,12	41,02
Testemunha	37,19	29,16

^{1/} Médias de 4 repetições de 50 sementes cada

Embora a ordem de eficiência dos antagonistas tenha sido a mesma nos dois substratos, os melhores efeitos foram observados em solo natural. Como nas

avaliações anteriores, os melhores resultados foram obtidos para iprodione + thiram e *T. harzianum* (T 25), seguidos de *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2) com índices inferiores aos anteriormente citados, sendo, contudo, superiores a testemunha.

4.4. Efeito do tratamento químico e biológico, isolados ou em combinação no controle de *B. sorokiniana*

4.4.1. Sensibilidade de *T.harzianum* (T 25 e TC) *B.sorokiniana* a iprodione + thiram "in vitro".

As médias para o efeito das diferentes concentrações de iprodione + thiram sobre o crescimento micelial de *T. harzianum* (T25 e TC) e *B.sorokiniana* são apresentadas na Tabela 15. Os resultados das análises efetuadas separadamente para o variante TC100 de *T. harzianum* serão apresentados na mesma tabela.

Tabela 15 - Médias, em cm, para o diâmetro das colônias de *T.harzianum* (T 25 e TC), *B.sorokiniana* e do variante TC100 em diferentes concentrações de iprodione + thiram.^{1/}

Fungo	Concentração em ppm ^{2/}				
	0	1	10	50	100
<i>T. harzianum</i> (TC)	9,00A	9,00aA	8,58aA	4,36aB	3,86aB
<i>T. harzianum</i> (T 25)	9,00A	9,00aA	7,89aB	4,73aC	3,41aD
<i>B. sorokiniana</i>	9,00A	3,82bA	1,38bB	0,00bC	0,00bC
C.V. (%) = 3,19					
<i>T. harzianum</i> (TC100)	9,00 A	9,00 A	9,00 A	8,86 AB	8,72 B
C.V. (%) = 0,75					

^{1/} Concentração (% i.a) = 20 + 60;

^{2/} Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey (P = 0,05)

De acordo com os resultados obtidos, os isolados de *T. harzianum* (TC e T25) mostraram-se significativamente mais tolerantes a iprodione + thiram que *B. sorokiniana*, não diferindo estatisticamente entre si.

Analisando o comportamento de cada fungo dentro das concentrações do fungicida, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas, evidenciando-se uma tendência para diminuição do crescimento micelial à medida em que se aumentavam as concentrações. O isolado TC foi considerado o mais tolerante, não

diferindo significativamente da testemunha nas concentrações de 1 e 10 ppm, apresentando porém uma ação inibitória crescente nas concentrações de 50 e 100 ppm, que não diferiram entre si. Para T 25, esta tendência foi evidenciada a partir de 10 ppm, observando-se uma redução significativa no crescimento destes isolados, em relação a 1 ppm. A 50 e 100 ppm, estes efeitos foram ainda maiores, diferindo contudo, entre si. Iprodione + thiram reduziu eficientemente o crescimento micelial de *B.sorokiniana*, apresentando diferenças estatisticamente significativas a partir de 1 ppm, sendo o fungo completamente inibido a partir de 50 ppm.

Neste experimento, observou-se em uma das repetições do isolado TC, na concentração de 100 ppm, o surgimento de um variante de comportamento atípico, com crescimento semelhante ao da testemunha (sem fungicida). Este variante, denominado TC100, foi avaliado separadamente, estando os resultados inseridos na Tabela 15.

A análise de variância, para as médias de crescimento micelial deste isolado, não mostrou diferenças estatísticas significativas nas concentrações de 1, 10 e 50 ppm, que por sua vez, não diferiram da testemunha. A menor média foi obtida para 100 ppm, sendo contudo semelhante à concentração imediatamente inferior da qual não diferiu. Em todas as concentrações, verificou-se um crescimento intenso e abundante esporulação do isolado em questão, que apresentou, todavia, mudanças morfológicas quanto ao aspecto da colônia, que produziu esporos de cor verde-amarelado, diferente do isolado original.

4.4.2. Sensibilidade de *B.subtilis* (39/89.19.2) e *P.fluorescens* (P2) a iprodione + thiram "in vitro"

A reação dos isolados bacterianos a diferentes concentrações de iprodione + thiram foi determinada através de testes semelhantes aos empregados para antibiogramas e os resultados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Sensibilidade de *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2) a diferentes concentrações de iprodione + thiram^{1/} "in vitro", avaliada através do halo de inibição (em cm), avaliada através do halo de inibição (em cm).

Isolado Bacteriano	Concentração do fungicida (ppm) ^{1/}					
	0	1	10	50	100	1000
<i>B.subtilis</i> (39/89.19.2)	-	-	0,34	0,89	1,12	1,32
<i>P.fluorescens</i> (P2)	-	-	-	-	-	-

^{1/} Concentração do produto (% i.a.) = 20 + 60.

^{2/} Média de cinco repetições.

O isolado P2 foi considerado tolerante ao fungicida testado, não se verificando a formação de qualquer inibição no crescimento de colônias em nenhuma das concentrações utilizadas.

O isolado 39/89.19.2 comportou-se como sensível, verificando-se a formação de halos de inibição crescentes à medida que as concentrações do produto eram aumentadas. A 1 ppm a bactéria não apresentou nenhuma reação de sensibilidade ao produto, reagindo de modo semelhante à testemunha.

4.4.3. Eficiência de antagonistas e iprodione + thiram, isolados ou em combinação, no controle de *B. sorokiniana* associado a sementes de trigo.

A influência dos antagonistas *T. harzianum* (T25 e TC100), *B. subtilis* (39/89.19.2), *P. fluorescens* (P2) e de diferentes níveis de iprodione + thiram, sozinhos ou em combinação, foi testada em relação à emergência e taxa de transmissão de *B. sorokiniana* em plântulas de trigo em câmaras de crescimento (Tabela 17).

Tabela 17 - Efeito do tratamento de sementes com antagonistas e diferentes doses de iprodione + thiram sobre a emergência e transmissão de *B. sorokiniana* em plântulas de trigo 'BR 20'.

Antagonista	Emergência (%) ^{1/}					Transmissão (%) ^{2/}				
	Doses de iprodione + thiram (g/100 kg)					Doses de iprodione + thiram (g/100 kg)				
	0	12,5	62,5	125	250	0	12,5	62,5	125	250
	(0%)	(5%)	(25%)	(50%)	(100%)	(0%)	(5%)	(25%)	(50%)	(100%)
TC100	84,7	85,2	92,0	89,9	92,7	26,9aB ^{3/}	10,2aAB	2,5aA	0,0aA	0,0aA
T25	98,6	95,7	85,7	91,1	91,1	31,7abC	25,8abBC	11,4abABC	8,8abAB	0,0aA
P2	85,6	89,0	90,5	89,8	82,2	62,7bC	49,8bcBC	24,8bcAB	23,9bcAB	10,3abA
39/89.19.2	91,6	94,1	95,1	97,5	93,8	64,8bC	45,2bcAB	35,5cAB	32,2bcA	18,9bA
S/A ^{4/}	78,7	80,9	87,0	90,5	89,0	92,5cC	68,8cB	41,7cAB	27,2cA	18,5bA
C.V. (%) =	18,217					36,894				

^{1/} Médias de 5 repetições de 10 sementes cada

^{2/} Obtido através do n° plantas doentes/n° plantas emergidas x 100 em cada tratamento

^{3/} Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey (P = 0,05)

^{4/} controle sem antagonista

A comparação de médias através do teste de Tukey ($P = 0,05$), para a emergência de plântulas de trigo, não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os antagonistas e dosagens do fungicida utilizadas e nem da combinação destes fatores.

Com relação a transmissão de *B.sorokiniana*, foram observadas diferenças altamente significativas para doses de iprodione + thiram e para os antagonistas testados, não se verificando significância estatística para a interação dos mesmos.

Observaram-se diferentes níveis de eficiência dos antagonistas quando aplicados isoladamente na redução de transmissão de *B.sorokiniana*, constatando-se que todos diferiram significativamente da testemunha. A maior eficiência foi obtida para *T. harzianum* TC100 (26,9%), seguido de T25 (31,7%), os quais não diferiram significativamente. A menor eficiência foi observada para *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2) que não diferiram estatisticamente entre si.

O emprego de níveis crescentes de iprodione + thiram, na ausência dos antagonistas, provocou reduções significativas no número de plântulas infectadas pelo patógeno. Estes efeitos, contudo, foram superiores quando da combinação do fungicida com cada antagonista, embora a interação fungicida x antagonistas não tenha sido significativa.

A maior eficiência foi constatada na combinação do fungicida com o isolado TC100, mostrando-se o mais promissor no controle integrado da doença, atingindo níveis de 100% de eficiência em doses a partir de 125g/100 kg de sementes, que corresponde a 50% da dose recomendada comercialmente.

Na dose de 12,5g (5% da dose recomendada), este efeito já foi bastante considerável determinando redução da doença em 89,8%, superior a de iprodione + thiram, na dose de 250g (100% da dose recomendada), quando empregado isoladamente.

A eficácia da mistura é resultado de uma interação sinérgica com $FS > 1$ (COLBY, 1967; SCARDAVI, 1966; GISI et al., 1985), observada para este isolado em todas as dosagens utilizadas do fungicida. Efeitos destas combinações foram também determinados para os demais antagonistas, verificando-se interações sinérgicas ou aditivas para T25 e P2 nas doses de 62,5g, 125g e 250g (equivalentes a 25, 50 e 100%, respectivamente, da dose recomendada) e para *B.subtilis* com dose de 12,5g (5%). As demais combinações, embora tenham sido mais efetivas que quando da aplicação isolada de seus componentes, foram consideradas antagônicas ($FS < 1$), segundo GISI et al. (1985), apresentando a eficácia de controle observada menor que a esperada.

Por ocasião da avaliação da percentagem de transmissão de *B. sorokiniana*, verificou-se a produção abundante de esporos de *Trichoderma* nas raízes e mesocótilos de plântulas sadias e infectadas. Estas plântulas foram desinfestadas superficialmente, submetidas à câmara úmida e avaliadas quanto à frequência da recuperação de *T. harzianum* (T25 e TC100). Os resultados obtidos (Tabela 18) indicaram que as maiores percentagens de recuperação foram verificadas para o isolado TC100, em todas as concentrações de iprodione + thiram, confirmando a tolerância deste antagonista àquele fungicida, mesmo nas doses mais elevadas. Com relação a T25, conquanto sua presença em associação com as plântulas tenha sido verificada, observou-se que esta diminuiu à proporção que se aumentaram as doses do fungicida, não sendo, contudo, inibido mesmo na maior dose.

Tabela 18 - Frequência¹ (%) de *T. harzianum* em raízes e mesocótilo de plântulas de trigo, oriundas e sementes tratadas com o antagonista em doses crescentes de iprodione + thiram, após incubação em câmara úmida.

Isolado	Dosagens de iprodione + thiram (g/100 kg)				
	0 (%)	12,5 (5%)	62,5 (25%)	125 (50%)	250 (100%)
TC ₁₀₀	30,9	27,5	24,4	20,0	27,2
T25	29,8	20,0	17,0	11,6	9,3

¹ Dados obtidos em relação ao número de plântulas emergidas/tratamento

4.5. Eficiência de *T. harzianum* (T25 e TC100) no controle de *B.sorokiniana*, através de diferentes modos de aplicação

4.5.1. Avaliação de eficiência de *T. harzianum* diferentes modos de aplicação na emergência e transmissão de *B.sorokiniana*

Os dados relativos à emergência de plântulas e transmissão a *B.sorokiniana*, através da comparação de diferentes modos de aplicação de *T. harzianum*, são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Efeito do modo de aplicação de *T. harzianum* (T25 e TC) sobre a emergência de plântulas e taxa de transmissão de *B. sorokiniana*, em câmara de crescimento.

Modo de Aplicação	Emergência (%) ^{1/}	Transmissão (%) ^{2/}
<u>Suspensão de esporos</u>		
Semente <i>T. harzianum</i> (T25)	89,0	17,0 ab ³
<i>T. harzianum</i> (TC)	87,0	35,4 bcd
Testemunha	80,3	72,4 d
Solo <i>T. harzianum</i> (T25)	90,7	39,9 bcd
<i>T. harzianum</i> (TC)	88,5	41,4 bcd
Testemunha	79,1	70,1 cd
<u>Substrato de farelo de arroz</u>		
Semente <i>T. harzianum</i> (T25)	90,8	32,1 abcd
<i>T. harzianum</i> (TC)	94,1	32,9 bcd
Testemunha	86,3	67,3 cd
Solo <i>T. harzianum</i> (T25)	76,8	18,0 ab
<i>T. harzianum</i> (TC)	80,4	27,2 abc
Testemunha	84,1	72,1 d
Iprodione + thiram (250 g/100 kg. sem.)	78,5	3,2 a
C.V. (%)	17,607	30,504

^{1/} Médias de 5 repetições de 10 sementes cada

^{2/} Obtido em relação ao n^o plantas doentes/n^o plantas emergidas x 100

^{3/} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05)

As médias obtidas para emergência de plântulas de trigo não indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os modos de aplicação de *T. harzianum*, quando comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; as médias também não diferiram do tratamento fungicida padrão.

Com relação a transmissão de *B.sorokiniana*, as diferenças foram significativas para as modalidades de aplicação e para os antagonistas avaliados, verificando-se que a maior eficiência foi obtida através do tratamento de sementes de trigo com iprodione + thiram, seguido de T25 aplicado na forma de suspensão de esporos ou substrato de farelo de arroz no solo, que reduziram a transmissão do patógeno para 3,2%, 17,0% e 18,0%, respectivamente, não diferindo entre si. T25 foi mais eficiente que TC, considerando as duas modalidades de aplicação acima mencionadas, não diferindo contudo deste isolado quando aplicado na forma de substrato na semente ou suspensão ao solo. A menor eficiência foi obtida através da aplicação da suspensão de ambos os isolados ao solo, os quais não diferiram estatisticamente dos tratamentos controle (água ou substrato, sem *Trichoderma*, aplicados às sementes ou solo).

Avaliaram-se as médias dos efeitos dos antagonistas em cada modalidade de aplicação (Tabela 20) através do seguinte agrupamento: substrato + antagonista na semente, substrato + antagonista no solo, suspensão do antagonista na semente, suspensão do antagonista no solo. Neste novo arranjo obteve-se um delineamento

inteiramente casualizado, com 10 repetições e não foram considerados tratamento químico, nem testemunha.

Tabela 20 - Avaliação da eficiência de diferentes modos de aplicação de *T. harzianum* na transmissão de *B.sorokiniana*.

Modo de Aplicação	Taxa Transmissão ^{1/}
Suspensão na semente	21,5 a ^{2/}
Suspensão no solo	40,7 b
Substrato semente	32,7 ab
Substrato no solo	22,4 a
CV (%) =	11,055

^{1/} Médias de 10 repetições

^{2/} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05)

A comparação das modalidades de aplicação, excluindo o efeito individual dos isolados de *T. harzianum* (TC e T25), indicou que os métodos mais eficazes no controle de *B.sorokiniana* em trigo foram os da aplicação da suspensão do antagonista às sementes (21,5%) e substrato colonizado pelo antagonista ao solo (22,4%), que não diferiram significativamente entre si. A menor eficiência foi obtida através da aplicação da suspensão ao solo com 40,7% de transmissão, que deferiu significativamente dos dois métodos acima mencionados, não diferindo contudo do método de aplicação do substrato às sementes (32,7%).

4.5.2. Avaliação da viabilidade do substrato colonizado por *T.harzianum*

O efeito do período de armazenamento do substrato de farelo de arroz colonizado por *Trichoderma*, na eficácia do controle de *B.sorokiniana* e viabilidade de conídios do antagonista, foi avaliado após 90 dias.

Pelos resultados observados, verificou-se que a eficiência do antagonista foi mantida após este período, reduzindo de 92,5% para 70,9% a incidência de *B.sorokiniana* em sementes de trigo.

Porções do substrato plaqueadas em BDA permitiram a recuperação do antagonista, não se verificando alterações com relação a capacidade de germinação e crescimento micelial do mesmo.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Determinação da incidência de *B.sorokiniana* em diferentes cultivares de trigo

A presença de *B.sorokiniana* foi detectada em sementes das quatro cultivares analisadas, sendo considerado o mais frequente entre os organismos isolados, destacando-se as cultivares 'BR 20', IAPAR 6 Tapejara e IAC 24 como as mais infectadas, com incidências de 92,5%, 92,5% e 91,5%, respectivamente, contrastando com BH 1146 com índice de apenas 0,5%. Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos realizados por diversos autores que ressaltaram a importância de *B.sorokiniana* em sementes de trigo, pela frequência e níveis de infecção encontrados (DIEHL, 1987; NUNES JUNIOR et al., 1986; VECHIATO et al., 1987; MENTEN, 1990; GOULART & PAIVA, 1991 e 1993). A ocorrência de *B.sorokiniana* em sementes de trigo foi também relatada, entre outros, por MEHTA (1978) e FORCELINI et al. (1989), causando sérios prejuízos à cultura e comprometendo a qualidade das suas sementes. A alta incidência, associada à

intensidade dos danos que pode ocasionar ao trigo, evidenciam a importância do patógeno para as regiões tritícolas brasileiras, a depender das condições climáticas e suscetibilidade das cultivares utilizadas (REIS, 1987; BARROS et al., 1984). Além disso, sementes infectadas poderão desempenhar importante papel epidemiológico como fonte de inóculo primário no campo, considerando-se a eficiente transmissibilidade do fungo para órgãos radiculares e aéreos (REIS & FORCELINI, 1993). Com base nestes fatores, admite-se que mesmo uma amostra com baixo índice de infecção poderá tornar-se grave problema para áreas de produção de trigo, onde estas sementes sejam introduzidas.

No presente estudo, além de *B.sorokiniana*, foram identificados diversos microrganismos, alguns já reportados como patogênicos ao trigo, tais como: *Alternaria tenuis*, *Fusarium* spp., *Drechslera* spp., *Phoma* sp. (MEHTA, 1978; BARROS et al., 1984; VECHIATO et al., 1987), outros já encontrados em sementes dessa cultura como *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp. e *Epicoccum* sp., sendo considerados de importância secundária (DIEHL et al., 1985; GOULART & PAIVA, 1991 e 1993).

5.2. Efeito de antagonistas sobre *B.sorokiniana* "in vitro" e associado a sementes de trigo

Entre os potenciais agentes biocontroladores testados no presente estudo, *T. harzianum* (T 25 e TC), *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P.fluorescens* (P2), foram os que controlaram mais eficientemente *B.sorokiniana* através da inibição do crescimento micelial "in vitro" e da redução da incidência e severidade em sementes. De acordo com LUZ (1990), a inibição de *B.sorokiniana* por antagonistas bacterianos "in vitro" é atribuída a provável difusão de produtos tóxicos, embora outros mecanismos que não a ação antibiótica, como acidificação do meio e depleção de nutrientes, possam estar envolvidos. Já com relação a *Trichoderma* spp., a inibição é atribuída à capacidade deste antagonista crescer rapidamente, superpondo a colônia do patógeno e interferindo com o seu desenvolvimento por falta de nutrientes, indicando tratar-se de um saprófita mais agressivo em B.D.A. (BILES & HILL, 1988). Segundo LIFSHITZ et al. (1986), competição por substrato disponível e antibiose podem ser possíveis mecanismos do controle biológico por *Trichoderma* spp. "in vitro". Aliados à estes mecanismos, a característica de produção de odor e não pigmentação para os isolados de *Trichoderma* mais eficazes (T25, TC e T2), observado no presente estudo, pode estar ligado à maior atividade antagônica dos mesmos. CHOUDHURY & OLIVEIRA (1983) e PESSOA (1986), relataram que a característica de ausência de pigmentação parece estar associada com uma maior eficiência de isolados de *Trichoderma*; os autores obtiveram um controle altamente

eficaz de *Pythium aphanidermatum* e *Macrophomina phaseolina*, respectivamente, "in vitro", quando comparados a isolados produtores de pigmentos. A produção de odor típico, denominado "cheiro de côco" é um fenômeno relatado por DENNIS & WEBSTER (1971b), considerado pelos mesmos como uma característica ativa de antagonismo de isolados de *Trichoderma* a *R. solani*.

A avaliação do efeito de antagonistas fúngicos e bacterianos no controle de *B. sorokiniana* em sementes de trigo, através da incidência e severidade, indicou maior eficiência para os isolados *T. harzianum* (T25), *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2), confirmando os resultados dos testes "in vitro", sendo que T25 não diferiu do tratamento químico com a mistura iprodione + thiram. A redução da incidência de patógenos em sementes de trigo e da severidade da podridão comum das raízes foi obtida por LUZ (1989, 1990 e 1991) pela utilização de antagonistas bacterianos, entre os quais isolados de *B. subtilis* e *P. fluorescens* foram considerados eficazes. PESSOA et al. (1991) verificaram o efeito dos antagonistas *Streptomyces* sp., *B. subtilis* e *T. viride* aplicados à sementes de trigo portadoras de *B. sorokiniana*, em laboratório; observaram maior eficiência para o tratamento com *T. viride*, o qual reduziu significativamente a incidência do patógeno, quando comparado aos demais antagonistas empregados, não diferindo estatisticamente do tratamento com o fungicida padrão.

Os resultados obtidos através de análises de correlação simples em cada antagonista, revelaram uma correlação positiva e altamente significativa entre incidência e severidade, o que permite a escolha de qualquer destes métodos para avaliação do efeito de antagonistas no controle de *B.sorokiniana* em sementes de trigo; sugere-se, preferencialmente, a utilização da incidência por tratar-se de um processo mais simples, prático e rápido.

A determinação da viabilidade germinativa de conídios de *B.sorokiniana*, extraídos de sementes de trigo tratadas com *T. harzianum* T25 e TC, revelou um grande efeito supressor destes isolados sobre conídios do patógeno; além da indução das alterações morfológicas mencionadas tais como vacuolação ou desintegração da parede celular (item 3.2.4.), provocou uma drástica redução da capacidade de germinação do fungo em B.D.A., contrastando com os resultados obtidos em conídios de sementes não tratadas. A interação de hifas de *B. sorokiniana* e *T. harzianum* em ágar-água e sobre a superfície de folhas de trigo foi observada por BLAKEMAN & FOKKEMA (1982), através do entrelaçamento de hifas e uma possível penetração. DENNIS & WEBSTER (1971c) determinaram que a vacuolação e coagulação do citoplasma de hifas de *R. solani* e *S. rolfsii* foram induzidas por isolados de *Trichoderma* produtores de antibiótico, mas não por outros. ELAD et al. (1982) verificaram que a desintegração de hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* ocorreu pela ação da enzima $\beta(1,3)$ glucanase, produzida pelo isolado de *T. harzianum* por eles estudado, sugerindo que o principal mecanismo envolvido no antagonismo deste

organismo a fungos fitopatogênicos é a liberação de enzimas líticas. Segundo HENIS & CHET (1979), membros do gênero *Trichoderma* são ativos hiperparasitas, produtores de antibióticos antifúngicos e enzimas líticas, bem como metabólitos voláteis inibidores de esporulação. Pelo exposto, é provável que vários fatores estejam envolvidos com o efeito antagônico dos isolados de *Trichoderma* aqui estudados, em relação a *B.sorokiniana*.

O efeito comparativo do tratamento de sementes com os antagonistas mais eficazes dentro de cada grupo (T25, TC; 39/89.19.2 e P2) e do tratamento químico com iprodione + thiram, em BDA, indicaram que todos os tratamentos exerceram ação sobre *B.sorokiniana* presente nas sementes. Entre os antagonistas testados, T25 e TC foram os mais eficientes, apresentando controle de 100% e 99%, respectivamente, das sementes, seguidos pelo tratamento fungicida, com controle de 88%. Verificou-se ainda que sementes tratadas com estes isolados foram por eles colonizadas, não se observando, contudo, alterações na viabilidade germinativa das mesmas, apresentando 99% das plântulas germinadas e sadias. Reduções significativas foram também observadas em relação aos antagonistas *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2), que proporcionaram um número de plântulas germinadas superiores ao da testemunha, sendo, contudo, menos eficientes que o tratamento químico. Estes resultados evidenciam a possibilidade de indicação destes organismos para o controle do patógeno presente em sementes de trigo. Recentemente, diversos pesquisadores vêm empregando a técnica do tratamento de

sementes com antagonistas, com bastante sucesso, no controle de organismos fitopatogênicos (LUZ, 1989, 1990; KOMMEDAHL & MEW, 1974; WU, 1982; HOMECHIN, 1987; PESSOA, 1986). Este pode constituir um método econômico e importante para proteção das mesmas, em pré e pós emergência das plântulas, necessitando, contudo, da realização de ensaios em casa-de-vegetação ou campo, para comprovação de sua eficiência nestas condições.

A compatibilidade dos isolados de *T. harzianum* (T25 e TC) com os antagonistas bacterianos, *B. subtilis* (39/89.19.2) e *P. fluorescens* (P2), foi determinada no presente estudo, com vistas à recomendação da sua utilização em experimentos futuros, como base para um possível controle integrado. Os resultados demonstraram essa possibilidade, uma vez que as colônias de *T. harzianum* não sofreram nenhuma inibição na presença daqueles antagonistas. HADAR et al. (1984) também constataram a viabilidade da combinação de *T. harzianum* e *T. koningii* com um isolado de *Pseudomonas* sp. produtor de pigmentos fluorescentes, no controle de *Pythium* spp., verificando que o crescimento de ambas as espécies fúngicas permaneceu inalterado na presença daquela bactéria. KWOK et al. (1987), avaliando a interação entre vários antagonistas bacterianos e *T. hamatum* na supressão do "damping-off" causado por *R. solani*, constataram que a combinação deste fungo com *P. putida* ou *P. fluorescens* foi muito mais efetiva no controle do patógeno que quando usados isoladamente. Além destes, outros relatos também indicam a possibilidade da combinação fungo-bactéria para supressão de doenças causadas por

R. solani (JAGER & VELVIS, 1985; MESHARAM, 1984). Esta técnica pode conduzir a resultados promissores no controle de *B. sorokiniana* em trigo.

5.3. Efeito de antagonistas sobre *B. sorokiniana* associado a sementes de trigo em câmara de crescimento

Analisando-se as médias referentes ao solo natural e autoclavado, observa-se que não houve diferença significativa quanto à emergência de plântulas e transmissão de *B. sorokiniana*, independente do substrato utilizado. A semelhança de comportamento para o efeito de antagonistas, controle químico e testemunha dentro do solo natural para aquelas variáveis, pode ser atribuída à uma interação adicional da microflora antagônica indígena, presente naquele solo, atuando conjuntamente com aqueles tratamentos. Resultados semelhantes foram descritos por BARROS et al. (1984), ao verificarem que a manifestação dos sintomas de *B. sorokiniana* em trigo foi mais evidente em plantas cultivadas em solo autoclavado do que naquelas em solo natural, em razão da provável redução da população de microrganismos antagônicos do solo, favorecendo o desenvolvimento do patógeno. Por outro lado, o efeito da atividade observada para os antagonistas e controle químico em solo autoclavado, deveu-se provavelmente à ausência de interferência da microflora indígena do solo, possibilitando que as diferenças estatísticas entre tratamentos pudessem ser detectadas. No presente caso, o tratamento químico manteve uma tendência de maior

eficácia, no controle da doença, embora não tenha diferido estatisticamente de *T. harzianum* (T25) e *B. subtilis* (39/89.19.2). A menor eficiência foi verificada para P2 que, embora não diferindo significativamente dos demais antagonistas, comportou-se de modo semelhante à testemunha.

No tocante às variáveis altura e peso da matéria fresca verificou-se, em solo natural, resposta significativa quanto ao peso das plântulas, quando comparado àquelas cultivadas em solo autoclavado, as quais apresentaram as maiores médias. Com relação ao efeito de antagonistas e do fungicida, constatou-se diferenças significativas entre os mesmos, tendo o controle químico contribuído para maior altura de plântulas, diferindo em ambos os substratos de *P. fluorescens* (P2) *B. subtilis* (39/89.19.2) e da testemunha e em nenhum destes de *T. harzianum* (T25). Efeito semelhante foi observado para a variável peso de matéria fresca, onde o fungicida, apresentou resultados superiores à testemunha, não diferindo, contudo, dos antagonistas testados. O efeito de agentes antagonistas (KLÖPPER & SCHROTH, 1981; MERRIMAN et al., 1974) e de fungicidas (LISKER, 1990; REIS, 1982), entre outras medidas, têm demonstrado ação sobre o crescimento de plantas de trigo, tendo esta resposta sido atribuída ao efeito indireto, associado ao controle de fitopatógenos. Estudos realizados por REIS (1982), embora não tenham revelado efeitos estatisticamente significativos dos diferentes fungicidas em aumentar a emergência de plântulas de trigo, indicaram que o emprego de thiram proporcionou maior desenvolvimento de plantas, quando comparado aos demais produtos químicos

avaliados. O efeito de fatores reguladores de crescimento, aumentando a taxa de germinação e o peso de matéria seca proporcionado por *Trichoderma* spp., tem sido verificado por WINDHAM et al. (1986), em diversas culturas. BROADBENT et al. (1971) também verificaram que a utilização de um isolado de *B. subtilis* (B-13), através do tratamento de sementes, aumentou o crescimento e produção de trigo, entre outras plantas de importância econômica, sendo este efeito atribuído ao amplo espectro da atividade antibiótica deste isolado. Resultados semelhantes foram obtidos por WELLER (1983) ao avaliar o efeito de antagonistas bacterianos no controle de *G. graminis tritici* em plantas de trigo originadas de sementes tratadas com *P. fluorescens* (2-79 RN₁₀), constatando maior crescimento e produção de plantas, além de uma maior redução da doença.

Mediante determinações comparativas da velocidade de emergência, verificou-se maior vigor de plântulas oriundas de sementes tratadas com iprodione + thiram, seguidas em ordem de eficiência por *T. harzianum*, *B. subtilis* e *P. fluorescens*, os quais foram superiores à testemunha. Estes resultados assemelham-se àqueles obtidos por WU (1976), com relação a *T. harzianum*, o qual detectou maior vigor, emergência e altura de plântulas de trigo, através da introdução deste antagonista em solo infestado por *B. sorokiniana*. Segundo este autor, plantas que crescem mais vigorosamente podem tornar-se mais resistentes ao ataque de fungos fitopatogênicos do solo.

Pelo exposto, foi possível constatar que a aplicação destes antagonistas e do fungicida padrão a sementes de trigo, exerce um efeito favorável, proporcionando aumento de vigor de plântulas em câmara de crescimento.

Os resultados com o tratamento microbiológico de sementes de trigo, aqui obtidos, são bastante promissores, tendo em alguns casos, atingido níveis de controle semelhantes àquele do fungicida padrão, inclusive com aumentos significativos na altura e peso de matéria fresca de plântulas. Estas respostas, contudo, não parecem específicas a um tipo de solo, uma vez que estes efeitos foram obtidos em ambos os substratos estudados.

5.4. Eficiência do tratamento químico e biológico, isolados ou em combinação no controle de *B.sorokiniana* em sementes de trigo

Para integração de métodos químicos e biológicos, visando o controle de fitopatógenos, estes sistemas devem ser compatíveis. Desse modo, avaliou-se o efeito do fungicida iprodione + thiram sobre antagonistas "in vitro" e no tratamento de sementes de trigo em câmara de crescimento.

Nos ensaios "in vitro", iprodione + thiram não exerceu qualquer ação tóxica a *P.fluorescens* (P2), em nenhuma das concentrações utilizadas. Conquanto se

trate de um microrganismo intensivamente estudado no controle de inúmeros patógenos, nenhum relato foi encontrado na literatura sobre o efeito de produtos químicos a este antagonista, especificamente. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com LUZ (1993a), que reporta a compatibilidade de bioprotetores bacterianos com a maioria dos fungicidas sintéticos usados nos sistemas de manejo.

Referente a *B. subtilis* (39/89.19.2), entretanto, estes resultados são controvertidos. Enquanto a maioria dos autores refere-se à tolerância deste organismo a diferentes fungicidas (PUSEY et al., 1986; BOCHOW, 1989; UTKHEDE & SMITH, 1991), verificou-se uma alta sensibilidade deste isolado à mistura iprodione + thiram em concentrações a partir de 10 ppm. UTKHEDE & RAHE (1983) também verificaram que o efeito de *B. subtilis* no tratamento de sementes, associado ao fungicida iprodione incorporado ao solo antes do plantio, foi ineficiente para controle de *Sclerotium cepivorum* em cebola.

Com relação a *T. harzianum*, o variante TC100 foi o mais tolerante, apresentando crescimento semelhante à testemunha (sem fungicida), nas concentrações inferiores à 100 ppm, não diferindo, contudo, à esta concentração, daquela imediatamente inferior. Em todas as concentrações verificou-se abundante esporulação do isolado em questão, apresentando todavia, mudanças morfológicas quanto ao aspecto da colônia, que produziu esporos de coloração verde-amarelo, diferente do isolado original (TC). Semelhantemente, ABD-EL MOITY et al. (1982),

verificaram que a exposição de linhagens de *T. harzianum* a diferentes fungicidas, entre os quais iprodione, resultou na seleção de vários isolados resistentes a este produto. PAPAVIDAS et al. (1982), HOMECHIN (1987) observaram a tolerância de isolados de *T. harzianum* a diversos fungicidas, empregados no controle de inúmeros patógenos causadores de doenças, incluindo iprodione, thiram ou a mistura iprodione + thiram. Certa tolerância foi observada, também, para os isolados T25 e TC, sobretudo nas dosagens mais baixas (1 a 10 ppm) verificando-se, contudo, uma maior ação tóxica do produto sobre os mesmos, à medida que se aumentavam as concentrações. Estes efeitos, porém, foram mais drásticos sobre *B. sorokiniana* já a partir de 1 ppm, observando-se uma completa ação inibidora a partir de 50 ppm.

A possibilidade do controle integrado de *B. sorokiniana* através da associação dos antagonistas *T. harzianum* (TC100 e T25), *P. fluorescens* (P2) e *B. subtilis* (39/89.19.2) com iprodione + thiram foi também avaliada em câmara de crescimento. Observaram-se diferentes níveis de eficiência dos antagonistas, quando aplicados isoladamente, na redução da transmissão de *B. sorokiniana*, constatando-se que todos diferiram significativamente da testemunha. Do mesmo modo, o emprego de níveis crescentes de iprodione + thiram, na ausência dos antagonistas, resultou em reduções significativas no número de plântulas infectadas. Estes efeitos, contudo, foram superiores quando da combinação do fungicida com cada antagonista, embora a análise de variância não tenha indicado uma interação significativa para esta combinação. A maior eficiência foi constatada para a combinação do fungicida com

o isolado *T. harzianum* (TC100), mostrando-se o mais promissor no controle integrado da doença, atingindo níveis de 100% de eficiência, em doses correspondentes a 50% daquela recomendada comercialmente. A eficiência da combinação é resultado de uma interação sinérgica (COLBY, 1967; SCARDAVI, 1966; GISI et al., 1985) observada para este isolado em todas as doses utilizadas do fungicida. Com relação a T25 e P2, verificaram-se interações sinérgicas ou aditivas para a maioria das doses utilizadas na combinação, enquanto para *B. subtilis* estes efeitos foram considerados antagônicos para dosagens a partir de 62,5g/100 kg de sementes, apesar de se ter obtido resultados superiores ao emprego de cada componente, isoladamente.

Considerando a eficiente redução na transmissão semente-plântula em sementes de trigo com 92,5% de incidência de *B. sorokiniana*, para os tratamentos utilizados, admite-se que os resultados alcançados são bastante favoráveis, uma vez que inúmeros trabalhos, indicam que o efeito do tratamento de sementes de trigo com *B. sorokiniana* é significativo somente em lotes com baixa infecção (BARROS et al., 1983; REIS et al., 1988; FORCELINI, 1992).

Um dos pré-requisitos para se considerar um bom antagonista é a capacidade que este possui para proteger as sementes e raízes. A maioria dos trabalhos indica eficiência somente para o primeiro caso. Neste estudo, entretanto, verificou-se que *T. harzianum* (TC e T25) protegeu não apenas as sementes, mas

também as raízes e mesocótilo da plântula, contra *B. sorokiniana*, desenvolvendo-se abundantemente sobre tecidos do hospedeiro mesmo após desinfestação superficial com NaOCl. Sua presença foi verificada em plantas saudas e doentes, não se detectando qualquer alteração nas plântulas saudas. A percentagem de recuperação destes isolados, em plântulas de trigo, é atribuído à capacidade de colonizar a rizosfera, sendo denominada "rizosfera-competência". Segundo AHMAD & BAKER (1987), alguns isolados de *T. harzianum* obtidos através de mutação induzida, têm se mostrado "rizosfera-competentes", colonizando raízes de plantas, proporcionando, conseqüentemente, uma proteção mais duradoura no controle de doenças. Essa característica elimina potencialmente o problema de adição de grandes quantidades de inóculo para induzir supressão da doença, uma vez que o substrato provido pelo hospedeiro pode sustentar sua atividade. DEWAN & SIVASITHAMPARAM (1988) verificaram a ocorrência natural de *T. harzianum* em raízes de trigo, em campos de cultivo na Austrália, tendo este antagonista exercido um efeito marcante na redução da mortalidade de plântulas de trigo, inoculadas com o agente do mal de pé em solos natural e esterilizado.

Pela evidência dos resultados obtidos, a combinação de antagonistas com doses subletais de fungicidas parece viável, podendo resultar em maior eficiência no controle de doenças redução da dose do produto, redução dos custos e permitindo seu uso em culturas menos rentáveis. Para tanto, a obtenção de antagonistas tolerantes a fungicidas poderá ser de grande importância para o controle de doenças de plantas, visando a utilização futura de sistemas de manejo integrado, a nível de campo.

5.5. Eficiência de *T. harzianum* (T25 e TC) no controle de *B.sorokiniana* através de diferentes métodos de aplicação

Segundo MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986) o desenvolvimento de métodos práticos e eficientes de aplicação de microrganismos antagônicos é tão importante quanto à identificação de antagonistas superiores. No presente estudo, avaliou-se o efeito de T25 e TC, através de diferentes métodos de aplicação, sobre a emergência e transmissão de *B.sorokiniana* em relação a plântulas de trigo, em câmara de crescimento. No que se refere a emergência, não foram verificadas diferenças entre antagonistas e métodos de aplicação utilizados que, por sua vez, não diferiram da observada para controle químico e testemunhas. Resultados semelhantes foram obtidos por NEYPES et al. (1988), que constataram que preparações de *T. glaucum*, incorporadas ao solo ou às sementes, não exerceram efeito sobre a emergência de plântulas de trigo, quando comparado ao tratamento químico e à testemunha.

Com relação à transmissão, o uso de *T. harzianum* aplicado às sementes, como suspensão de conídios, ou ao solo, em substrato de farelo de arroz, foram considerados os mais eficientes, não diferindo entre si, nem do tratamento com o fungicida padrão iprodione + thiram. A aplicação do substrato + antagonista na semente ou suspensão de conídios no solo não se mostraram satisfatórios, proporcionando transmissão semelhante aos tratamentos controle.

A eficiência de aplicação de suspensões conidiais de *T. viride*, em sementes de trigo contaminadas por *B. sorokiniana*, foi determinada por PESSOA et al. (1991), sendo o controle de transmissão do patógeno para plântulas superior ao obtido para iprodione + thiram. NEYPES et al. (1988) não encontraram diferenças quanto a eficiência de controle da podridão do pé de trigo, quando da aplicação de preparação de *T. glaucum* em sementes ou solo, tendo ambos os métodos se mostrado superiores ao tratamento com fungicidas, resultando em maior produção para a cultura. Por outro lado, PAPAVIDAS et al. (1984) reportaram que *Trichoderma* spp., incorporado ao solo numa base nutritiva, proporcionou melhor controle que suspensões de conídios, aplicadas sem a adição de nutrientes. Segundo ELAD et al. (1980), a eficiência de *T. harzianum* depende do tipo de inóculo e modo de aplicação, tendo verificado que preparações de farelo de trigo, colonizadas por este antagonista, foram mais eficientes que a suspensão conidial para o controle de *S. rolfsii* e *R. solani* em feijão.

Ainda com relação a transmissão, o controle de *B. sorokiniana* variou entre os dois isolados de *T. harzianum* testados, sendo T25 considerado o mais eficaz quando aplicado às sementes na forma de suspensão ou em substrato no solo. Estes resultados sugerem a existência de mecanismos distintos de antagonismo. MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986) também verificaram diferenças de comportamento entre isolados de *Trichoderma* spp. empregados no controle de *R. solani* em rabanete, quando comparados dentro de um mesmo método de aplicação. De acordo com

DENIS & WEBSTER (1971a), existe uma variação considerável dentro de *T. harzianum* e entre espécies de *Trichoderma* com relação a substâncias inibidoras, o que se deve a existência de diferentes raças.

A semelhança dos isolados (T25 e TC), quando aplicados na forma de substrato nas sementes ou suspensão no solo, se deve a baixa eficácia destes métodos, uma vez que o tratamento de sementes com substrato não permitiu uma aderência e distribuição uniforme do inóculo, enquanto a aplicação da suspensão no solo é considerada uma técnica inadequada, uma vez que o antagonista, não tendo substrato para nutrir-se, diminui sua habilidade competitiva e capacidade de sobrevivência, razão pela qual estes sistemas não diferiram significativamente dos tratamentos testemunha. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por MIHUTA-GRIMM & ROWE (1986), ao sugerirem que a causa da baixa eficiência de algumas técnicas pode estar ligada a má distribuição do inóculo às sementes ou às adversidades do meio a que é submetido o antagonista, quando aplicado diretamente ao solo sem nenhuma base nutritiva.

A viabilidade de *T. harzianum* foi mantida por 3 meses, em substrato de farelo de arroz, estocado à temperatura ambiente a aproximadamente 28°C, preservando o fungo sua habilidade de biocontrole. A eficiência do substrato de farelo de arroz foi relatada por HOMECHIN (1987), ao comparar diversas formulações para cultivo de *T. harzianum*, sendo este substrato considerado o mais favorável para

manter a habilidade antagonista desse fungo. Estes resultados foram aqui confirmados, restando apenas o desenvolvimento de uma técnica adequada para aplicação deste substrato às sementes.

O uso de substratos no solo, embora eficiente, torna-se desvantajoso pela necessidade da grande quantidade a ser usada. Já a aplicação às sementes apresenta a inconveniência de não se distribuir uniformemente, diminuindo sua eficácia. Por outro lado, a imersão das sementes em suspensões de conídios, mais prática e eficiente, torna-se inviável devido à necessidade de ser usado o inóculo recém-preparado. Considerando a impraticabilidade do uso destas preparações em sistemas agrícolas, uma formulação que permita maior tempo de estocagem e facilidade de aplicação torna-se necessária. O ideal seria o emprego de substrato às sementes, de modo que estas fossem eficientemente protegidas e uniformemente revestidas, o que uniria a vantagem de se poder estocar por períodos maiores, além de ser mais prático, econômico e adaptável à mecanização, aliado ao fato de poder ser usado em combinação com fungicidas.

6 - CONCLUSÕES

Do presente trabalho pode-se concluir que:

(1) *B. sorokiniana* foi o mais frequente entre os fungos isolados de sementes apresentando alta incidência nas cultivares de trigo analisadas, confirmando sua importância à esta cultura;

(2) Os antagonistas à *Bipolaris sorokiniana*, *Trichoderma* spp., *B. subtilis* e *Pseudomonas* spp., utilizados no teste de inibição "in vitro" e na redução de incidência e severidade em sementes de trigo, apresentam comportamento variável, sendo verificado que isolados de um mesmo antagonista apresentam variação na sua ação inibidora;

(3) Os antagonistas *T. harzianum* (T25 e TC), *P. fluorescens* (P2) e *B. subtilis* (39/89.19.2) foram os que controlaram mais eficientemente *B. sorokiniana* através de inibição "in vitro" e redução da incidência e severidade em sementes, mostrando-

se T25 e TC os mais promissores para controle do patógeno em sementes de trigo em BDA;

(4) Os isolados T25 e TC de *T. harzianum* apresentaram efeitos sobre conídios de *B. sorokiniana*, induzindo a formação de vacúolos e desintegração da parede celular, além de uma intensa inibição da germinação em BDA;

(5) Os isolados T25 e TC de *T. harzianum* foram compatíveis com os antagonistas bacterianos *P. fluorescens* (P2) e *B. subtilis* (39/89.19.2) testados, sendo possível a integração dos mesmos para controle de *B. sorokiniana*;

(6) O tratamento microbiano de sementes de trigo não afetou a emergência de plântulas, mas proporcionou reduções na transmissão e aumento do vigor, altura e peso de matéria fresca de plântulas, em condições de câmara de crescimento; estas respostas, contudo, não parecem específicas em solo natural e autoclavado, sendo estes efeitos obtidos em ambos os substratos utilizados;

(7) Os antagonistas P₂ e TC100 foram tolerantes ao fungicida iprodione + thiram "in vitro", enquanto T25, TC e 39/89.19.2 apresentaram tolerância moderada, variando quanto ao grau de sensibilidade, segundo as concentrações utilizadas;

(8) A combinação dos antagonistas *T. harzianum* (T25, TC100), *P. fluorescens* (P2) e *B. subtilis* (39/89.19.2) com o fungicida aumentou a eficiência do controle de *B. sorokiniana* associado a semente de trigo, mesmo em baixas concentrações do produto;

(9) A combinação do fungicida com os isolados T25 e TC100 no tratamento de sementes de trigo, exibiu um efeito sinérgico, o que deve permitir uma redução significativa na quantidade de fungicida necessário para efetuar o controle de *B. sorokiniana*;

(10) Os métodos de aplicação de *T. harzianum* (T25 e TC) exerceram influência na transmissão de *B. sorokiniana* em plântulas de trigo, sendo o tratamento de sementes com suspensão de conídios ou aplicação no solo de substrato de farelo de arroz colonizado pelo antagonista os mais efetivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL MOITY, T.H.; PAPAVIDAS, G.C.; SHATLA, M.N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot onion. *Phytopathology*, Lancaster, 72:346-400, 1982.

AHMAD, J.S. & BAKER, R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, Lancaster, 77:182-9, 1987.

ALCORN, J.L. The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 26:37-56, 1988.

ANWAR, A.A. Factors affecting the survival of *Helminthosporium sativum* and *Fusarium lini* in soil. *Phytopathology*, 68:1005-19, 1978.

BAILEY, W.R. & SCOTT, C.G. **Diagnostic microbiology**. Saint Louis, C.V. Mosby, 1974. 414p.

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

BAKER, K.F. & COOK, J.R. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco, W.H. Freeman, 1974. 433p.

BAKER, R.; ELAD, Y.; CHET, T. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. **Phytopathology**, Lancaster, **74**:1019-21, 1984.

BARROS, B.C.; KRUGNER, T.L.; VALARINI, P.J. Efeito da infestação do solo com *Helminthosporium sativum* P.K. & Berk. sobre o desenvolvimento de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, **10**(1/2):171-9, 1984.

BARROS, B.C.; SALGADO, C.L.; LASCA, C.C. Ação de fungicidas "in vitro" sobre a germinação e microflora de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, **9**:118-27, 1983.

- BARROS, B.C.; VALARINI, P.J.; CASTRO, J.L.; FERREIRA FILHO, A.W.P.; FREGONEZI, L.E. Eficiência de alguns fungicidas no controle da ferrugem da folha do trigo (*Triticum aestivum* L.). *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, **8**(1/2):116-32, 1982.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, Lancaster, **72**:379-82, 1982.
- BILLES, C.L. & HILL, J.P. Effect of *Trichoderma harzianum* on sporulation of *Cochliobolus sativus* on excised wheat seedling leaves. *Phytopathology*, Lancaster, **75**:656-9, 1988.
- BLAKEMAN, J.P. & BRODIE, J.D.S. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. In: DICKSON, C.H.; PREECE, T.F. *Microbiology of aerial plant surfaces*, London, Academic Press, 1976. p.529-57.
- BLAKEMAN, J.P. & FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, **20**:167-92, 1982.
- BOCHOW, H. Use of microbial antagonists to control soil borne pathogens in greenhouse crops. *Acta Horticulturae*, The Hague, **255**:271-80, 1989.

- BOLLEN, G.J. Fungicide resistance and microbial balance. In: DEKKER, J. & GEORGEPOULOS, S.G. **Fungicide resistance in crop protection.** Wageningen, Centre for Agric. Publish. Document., 1982. p.161-76.
- BRIAN, P.W. & HEMMING, H.G. Gliotoxin: a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. **Phytopathology**, Lancaster, **35**:218-21, 1945.
- BROADBENT, P.; BAKER, K.F.; WATERWORTH, Y. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. **Australian Journal Biological Sciences**, East Melbourne, **24**:925-44, 1971.
- BROWN, M.E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, **12**:181-97, 1974.
- BURPEE, L.L. The influence of abiotic factors on biological control of soilborne plant pathogenic fungi. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, **12**:308-17, 1990.
- CAMPBELL, N.P. The influence of associated microorganisms on the pathogenicity of *Helminthosporium sativum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **34**:865-74, 1956.

CARDOSO, E.J.B.N. & KIMATI, H. Doenças do trigo. In: GALLI, F. coord. **Manual de fitopatologia**. 2.ed. São Paulo, Ceres, 1980. v.2, p.553-73.

CHANG, Y.C.; CHANG, Y.C.; BAKER, R.; KLEIFELD, O.; CHET, I. Increased growth of plant induced by biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, St. Paul, **70**:145-8, 1986.

CHET, I. & BAKER, R. Isolation and biocontrol potencial of *Trichoderma hamatum* from soil naturally supressive of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Lancaster, **71**:286-90, 1981.

CHIDAMBARAM, P.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Identification of seed-borne *Drechslera* species. **Friesia X**, Copenhagen, **3**:165-207, 1973.

CHOUDHURY, M.M. & OLIVEIRA, J. de S. Ação antagônica in vitro dos isolados de *Trichoderma* spp. a *Pythium aphanidermatum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **8**:568, 1983.

CHU, F.F. & WU, W.S. Biological and chemical control of *Rhizoctonia solani* by pea seed treatment. **Memories of the College of Agriculture National Taiwan University**, Taipei, **21**:19-28, 1981.

COLBY, S.R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds*, Champaign, **15**:20-2, 1967.

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

CUBETA, M.A.; HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. *Plant Disease*, St. Paul, **69**:506-9, 1985.

CUNFER, M.B. Microorganisms as seed treatment. In: SEED PATHOLOGY INTERNATIONAL ADVANCED COURSE, 7., Passo Fundo, 1987. Passo Fundo, EMBRAPA/CNPT, 1987. p.166-7.

DAINES, R.H. Antagonistic action of *Trichoderma* on *Actinomyces scabies* and *Rhizoctonia solani*. *American Potato Journal*, Washington, **14**:85-93, 1937.

DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions British Mycological Society*, London, **57**:25-39, 1971a.

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

DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. **Transactions British Mycological Society**, London, **57**:363-9, 1971c.

DEWAN, M.M. & SIVASITHAMPARAM, K. Identity and frequency of occurrence of *Trichoderma* spp. in roots of wheat and rye-grass in Western Australia and their effect on root rot caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Plant and Soil**, The Hague, **109**:93-101, 1988.

DIHEL, J.A. **Doenças de raízes do trigo**. Passo Fundo, EMBRAPA/CNPT, 1982a. 15p. (EMBRAPA/CNPT. Circular Técnica, 15).

DIEHL, J.A. Podridão comum. In: OSÓRIO, E.A., coord. **Trigo no Brasil**, Campinas, Fundação Cargill, 1982b. p.501-7.

DIEHL, J.A.; BACALTHUCK, B.; FERREIRA FILHO, A. Fungos patogênicos presentes em sementes de trigo no Rio Grande do Sul e Paraná. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, **7**:81-9, 1985.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, Lancaster, **61**:42-4, 1971.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* in strawberry fields by *Trichoderma harzianum*. *Plant and Soil*, The Hague, **60**:245-54, 1981.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, **28**:719-25, 1982.

ELAD, Y.; CHET, J.; KHATAN, J. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, Lancaster, **70**:119-21, 1980.

FLENTJE, N.T.; SAKSENA, H.K. Pre-emergence rotting peas in South Australia. III. Host-pathogen interaction. *Australian Journal of Biological Sciences*, East Melbourne **17**:665-75, 1964.

FORCELINI, C.A. Incidência, transmissão e controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. Piracicaba, 1992. 114p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- FORCELINI, C.A. Tratamento de sementes de trigo no Brasil. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES. 2., Piracicaba, 1991. p.247-264.
- FORCELINI, C.A.; ECCO, M.; REIS, E.M.; MENTEN, J.O.M. Controle de *Drechslera sorokiniana* pelo tratamento de sementes de trigo com fungicidas. In: REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 5., Cornélio Procópio, 1989. Ata. Cotia, C.A. Cotia, 1989. p.10.
- GARRET, S.D. Toward biological control of soil-borne plant pathogens. In: BAKER & SNYDER. Ecology of soil-born plant pathogens. 2.ed. Berkeley, Univ. Calif. Press, 1965. p.3-17.
- GISI, U.; BINDER, H.; RIMBACH, E. Synergistic interaction of fungicides with different modes of action. Transactions British Mycological Society, London, 85:299-306, 1985.
- GOULART, A.C.P. Doenças do trigo em Mato Grosso do Sul. Dourados, EMBRAPA-UEPAE, 1991. 56p. (EMBRAPA-UEPAE. Circular Técnica, 21).

GOULART, A.C.P. & PAIVA, F. de A. Associação de *Helminthosporium sativum* com sementes de trigo com ponta preta". In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO TRIGO, 16., Dourados, 1991. **Resumos**. Dourados, EMBRAPA/UEPAE, 1991. p.85.

GOULART, A.C.P. & PAIVA, F. de A. Incidência de fungos em sementes de trigo (*Triticum aestivum*) produzidas em Mato Grosso do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **18**:107-9, 1993.

GRAHAM-WEISS, L.; BENNET, M.L.; PAAR, A.S. Production of bacterial inoculant by direct fermentation on nutrient supplemented vermiculite. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, **53**:2138-41, 1987.

HADAR, Y.; CHET, A.; BAKER, R. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Lancaster, **69**:64-8, 1979.

HADAR, Y.; HARMAN, G.E.; TAYLOR, A.G. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. **Phytopathology**, Lancaster, **74**:106-10, 1984.

HARMAN, G.E.; CHET, I.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Lancaster, **70**:1167-72, 1980.

HENIS, Y. & CHET, I. Microbiological control of plant pathogens. **Advances in Applied Microbiology**, New York, **19**:85-111, 1979.

HENIS, Y.; GHAFFAR, A.; BAKER, R. Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: effect of successive plantings, PCNB and *Trichoderma harzianum* on pathogen disease. **Phytopathology**, Lancaster, **68**:900-7, 1978.

HENIS, Y.; ADAMS, P.B.; LEWIS, J.A.; PAPAVIDAS, G.C. Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, **73**:1043-46, 1983.

HILL, J.P. & BILES, C.L. Effect of low concentration of imazalil on infection efficiency and sporulation capacity of *Cochliobolus sativus* on wheat seedlings. **Phytopathology**, Lancaster, **74**:852, 1984.

HOMECHIN, M. Potencial e emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma* sp. Piracicaba, 1987. 160p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

HOWELL, C.R. & STIPANOVIC, R.D. Suppression of *Pythium ultimum* - induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. **Phytopathology, Lancaster**, **70**:712-5, 1980.

JAGER, G. & VELVIS, H. Biological control of *Rhizoctonia solani* on potatoes by antagonists. 4. Inoculation of seed tubers with *Verticillium biguttatum* and other antagonists in field experiments. **Netherlands Journal Plant Pathology, Wageningen**, **91**:46-83, 1985.

KADO, C.I. **Methods of plant bacteriology**. Davis, Univ. of California, 1971. 86p.

KADO, C.J. & HESKETT, M.S. Seletive media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology, Lancaster**, **60**:969-76, 1970.

KLEIFELD, O. & CHET, I. *Trichoderma harzianum* interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil, The Hague**, **114**:267-72, 1992.

KLÖPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology, Lancaster**, **71**:642-4, 1981.

KLÖPPER, J.W.; SCHROTH, M.N.; MILLER, T.D. Effects of rhizosphere colonization by plant-growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, Lancaster, **70**:1078-82, 1980.

KOMMEDAHL, T. & MEW, J.C. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. *Phytopathology*, Lancaster, **65**:296-300, 1975.

KOMMEDAHL, T. & WINDELS, C.E. Evaluation of biological seed treatment with antagonists. *Phytopathology*, Lancaster, **68**:1087-95, 1978.

KWOK, O.C.H.; FAHY, P.C.; HOITINK, H.A.J.; KUTER, G.A. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology*, Lancaster, **77**:1206-12, 1987.

LARSON, R.I. & ATKINSON, T.G. A cytogenetic analysis of reaction to common root in some hard red spring wheats. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, **48**:2059-67, 1970.

LASCA, C.C.; VECHIATO, M.H.; SCHMIDT, J.R. Seleção de métodos para detecção de *Helminthosporium sativum* em sementes de trigo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, **13**:14, 1987.

LELLIOTT, R.A. & STEAD, D.E. **Methods of the diagnosis of bacterial diseases of plants.** Oxford, Blackwell Scientific, 1987. 216p.

LIFSHITZ, R.; WINDHAM, M.T.; BAKER, R. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, **76**:720-5, 1986.

LISKER, N. Improving wheat seedling emergence by seed-protectant fungicides. **Crop Protection**, Guildford, **9**:439-45, 1990.

LUZ, W.C. da. Mancha marrom. In: OSÓRIO, E.A. coord. **Trigo no Brasil.** Campinas, Fundação Cargill, 1982. p.525-9.

LUZ, W.C. da. Perspectivas de bacterização das sementes para o controle biológico das doenças do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **14**:115, 1989

LUZ, W.C. da. Microbiological control of *Bipolaris sorokiniana* "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **15**:246-7, 1990.

LUZ, W.C. da. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1991. cap. 3, p.25-31.

LUZ, W.C. da. Controle biológico do mal-do-pé do trigo pelo tratamento de sementes. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, **18**:82-5, 1993a.

LUZ, W.C. da. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. *RAPP*, Passo Fundo, **1**:33-77, 1993b.

LUZ, W.C. DA; LUZZARDI, G.C.; SANTIAGO, J.C. Importância de *Helminthosporium sativum* P.K.B. em sementes de trigo no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL CONJUNTA DE PESQUISA DE TRIGO, 8., Ponta Grossa, 1976. Passo Fundo, EMBRAPA/CNPT, 1976. v.4, p.115-9.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W.R. da. Avaliação da qualidade de sementes. Piracicaba, FEALQ, 1987. 230p.

McKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, Lahore, **26**:195-217, 1923.

MEHTA, Y.R. & NAZARENO, N.R.X. de. *Patologia do trigo*. Londrina, IAPAR, 1976. 36p.

MEHTA, Y.R. *Doenças do trigo e seu controle*. São Paulo, Ceres, 1978. 190p..

MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes, detecção, danos e controle químico.**

Anais. Piracicaba, FEALQ. 1991. 321p.

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**. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **1:57-66**, 1976.

MENTEN, J.O.M. Testes de sanidade de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, 1., Piracicaba, 1988.

Palestras. Piracicaba, FEALQ, 1988. 76p.

MERRIMAN, P.R.; PRINCE, R.P.; KOLLMORGEN, F.; PIGGOTT, T.; RIDGE,

E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, **25:219-26**, 1974.

MESHAM, S.W. Suppressive effect of *Azotobacter chroococcum* on *Rhizoctonia solani* infestation of potatoes. **Netherlands Journal of Plant Pathology**,

90:127-32, 1984.

- MIHUTA-GRIMM, L. & ROWE, R.C. *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery system. *Phytopathology*, Lancaster, **76**:306-12, 1986.
- MOURA, A.B. Detecção e quantificação de *Pseudomonas syringae* cv. *lachrymans* em lotes de sementes de pepino. Viçosa, 1992. 57p. (M.S. - Universidade Federal de Viçosa).
- NASSER, L.C.B. Testes de sanidade de sementes de trigo. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S. *Patologia de sementes*. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p.469-79.
- NEAL JR., J.L.; LARSON, R.J.; ATKINSON, T.G. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant and Soil*, The Hague, **39**:209-12, 1973.
- NEERGAARD, P. *Seed pathology*. London, McMillan Press, 1979. v.1, 889p.
- NEYPES, M.V.; LAPIS, D.B.; TELAN, I.F. *Trichoderma glaucum* Abbot for biological control of foot rot of wheat caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *The Philippine Agriculturist*, Laguna, **71**(2):157-63, 1988.

NOBLE, M. & RICHARDSON, M.J. An annotated list of seed-borne diseases.

Kew, C.M.I., 1968. 191p.

OLD, K.M. Fungistatic effects of soil bacteria on root-rotting fungi with particular reference to *Helminthosporium sativum*. *Phytopathology*, Lancaster, **55**:901-5,

1965.

PAPAVIZAS, C.G. & LEWIS, J.A. Induction of new biotypes of *Trichoderma harzianum* resistant to benomyl and other fungicides. *Phytopathology*,

Lancaster, **71**:247-8, 1981.

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*, Lancaster, **72**:126-132, 1982.

PAPAVIZAS, G.C.; DONN, M.T.; LEWIS, J.A.; BEAGLE-RISTAINO, J. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi.

Phytopathology, Lancaster, **74**:1171-75, 1984.

PATIL, I.S.; KULKARNI, S.; HEDGE, R.K. Antagonistic action of species of *Trichoderma*, *Bacillus* and *Streptomyces* on *Drechslera sorokiniana* (Sacc.)

Subram. & Jain. *Pesticides*, Bombay, **22**, 1987.

PAULITZ, T.; WINDHAM, M.; BAKER, R. Effect of peat: vermiculite mixes containing *Trichoderma harzianum* on increased growth response of radish. **Journal American Society Natural Science**, Washington, **111**:810-4, 1986.

PESSOA, M.N.G. Detecção e localização de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) - controle químico e biológico. Recife. 1986. 176p. (Mestrado - Universidade Federal Rural de Pernambuco).

PESSOA, M.N.G.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; MENTEN, J.O.M. Controle de *Helminthosporium sativum* através do tratamento biológico de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, **17**(1):22, 1991.

PUNJA, Z.K.; GROGAN, R.G.; UNRUH, T. Comparative control of *Sclerotium rolfsii* of golf greens in northern California with fungicides, inorganic salts and *Trichoderma* spp. **Plant Disease**, St. Paul, **66**:1125-8, 1982.

PUSEY, P.L.; WILSON, C.L.; HOTCHKISS, M.W.; FRANKLIN, J.D. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown with commercial fruit waxes, dicloran and cold-storage conditions. **Plant disease**, St. Paul, **70**:587-90, 1986.

- RANGASWAMI, G. & RAMALINGAM, M. Survival of *Helminthosporium oryzae* in soil and its inhibition by *Bacillus mycoides*. **Phytopathology**, Lancaster, **52**:347-51, 1962.
- RECH FILHO, E.L. Efeito antagônico de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* a fungos patogênicos. Brasília, 1983. 52p. (Mestrado - Universidade de Brasília).
- REIS, E.M. Sementes de trigo infectadas por *Helminthosporium sativum*: fonte de inóculo para podridão comum das raízes e seu controle pelo tratamento de fungicidas. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, **8**(1/2):29-38, 1982.
- REIS, E.M. **Patologia de sementes de cereais de inverno**. São Paulo, EMBRAPA/CNDA, 1987. 32p.
- REIS, E.M. Infectividade de propágulos de *Helminthosporium sativum* no solo do trigo. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO TRIGO, 15., Passo Fundo, 1978, Resumos. Passo Fundo, EMBRAPA/CNPT, 1988. p.157.
- REIS, E.M. Controle biológico do mal-do-pé do trigo. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1991. cap. 20, p.295-301.

REIS, E.M. & FORCELINI, C.A. Transmissão de *B. sorokiniana* em sementes para órgãos radiculares e aéreos do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **18**:76-85, 1993.

REIS, E.M.; PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M.C. **Estratégias para o controle de doenças do trigo**. Passo Fundo, EMBRAPA/CNPT, 1988. 50p. (EMBRAPA/CNPT. Documentos, 7).

RICHARDSON, M.J. **An annotated list of seed-borne diseases**. 3.ed. s.1. CAB/CMI/ISTA, 1979. 320p.

SANFORD, G.B. Some soil microbiological aspects of plant pathology. **Science Agriculture**, University Park, **13**:638-41, 1933.

SANFORD, G.B. & CORMACK, M.W. Viability in association effects of other soil fungi on the virulence of *Helminthosporium sativum* in wheat seedlings. **Canadian Journal of Research**, Ottawa, **18**:562-5, 1940.

SAWANT, J.S. & MUKHOPADHYAY, A.N. Integration of metalaxyl with *Trichoderma harzianum* for the control of *Pythium* damping-off in sugarbeet. **Indian Phytopathology**, New Delhi, **43**:535-41, 1990.

SCARDAVI, A. Synergism among fungicides. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, **4**:335-48, 1966.

SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. **Phytopathology**, Lancaster, **72**:111-5, 1982.

TAYLOR, A.G. & HARMAN, G.E. Concepts and technologies of selected-seed treatments. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, **28**:321-39, 1990.

TVIET, M. & MOORE, M.B. Isolates of *Chaetomium* that protect oats from *Helminthosporium victoriae*. **Phytopathology**, Lancaster, **44**:686-9, 1954.

UTKHEDE, R.S. & SMITH, E.M. Biological and chemical treatments for control of *Phytophthora* crown and root rot caused by *Phytophthora cactorum* in a high density apple orchard. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, **13**:267-70, 1991.

UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.E. Interactions of antagonists and pathogens in biological control of onion white rot. **Phytopathology**, Lancaster, **73**:890-3, 1983.

- VECHIATO, M.H.; LASCA, C.C.; VALARINI, P.J. Sobrevivência do fungo *Helminthosporium sativum* in sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) armazenadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 12:226-31, 1987.
- WEIDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, Lancaster, 24:1153-79, 1934.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, 26:379-407, 1988.
- WELLER, D.M. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. **Phytopathology**, Lancaster, 73:1548-53, 1983.
- WELLER, D.M. & COOK, R.J. Suppression of take-all of wheat by seed-treatment with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, Lancaster, 73:463-9, 1983.
- WELLS, H.D.; BELL, D.K.; JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control for *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Lancaster, 62:442-7, 1972.

WILKINSON, H.T.; WELLER, D.M.; ALDREDGE, J.R. Enhanced biological control of wheat take-all when inhibitory *Pseudomonas* strains are introduced on inocula or seed as opposed to directly into soil. **Phytopathology**, Lancaster, **72**:948-9, 1982.

WINDHAM, M.T.; ELAD, Y.; BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, **76**:518-21, 1986.

WU, W.S. Biological control of seed and soil-borne fungi associated with wheat and oats. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, Taipei, **17**:161-8, 1976.

WU, W.S. Seed treatment by applying *Trichoderma* sp. to increase the emergence of soybeans. **Seed Science and Technology**, Wageningen, **10**(3):557-63, 1982.