OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS BIÓTIPOS DE
Trichoderma harzianum, RIFAL,
RESISTENTES A BENZIMIDAZÓIS, ATRAVÉS DA LUZ ULTRAVIOLETA

ANTONIO CARLOS FERREIRA DA SILVA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

Dissertação apresentada à Es-
cola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Univer-
sidade de São Paulo, para ob-
tenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de concentra-
ção: Genética e Melhoramento
de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1991

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

S586o Silva, Antonio Carlos Ferreira da
Obtenção e caracterização de novos biótipos de Trichoderma
harzianum, Rifai, resistentes a benzimidazóis, através da luz
ultravioleta. Piracicaba, 1991.
133p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Alface - Doença - Controle biológico 2. Fungo para controle
biológico 3. Hifomiceto - Melhoramento 4. Hifomiceto - Mutação in
duzida 5. Hifomiceto - Radiação ultravioleta 6. Hifomiceto - Re -
sistência ao fungicida 7. Podridão de esclerotinia em alface -
Controle biológico I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei
roz, Piracicaba.

CDD 589.24

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS BIÓTIPOS
DE *Trichoderma harzianum*, RIFAI,
RESISTENTES A BENZIMIDAZÓIS, ATRAVÉS DA LUZ ULTRAVIOLETA

ANTÔNIO CARLOS FERREIRA DA SILVA

Aprovado em: 12/06/1991

Comissão julgadora:

Dr. Itamar Soares de Melo

CNPDA/EMBRAPA

Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

ESALQ/USP

Dra. Raquel Ghini

CNPDA/EMBRAPA

Aos meus avós

Antonio e Amélia

e à minha mãe

Lourença (in memoriam)

Minha homenagem.

Ao meu Pai

às minhas Irmãs

à minha Tia

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

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

- Ao Dr. Itamar Soares de Melo, pela orientação, amizade e confiança constantes;
- Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas, pela preciosa convivência e colaboração constantes;
- Aos Professores, Funcionários e Amigos do Departamento de Genética, pelo saudável convívio;
- À Bibliotecária Kátia Maria Andrade Ferraz, pelo auxílio na revisão das Referências Bibliográficas;
- Aos Engenheiros Agrônomos Ila Cardim Rêgo e Cecílio Viegas Soares, pela confecção das análises estatísticas e amizade;
- À Tânia Marta dos Santos, Engenheiro Agrônomo, MS, pelas sugestões e amizade;
- À Bióloga, MS, Ana Maria R. Cassiolato pela colaboração, sugestões e carinhosa amizade;
- À Bióloga Nirlei Ap. da Silva pela colaboração e amizade;

- À Eri Saito, Engenheiro Agrônomo pela colaboração constante;

-Ao Engenheiro Agrônomo, MS, Roberto Bonetti, pelas fotografias, versão do Summary e amizade;

- Ao Departamento de Genética e Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por terem me propiciado o treinamento;

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

- À Fundação Banco do Brasil - pelos recursos financeiros da pesquisa.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Aspectos do controle biológico de fitopatógenos	04
2.2. <i>Trichoderma</i> sp. - Agente de biocontrole de fitopatógenos	08
2.3. Resistência de <i>Trichoderma</i> spp. a fungicidas	12
2.3.1. Utilização da irradiação ultravioleta para obtenção de novos biótipos resistentes de <i>Trichoderma</i> sp. a fungicidas	14
2.4. Utilização de biótipos de <i>Trichoderma</i> spp. resistentes a fungicidas no controle de fitopatógenos	17
2.5. <i>Sclerotinia minor</i> - Agente causal da podridão de esclerotínia	20
2.5.1. Germinação de escleródios de <i>S. minor</i> e <i>S. sclerotiorum</i>	23
2.5.2. Medidas de controle da podridão esclerotínia em alface	26
2.5.3. Controle biológico de <i>Sclerotinia</i> spp.	29

3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Hospedeiro-teste	31
3.2. Isolados de <i>Trichoderma viride</i> Pers. ex S.F. Gray e <i>T. harzianum</i> Rifai	31
3.3. Isolamento de <i>Sclerotinia minor</i> , <i>S. scler- otiorum</i> e <i>S. rolfsii</i>	32
3.4. Meios de cultura e soluções	33
3.4.1. Meio de BDA (Batata-Dextrose-Ágar)	33
3.4.2. Meio BD	33
3.4.3. Meio de extrato de malte	33
3.4.4. Meio de Aveia	34
3.4.5. Solução de "tween-80" (0,1% v/v) .	34
3.4.6. Solução salina (0,85% p/v)	34
3.4.7. Solução Giemsa	35
3.4.8. Solução de albumina 50%	35
3.4.9. Solução Tampão Fosfato pH 7,0	35
3.4.10. Solução de desoxicolato de sódio .	36
3.4.11. Solução estoque de Acrilamida	36
3.4.12. Tampão gel separador pH 8,9	36
3.4.13. Tampão do gel Empilhador pH 6,8 ..	37
3.4.14. Tampão do Tanque	37
3.4.15. Tampão da amostra	37
3.4.16. Gel separador a 10%	38
3.4.17. Gel empilhador 4%	38
3.4.18. Fixador PAGE (esterase)	38
3.4.19. Corante-esterase	39
3.4.20. Fixador PAGE (proteínas totais) ..	39
3.4.21. Corante - Proteínas totais	39
3.4.22. Descorante - Proteínas totais	39
3.5. Fungicidas	40

3.6. Reação de sensibilidade de isolados de <i>T. viride</i> e <i>T. harzianum</i> aos fungicidas benomyl e iprodione	41
3.7. Teste de antibiose dos isolados de <i>T. harzianum</i> e <i>T. viride</i> contra <i>S. minor</i> in vitro	42
3.8. Curva de sobrevivência a luz ultravioleta	44
3.9. Obtenção de novos biótipos de <i>Trichoderma</i> sp. através do uso de luz ultravioleta ..	45
3.10. Teste de estabilidade dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5)	46
3.11. Teste de sensibilidade dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5) ao fungicida iprodione in vitro	47
3.12. Teste de sensibilidade de três novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5) aos fungicidas thiabendazole e tiofanato metílico, in vitro	48
3.13. Teste de sensibilidade de <i>S. minor</i> , <i>S. sclerotiorum</i> e <i>S. rolfsii</i> aos fungicidas benomyl e iprodione, in vitro	48
3.14. Teste de antibiose com os novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5) contra <i>S. minor</i> , <i>S. sclerotiorum</i> e <i>S. rolfsii</i> , in vitro ...	49
3.15. Teste de inibição de germinação de escleródios de <i>S. minor</i> , in vitro	50
3.16. Teste de antagonismo em confrontação direta de três dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5) contra <i>S. minor</i> , <i>S. sclerotiorum</i> e <i>S. rolfsii</i> , in vitro	51
3.17. Caracterização dos novos biótipos e do isolados selvagem de <i>T. harzianum</i> (TW5) .	52

3.17.1. Técnica citológica	52
3.17.2. Verificação do crescimento em meio de aveia	53
3.18. Caracterização para padrões de esterase e proteínas totais de <i>T. harzianum</i> (TW5) e mutantes	54
3.18.1. Coloração para revelação da ativi- dade esterase	54
3.18.2. Coloração para revelação da ativi- dade de proteínas totais	55
3.19. Experimento em casa de vegetação	55
3.19.1. Preparo do inóculo de <i>S. minor</i> e dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5)	55
3.19.2. Preparo do substrato	56
3.19.3. Uso de três dos novos biótipos no controle integrado com o fungi- cida benomyl, de <i>S. minor</i> em plan- tas de alface	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. Reação de sensibilidade de isolados de <i>T.</i> <i>viride</i> e <i>T. harzianum</i> aos fungicidas be- nomyl e iprodione	58
4.1.1. Ação dos fungicidas sobre o cres- cimento micelial dos isolados sel- vagens de <i>Trichoderma</i> spp.	58
4.1.2. Ação dos fungicidas sobre a espor- ulação dos isolados selvagens de <i>Trichoderma</i> spp.	62
4.2. Antibiose de <i>T. viride</i> e <i>T. harzianum</i> contra <i>S. minor</i> in vitro	66

4.3. Curva de sobrevivência a luz ultravioleta	68
4.4. Obtenção de novos biótipos de <i>Trichoderma</i> spp. através do uso de luz ultravioleta .	71
4.5. Estabilidade dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5)	73
4.5.1. Ação do fungicida benomyl sobre o crescimento micelial dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> TW5	74
4.5.2. Ação do fungicida benomyl sobre a esporulação dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> TW 5	76
4.6. Sensibilidade dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5) ao fungicida iprodione, <i>in vitro</i>	78
4.6.1. Ação do fungicida iprodione sobre o crescimento micelial dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> TW5.....	78
4.6.2. Ação do fungicida iprodione sobre a esporulação dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> TW5	79
4.7. Sensibilidade de três dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5) aos fungicidas thia-bendazole e tiofanato metílico, <i>in vitro</i>	82
4.7.1. Ação do fungicida tiofanato metílico sobre o crescimento micelial de três dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> TW5	82
4.7.2. Ação do fungida thiabendazole sobre o crescimento micelial de três dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> TW5.	84

4.7.3. Ação dos fungicidas tiofanato metílico e thiabendazole sobre a esporulação de três novos biótipos de <i>T. harzianum</i> TW5	85
4.8. Sensibilidade de <i>S. minor</i> , <i>S. sclerotiorum</i> e <i>S. rolfsii</i> aos fungicidas benomyl e iprodione, <i>in vitro</i>	86
4.9. Antibiose dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5) contra <i>S. minor</i> , <i>S. sclerotiorum</i> e <i>S. rolfsii</i> , <i>in vitro</i>	89
4.10. Inibição da germinação de escleródios de <i>S. minor in vitro</i>	91
4.11. Antagonismo em confrontação direta de três dos novos biótipos de <i>T. harzianum</i> (TW5) contra <i>S. minor</i> , <i>S. sclerotiorum</i> e <i>S. rolfsii</i> , <i>in vitro</i>	93
4.12. Caracterização dos novos biótipos e do isolado selvagem de <i>T. harzianum</i> (TW5) ...	95
4.12.1. Caracterização citológica dos novos biótipos	
4.12.2. Verificação do crescimento em meio de aveia	99
4.12.2.1. Crescimento micelial dos novos biótipos em meio de aveia	99
4.12.2.2. Esporulação dos novos biótipos em meio de aveia	99
4.12.2.3. Morfologia das colônias.	101
4.13. Caracterização eletroforética de três dos novos biótipos e do selvagem de <i>T. harzianum</i> TW5	102

4.14. Uso de três dos novos biótipos no controle integrado com o fungicida benomyl, de <i>S. minor</i> em plantas de alface em casa de vegetação	105
5. CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
APÊNDICE	124

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS BIÓTIPOS
DE *Trichoderma harzianum*, RIFAI,
RESISTENTES A BENZIMIDAZÓIS, ATRAVÉS DA LUZ ULTRAVIOLETA

Autor: Antonio Carlos Ferreira da Silva

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de biótipos estáveis de *Trichoderma* spp., resistentes ao fungicida benomyl, através do uso da irradiação ultravioleta, visando o controle integrado de *Sclerotinia minor* em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.).

Dos três isolados de *T. harzianum* e de *T. viride* expostos à luz U.V., o *T. harzianum* (TW5) foi o único do qual se obteve colônias resistentes a 2.000 ppm de benomyl. Os dez novos biótipos selecionados, após quatro repicagens sucessivas em meio de cultura, na ausência de benomyl, mantiveram as características de crescimento e esporulação quando colocados novamente para crescer em meio BDA com benomyl.

Os novos biótipos apresentaram variações em relação ao crescimento, esporulação e morfologia das colônias; ao tamanho e frequência de conídios uninucleados

e/ou binucleados; ao comportamento em relação a esporulação e diâmetro de crescimento em meios de cultura com os fungicidas benomyl (2.000 ppm), thiabendazole (1.000 ppm), tiofanato de metila (1.000 ppm) e iprodione (1.000 ppm) ao antagonismo contra *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* in vitro, e aos padrões de eletroforese para esterase e proteínas totais.

Em casa de vegetação, o efeito exercido pelo fungicida benomyl, associado ou não a três dos novos biótipos (2B1, 2B2 e 2B6) foi variável em relação ao controle de *S. minor* em alface. Os tratamentos com os novos biótipos 2B1 e 2B6 não foram eficazes no controle da doença. No entanto, o biótipo 2B1 associado ao benomyl, aumentou o nível de controle de *S. minor*, e o biótipo 2B6 foi menos eficiente do que quando associado ao benomyl. O biótipo 2B2 associado ou não ao benomyl, apresentou 100% de antagonismo ao *S. minor*.

OBTAINMENT AND CHARACTERIZATION OF NEW BIOTYPES
OF *Trichoderma harzianum*, RIFAI, RESISTANT TO BENZIMIDAZOLE
FUNGICIDES THROUGH ULTRAVIOLET LIGHT

Author: Antonio Carlos Ferreira da Silva

Adviser: Dr. Itamar Soares de Melo

SUMMARY

The objective of the present research was to obtain stable biotypes of *Trichoderma* spp, resistant to benomyl using ultraviolet light, for the integrated control of *Sclerotinia minor* in lettuce (*Lactuca sativa* L.).

From the exposition of three isolates of *T. harzianum* and of *T. viride* to the U.V. light, *T. harzianum* (TW5) was the only to produce resistant colonies to 2.000 ppm of benomyl. The ten new biotypes selected after four successive transplants in the absence of benomyl, they maintained the growth and sporulation characteristics when they were grown again in PDA medium with benomyl.

The new biotypes presented variation in regard to growth, sporulation and morphology between their colonies; difference of size and frequency of unnucleated and/or binucleated spores; behavior in relation of sporulation and growth diameter in culture media containing

benomyl (2.000 ppm); methyl thiophanate (1.000 ppm); thia-bendazole (1.000 ppm) and iprodione (1.000 ppm); antagonism against *S. minor*, *S. sclerotiorum* and *S. rolfsii* "in vitro"; and the electrophoretic patterns for esterases and total proteins.

In greenhouse conditions, the effect of benomyl associated or not with three biotypes (2B1, 2B2 and 2B6) showed variation in relation to *S. minor* control in lettuce. The treatments of the new biotypes 2B1 and 2B6 were not efficient on the disease control. However, the biotype 2B1 associated with benomyl increased the level of *S. minor* control, and the biotype 2B6 was less efficient compared when it was associated or not with benomyl. The biotype 2B2 associated or not with benomyl, showed 100% of antagonism to *S. minor*.

1. INTRODUÇÃO

Tem sido relatado o uso de antagonistas para o controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos, onde a maioria mostra o *Trichoderma* spp. como um dos mais promissores entre os agentes de biocontrole (ELAD et alii, 1983; HADAR et alii, 1979). No entanto, poucos trabalhos têm sido realizados a propósito de resistência induzida a fungicidas, em agentes de biocontrole, para seu uso no controle integrado de doenças (ABD-EL MOITY et alii, 1982).

A indução de resistência a fungicidas em *Trichoderma* spp., e a conseqüente seleção de biótipos estáveis para serem utilizados em combinação com fungicidas, é uma opção para se obter um esquema de controle efetivo que envolverá pesquisas biológicas e químicas no controle de um ou mais fitopatógenos.

Conídios e micélios de biótipos resistentes podem ser usados em conjunto com fungicidas no tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicação no solo. Biótipos de *Trichoderma* spp., obtidos por irradiação ultra-

violeta e resistentes ao benomyl, têm demonstrado serem mais efetivos em suprimir doenças de fitopatógenos do solo do que os isolados selvagens (PAPAVIZAS, 1980; PAPAVIZAS et alii, 1982).

A obtenção de antagonistas resistentes pela modificação do genoma é um trabalho mais promissor para o biocontrole de fitopatógenos, pois, a mutagênese induzida por agentes como a luz ultravioleta, produz biótipos com características estáveis. A resistência induzida pela exposição de conídios a concentrações crescentes de fungicidas em meio de cultura, é devido a uma adaptação fisiológica dos biótipos, podendo não ser genética e portanto uma característica mais instável (PAPAVIZAS, 1975).

Sclerotinia minor é um patógeno do solo que causa podridão de esclerotínia em plantas de alface. A produção de escleródios, que são estruturas de resistência, permite sua sobrevivência por vários anos no solo.

As recomendações para o controle de *S. minor* quase sempre são economicamente inviáveis na sua aplicação, como a inundação das áreas infestadas ou a rotação cultural contínua com outras espécies imunes. O controle químico também não tem se mostrado eficiente. Como é um controle preventivo para proteger a cultura, são necessárias várias aplicações localizadas na superfície do solo, junto à base das plantas. O hábito de crescimento da alface impede uma aplicação protetora adequada, portanto, a eficiência dos

fungicidas é parcial. Eles reduzem a germinação de escleródios, mas não diminuem o potencial de inóculo existente. Em adição, há relatos de ocorrência de formas do patógeno resistentes aos fungicidas mais frequentemente utilizados, como o benomyl.

Verifica-se desse modo a necessidade de se procurar formas alternativas de controle. Uma alternativa seria o controle biológico por biótipos de *Trichoderma* spp. resistentes a fungicidas no controle de podridão de esclerotinia em alface.

Tomando-se como base este contexto, o presente trabalho visou:

- A obtenção de biótipos estáveis de *Trichoderma* spp. resistentes ao benomyl, através do uso de irradiação ultravioleta;

- A caracterização dos biótipos em relação ao crescimento e esporulação em meios de cultura com benomyl, thiabendazole, tiofanato metílico e iprodione; ao antagonismo contra *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*; ao número de núcleos e tamanho de conídios, à variação na morfologia das colônias, e aos padrões de eletroforese para proteínas totais e esterase;

- Estudos dos novos biótipos no controle integrado de *S. minor*, com o fungicida benomyl, em plantas de alface, em casa de vegetação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos do controle biológico de fitopatógenos

Uma agricultura avançada e racional visa, entre outras coisas, a obtenção de uma maior produtividade por unidade de área e a sanidade da safra. Dentre as técnicas agrícolas, o uso de produtos químicos, como os fungicidas, difundiu-se enormemente, para se atingir as finalidades citadas. Entretanto, ficou evidenciado que o uso cada vez maior desses produtos tem aspectos negativos, onde a poluição do ambiente por defensivos químicos pode alterar todo o complexo biótico da natureza, afetando então as plantas e animais, incluindo o próprio homem.

O homem passou gradualmente para o controle direto de doenças de plantas, quando, na metade do século XIX começou a usar os biocidas, os quais podiam frequentemente ser aplicados, quando a doença surgia, observando-se um rápido e efetivo controle (BAKER & COOK, 1974).

O conceito de alta mortalidade foi lentamente expandido, particularmente em tratamentos de solos. Resultados apareceram indicando que estes tratamentos também destruíam a população microbiana do solo, assim como acarretaram no aparecimento de microrganismos resistentes a biocidas.

Desde a década de 1960, houve um evidente aumento no interesse do controle biológico de fitopatógenos, e os fitopatologistas começaram, propositadamente, a envolver o controle biológico em seus programas integrados no controle de doenças de plantas (BAKER & COOK, 1974).

Controle biológico é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem (COOK & BAKER, 1983).

O objetivo do controle biológico de fitopatógenos é a redução da doença através da: 1 - redução de inóculo do patógeno pelo decréscimo de sobreviventes entre colheitas, decréscimo da produção ou liberação de propágulos viáveis ou redução da expansão do crescimento micelial; 2 - redução de infecção do hospedeiro pelo patógeno; 3 - redução da severidade do ataque pelo patógeno (BAKER & COOK, 1974).

Antibiose, competição, parasitismo e predação podem ser os mecanismos de ação dos organismos com potencial de controlar ou interferir nos processos de vida de

fitopatógenos. Antibiose é a inibição ou destruição de um organismo pelos produtos metabólicos de outro; competição entre microrganismos é normalmente, por nutrientes, espaço e oxigênio; parasitismo e predação de um microrganismo pelo outro são juntamente mais comuns (COOK & BAKER, 1983)./

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

Ao entrarem em contato com seu hospedeiro, os parasitas necróticos excretam uma substância tóxica que mata a célula hospedeira, utilizando em seguida, os nutrientes que são liberados. A maioria dos micoparasitas é constituída por saprófitas que se caracterizam pelo rápido crescimento sobre diversos substratos (BARNETT, 1963). Por outro lado, os parasitas biotróficosobtem nutrientes de células hospedeiras vivas e não causam quase nenhum dano ao hospedeiro, podendo se incluir neste grupo os parasitas obrigatórios (BARNETT & BINDER, 1973).

A parede celular de fungos patogênicos é composta de β -1,3-glucana e quitina e às vezes, dependendo do patógeno, a parede celular é composta de celulose. Isolados

de *Trichoderma* spp. são capazes de crescer sobre a parede celular desses patógenos, utilizando-a como fonte de carbono. Estes antagonistas possuem sistemas enzimáticos capazes de degradar componentes da parede celular do hospedeiro através da produção de enzimas hidrolíticas como a β -1,3-glucanase, celulase e quitinase (CHET & ELAD, 1983).

Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente, durante o processo de vida do antagonista. Por exemplo, *Gliocladium* spp. causa a morte e degradação de suas hifas hospedeiras pela secreção de antibióticos. Além disto, estes antagonistas enrolam-se ao redor da hifa hospedeira e crescem sobre o conteúdo da célula morta. Desta forma, é conhecido também que antibiose e competição se sobrepõem quando microrganismos em populações mistas obtêm nutrientes pela secreção de metabólitos desencorajando o crescimento de competidores (COOK & BAKER, 1983).

Houve um substancial interesse por parte dos pesquisadores, após a descoberta da penicilina, no estudo de antagonistas de patógenos de planta. Os antibióticos foram produzidos no solo por *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Streptomyces* sp., etc. Os antibióticos produzidos em contato direto entre microrganismos, embora sejam produzidos continuamente e em baixa concentração, podem estar menos sujeitos a decomposição biótica (BAKER, 1987).

O uso de antagonistas para controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos tem sido bastante relatado, a maioria deles mostram que os *Trichoderma* spp estão entre os agentes de biocontrole mais promissores (ELAD et alii, 1983; HADAR et alii, 1979).

2.2. *Trichoderma* sp. - Agente de biocontrole de fitopatógenos

As espécies de *Trichoderma* representam os fungos mais estudados que possuem atividades antagonistas a fitopatógenos presentes no solo. Apesar da aplicação direta, *Trichoderma* spp. não é ainda reconhecido comercialmente. *T. viride*, no entanto, tem sido favorecido comercialmente no controle de *Armillaria mellea* em pomares (BAKER & COOK, 1974; HOY & HERZOG, 1985).

O controle de outros fitopatógenos de solo tem sido conseguido sob condições experimentais com *Trichoderma* sp. *T. harzianum*, por exemplo, controlou *S. rolfsii*, um agente causal de doenças de raízes e hastes de várias culturas (BACKMAN & RODRIGUEZ-KABANA, 1975; CHET et alii, 1979; WELLS et alii, 1972), mas somente quando aplicado a uma alta taxa de inóculo. Os tipos de interações entre *T. harzianum* e *S. rolfsii* podem ser através do enrolamento de hifas, penetração através de estruturas como

haustórios e penetração direta na hifa ou escleródios de *S. rolfsii* (UPADHYAY & MUKHOPADHYAY, 1986).

Segundo RIFAI (1969), as espécies do gênero *Trichoderma* Pers. ex. Fr., subclasse Hyphomycetidae, não são distinguidas facilmente pela simples comparação das culturas, mas sim, baseadas no tipo de ramificação dos conidióforos e modo de disposição das fiálides.

PERES & MELO (1989) estudaram a variabilidade existente entre 12 isolados de *T. harzianum* antagônicos a *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* e *S. minor*, e verificaram diferenças no tamanho de conídios, número de núcleos por conídios, crescimento radial entre os isolados e quanto ao grau de antagonismo contra *S. minor* e *R. solani*.

São incluídos nove agregados de espécies diferentes nesse gênero de fungo. Essas espécies ocorrem em solos de todo o mundo e têm sido identificadas como eficientes micopatasitas de vários fitopatógenos como *Armillaria melleae*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *R. solani*, *S. rolfsii*, *Heterobasidium annosum*, *M. phaseolina* (COOK & BAKER, 1983).

A sobrevivência de *Trichoderma* em solo natural ou infestado artificialmente é influenciado pela temperatura, umidade, aeração, pH e teor de matéria orgânica do solo. *T. viride* é um antagonista ativo, em condições de solo úmido mas é inibido em presença de umidade com pH acima de 5,4. Foi observado antagonismo de *T. harzianum* em va-

lores de pH menores que 6,5; a faixa ótima de pH situa-se entre 4,5 a 5,3 (COOK & BAKER, 1983).

PAPAVIZAS (1985) sugere que os mecanismos de ação de *Trichoderma* para controle de fitopatógenos são antibiose, lise, competição e micoparasitismo e que estudos sobre o parasitismo de *S. rolfii* e *R. solani* por *T. hamatum* e *T. harzianum* demonstraram fenômenos adicionais a nível molecular (por exemplo, material fibrilar extracelular depositado entre a hifa interagida, acumulação de organelas parasitadas nas células parasitárias, produção de uma matriz de revestimento que envolve a hifa penetrante).

AHMAD & BAKER (1985) estudaram a capacidade de *Trichoderma harzianum* se desenvolver na rizosfera de feijão, pepino, milho, rabanete e tomate e verificaram uma maior capacidade de mutantes resistentes ao benomyl, com ou sem a adição do benomyl ao solo, de sobreviver na rizosfera em relação ao tipo selvagem quando empregados em tratamento de sementes. O selvagem não foi detectado na rizosfera numa profundidade de 1 a 8 cm das raízes após 8 dias. O grau de colonização da rizosfera por mutantes de *T. harazianum* foi influenciado pelo pH e temperatura do solo. A capacidade saprofítica competitiva de *Trichoderma* spp. está correlacionada diretamente com o seu desenvolvimento na rizosfera, sendo que os mutantes produzindo mais celulase que o tipo selvagem, explica a maior capacidade destes em se desenvol-

ver na rizosfera (AHMAD & BAKER, 1987a,b; BAKER, 1988, 1989).

Dois isolados de *T. harzianum* e um de *T. koningii*, *T. polysporum* e *T. viride* foram mutados para resistência ao fungicida benomyl. A maioria dos mutantes e seus tipos parentais selvagens foram bons competidores na rizosfera. Quando as espécies e isolados foram colocados para crescer durante 6 dias em Czapek-Dox com celulose como fonte de carbono, os mutantes produziram maior peso seco que seus tipos parentais selvagens. Não houve diferença no peso seco entre isolados e espécies quando somente a glicose foi a fonte de carbono (AHMAD & BAKER, 1988a). Estes mutantes de *T. harzianum* produziram mais biomassa quando colocados para crescer em carboidratos complexos com adição de açúcares simples, o mesmo não ocorreu com os tipos selvagens. A capacidade dos mutantes de desenvolverem-se mais rapidamente em substratos com fontes complexas de carbono (típicos encontrados em superfícies de raiz) do que seus parentais selvagens, e de aumentar a biomassa mesmo quando açúcares simples foram adicionados ao substrato com celulose, mostrou um significado ecológico uma sobre a importante características de competição na rizosfera (AHMAD & BAKER, 1988b).

2.3. Resistência de *Trichoderma* spp. a fungicidas

Até 1982, poucos trabalhos tinham sido feitos induzindo resistência a fungicidas em agentes de biocontrole para seu uso em controle integrado de doenças (ABD-EL MOITY et alii, 1982). Conídios e micélios de isolados resistentes podem ser usados em conjunto com fungicidas para tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo (PAPAVIZAS et alii, 1982).

Trichoderma spp. têm comportamento variável em relação a fungicidas, são tolerantes a captan, iprodione, etheridiazole, PCNB e thiram, mas não são tolerantes aos benzimidazóis (ABD-EL MOITY, 1982; ALLEN et alii, 1980, CHANG et alii, 1986; PAPAVIZAS, 1982; STRASHNOW et alii, 1985).

RICHARDSON (1954) observou que o fungicida thiram até a concentração de 30 ppm não inibiu *T. viride* e *Penicillium* spp. sobreviveu até a concentração de 50 ppm. WENSLEY & HUANG (1970) recuperaram *Trichoderma* e *Penicillium* sp. de solos tratados com 40 a 160 µg de benomyl por grama de solo. Em laboratório, *T. viride* se desenvolveu em solo contendo 5 µg de benomyl por grama de solo, apesar de ter sido inibido em meio ágar contendo 1 µg do fungicida.

Biótipos de *T. harzianum* resistentes a captan, captafol, clorotalonil, iprodione e DPX 4424 foram desenvolvidos através da exposição de conídios à concen-

trações crescentes dos fungicidas *in vitro*. Alguns biótipos resistentes aos fungicidas possuíam um aumento na capacidade de biocontrole de podridão branca de cebola causado por *Sclerotium cepivorum* (PAPAVIZAS, 1980).

HOMECHIN (1987) testou sete isolados de *T. harzianum* quanto à tolerância aos fungicidas benomyl, thiram + iprodione, thiram, thiabendazole e captan. Concentrações acima de 0,1 ppm de todos os fungicidas testados inibiram o crescimento micelial dos isolados, enquanto, thiram e thiram + iprodione inibiram a esporulação.

SANTOS & MELO (1989) observaram em seus experimentos *in vitro* isolados de *T. harzianum* e *T. aureo-viride* apresentando resistência a 1,0 ppm dos fungicidas captan e procymidone.

Entre os mecanismos de resistência a fungicidas pode-se citar: modificação no sítio de ação, resultando em menor afinidade com o fungicida; desvio do sítio bloqueado por uma operação alternativa, redução da absorção ou acúmulo do fungicida, processos de destoxicação, etc. (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982; GHINI, 1989). Para Hastie, 1973¹, citado por ABD-EL MOITY (1982), o papel dos fungicidas geneticamente ativos em causar a formação de novos biótipos de fungos, incluem também os efeitos desses

¹ HASTIE, A.C. Genetics effects of fungicides. Proc. Int. Congr. Plant Prot., Washington, DC, 5-12, August, 1979.

produtos na mutação gênica, quebra cromossômica, não divisão mitótica e recombinação.

A instabilidade mitótica a níveis baixos dos fungicidas benzimidazóis e a inibição da mitose a níveis mais altos são efeitos comuns dos vários benzimidazóis em alguns microrganismos. Sugere-se que a ação dos benzimidazóis seja específica na mitose, não permitindo outros processos essenciais a continuar normalmente, como a replicação cromossômica.

A resistência aos benzimidazóis em fungos filamentosos pode ser adquirida pela alteração estrutural da β -tubulina, componente do heterodímero tubulina dos microtúbulos, tendo em vista que os benzimidazóis agem diretamente sobre os microtúbulos (DAVIDSE & FLACH, 1977).

2.3.1. Utilização da irradiação ultravioleta para obtenção de novos biótipos de *Trichoderma* sp. resistentes a fungicidas

O efeito mutagênico da luz ultravioleta (U.V.) foi descoberto por Altenburg em 1934 após irradiar ovos de *Drosophila*. Desde então esse tipo de irradiação não ionizante tem sido usada em larga escala para a obtenção de mutantes num grande número de espécies, especialmente em microrganismos, os quais são bastante suscetíveis ao baixo poder de penetração da irradiação ultravioleta.

O efeito mutagênico da luz U.V. é atribuído a absorção do comprimento de onda de 2.600 Å pelo DNA com a formação de dímeros de pirimidinas.

PAPAVIZAS et alii (1982), empregaram irradiação ultravioleta em *T. harzianum* (WT-6) e obtiveram biótipos diferentes do isolado selvagem, quanto à morfologia, produção de metabólitos fungitóxicos, sobrevivência em solo, resistência ao benomyl, supressão de *R. solani* em algodão e rabanete, *S. rolfsii* em cebola e *Pythium* sp. em ervilha. Estes autores demonstraram que biótipos de *Trichoderma* sp., obtidos por irradiação ultravioleta e resistentes ao benomyl, foram mais efetivos para suprimir doenças de fitopatógenos do solo do que as estirpes selvagens. A resistência foi uma característica estável para os novos biótipos.

PAPAVIZAS & LEWIS (1983) obtiveram mutantes de *T. viride*, por exposição do isolado selvagem a irradiação ultra-violeta, que toleram concentrações acima de 100 ppm do ingrediente ativo de benomyl, thiabendazole e tiofanato de metila, como indicado pelo crescimento em BDA e testes de germinação conidial. Os biótipos induzidos por U.V. diferiram do selvagem na aparência, hábito de esporulação, habilidade de crescimento em meio líquido e vários valores de pH. Dois biótipos mutantes (R_1 e R_2) inibiram o crescimento de 5 dos 8 patógenos testados.

GULLINO & GARIBALDI (1988) desenvolveram bió-

tipos mutantes de *Trichoderma* spp. resistentes a fungicidas e ativos contra os agentes causais de oídio, mildio e mofo cinzento em uva, através de irradiação ultravioleta.

Biótipos resistentes a altas concentrações de benomyl, iprodione e maneb foram isolados através da exposição de esporos de *T. reesei* e *T. viride* a irradiação ultravioleta. Estes biótipos mantiveram a característica de inibir significativamente fungos fitopatogênicos, tais como *Venturia inaequalis*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, sendo possível avaliar suas capacidades de biocontrole dentro de um programa de controle integrado de doenças (BENSACI & NEUMANN, 1989).

T. harzianum (TC 11) e *T. koningii* (T 12) foram testados com irradiação ultravioleta e mutagênicos químicos (Diethyl sulfonato, Etil metanosulfonato e ácido nitroso) para se obter biótipos resistentes ao benomyl. Vários mutantes foram obtidos, mas apenas um foi selecionado acima de 10 ppm. Após tratamento do mesmo isolado com dietil sulfonato, um novo biótipo pôde resistir a 1.000 ppm de benomyl, sem diminuir sua capacidade de micoparasitismo, lise e antibiose contra *R. solani* e *S. rolfsii* em relação ao isolado parental (LIU, 1988).

MELO (1989) obteve biótipos de *T. viride* (T2b) isolado da rizosfera de alface, produtores de metabólitos tóxicos contra *S. minor*, através do tratamento com irradiação ultravioleta. O biótipo M-19 protegeu plan-

tas de alface da doença em aproximadamente 80%, quando comparado com a testemunha não inoculada com *Trichoderma*, e em 50% quando comparado com o isolado selvagem. Este estudo mostrou que se pode aumentar a variabilidade genética através do tratamento de conídios com luz ultravioleta.

SILVA & MELO (1989) obtiveram através do tratamento de conídios com luz ultravioleta, biótipos resistentes de duas linhagens de *T. harzianum* (TMA4 e TW5) que cresceram e esporularam em meio BDA com 2.000 ppm do princípio ativo do iprodione. Os novos biótipos inibiram em até 100% o crescimento radial de *S. minor*.

2.4. Utilização de biótipos de *Trichoderma* spp.

resistentes a fungicidas no controle de fitopatógenos

A importância da indução de biótipos de *Trichoderma* spp. resistentes a biocidas está em sua utilização em combinação com fungicidas em um esquema de controle efetivo de um ou mais fitopatógenos, sendo portando necessárias pesquisas biológicas e químicas.

HENIS et alii (1979) utilizando o PCNB (pentacloronitrobenzeno - 4 µg do princípio ativo/g de solo) juntamente com o inóculo de *T. harzianum*, constataram um efeito aditivo sobre o controle da doença e um efeito sinérgico sobre o decréscimo na densidade de inóculo de

propágulos de *R. solani*. Na ausência de *T. harzianum* e utilizando somente PCNB houve um atraso na redução de propágulos viáveis de *R. solani*.

Isolados de *T. harzianum* resistentes a PCNB *in vitro* melhoraram o controle de *S. rolfsii* em plantas de beterraba *in vitro* e em condições de campo quando integrado a doses reduzidas do fungicida (UPADHYAY & MUKHOPADHYAY, 1986).

A resistência de *T. viride* a doses relativamente altas de brometo de metila foi mostrado por MUNNECKE et alii (1981) e eles sugeriram que este fenômeno poderia ser a base para um controle integrado de patógenos, mas não foi aplicado no campo.

Sob condições de casa de vegetação, uma combinação de *T. harzianum* e uma dose reduzida de brometo de metila controlou completamente a incidência de *R. solani* em plântulas de feijão quando comparado com o controle em solo não tratado (STRASHNOW et alii, 1985).

Nos experimentos de campos feitos por COLE & ZUENYICA (1988) o fungicida triadimenol, integrado ao tratamento com *Trichoderma* spp., aumentou o controle de *R. solani* e *Fusarium solani*, em plantas de fumo.

LIFSHITZ et alii (1985) mostraram um efeito aditivo no controle de *R. solani* em plântulas de rabanete com utilização de *T. harzianum* mais benodanil.

Uma combinação de *Trichoderma harzianum* com

uma dose reduzida de brometo de metila, diminuiu a incidência de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. A combinação de *T. harzianum* com captan reduziu significativamente a doença causada por *Verticillium* em batata, quando comparado com o emprego do fungicida ou com o *Trichoderma harzianum* sozinhos (ORDENTLICH et alii, 1990).

Um isolado de *T. harzianum* controlou igualmente a podridão, causada por *Botrytis cinerea*, em maçã, quando utilizado sózinho ou integrado com doses reduzidas de vinclozolin (TRONSMO, 1989). Houve um controle semelhante de *R. solani* em plântulas de cenoura com *T. harzianum* e a dose recomendada de brometo de metila (STRASHNOW et alii, 1985).

Segundo ABD-EL MOITY et alii (1982) a combinação de iprodione com um isolado de *T. harzianum*, estirpe T resistente a iprodione, resultou em um alto índice de controle de *S. cepivorum*, em cebola, quando comparado ao emprego somente do fungicida.

Em condições de campo isolados de *Trichoderma* spp., resistentes a diferentes fungicidas, controlaram parcialmente *B. cinerea* em uva quando utilizado sozinho. Melhores resultados foram obtidos com a combinação de fungicidas (uma pulverização com benomyl ou vinclozolin) e controle biológico (GULLINO & GARIBALDI, 1988).

A utilização do controle integrado é um controle mais seguro, havendo menor perigo de desenvolvimento de resistência no patógeno (TRONSMO, 1989).

2.5. *Sclerotinia minor* - Agente causal da podridão de Esclerotinia

Os fitopatógenos *S. minor* Jagger e *S. sclerotiorum* (Lib.) Bary são fungos cosmopolitas que, devido a sua ampla distribuição e grande importância econômica, vem sendo estudados desde 1837, quando foram descritos pela primeira vez. No entanto, os resultados destes estudos até há pouco tempo eram discordantes entre si, e isto devido ao fato das espécies terem sido confundidas como sendo uma só: *Sclerotinia sclerotiorum* (PURDY, 1979).

Com os trabalhos de ABAWAI & GROGAN (1979), PURDY (1979), e a excelente revisão organizada por WILLETTS & WONG (1980) ficou elucidado que são dois os agentes causais da podridão de esclerotínia, *S. minor* e *S. sclerotiorum*.

A gama de espécies hospedeiras destes fungos é muito grande e as mais suscetíveis encontram-se nas famílias Cruciferae, Compositae, Solanaceae, Umbelliferae, Chenopodiaceae e Leguminosae, porém, em condições favoráveis ao fungo, um maior número de famílias pode ser infectado. Entre os possíveis hospedeiros de *S. sclerotiorum* estão 172

espécies de 118 gêneros em 37 famílias, que, com pequena diferença, são os mesmos para *S. minor* (PARTYKA & MAI, 1962). Entretanto, Adams, 1978, em comunicação pessoal a PURDY (1979), afirmou que *S. sclerotiorum* e *S. minor* possuem hospedeiros em 361 espécies pertencentes a 225 gêneros compreendidos em 64 famílias de plantas.

A patogenicidade de *Sclerotinia* spp. é um fenômeno complexo que não é conhecido adequadamente. A eficiência de *Sclerotinia* spp. como patógeno parece, no entanto, ser dependente de uma complexa combinação de fatores que pode ocorrer rapidamente na planta hospedeira antes que esta possa responder. Estes fatores incluem: produção de estruturas que favorecem a infecção ou de apressórios capazes de penetrar mecanicamente na cutícula do hospedeiro; formação de hifas de infecção especializadas e organizadas, capazes de um rápido crescimento intercelular abaixo da cutícula e no córtex; elaboração de enzimas pectinolíticas apropriadas e ácido oxálico para degradar a lamela média das células hospedeiras; cátions quelantes inibidores da atividade enzimática; mudança de pH no tecido do hospedeiro a uma taxa mais favorável às ações enzimáticas e à toxidez das células hospedeiras, tornando-as mais suscetíveis à invasão; a produção de enzimas degradadoras capazes de hidrolisar a parede celular e constituintes protoplasmáticas, provocando um suprimento constante e abundante de nutrientes, para um rápido crescimento e desenvolvimento da hifa na

infecção. Esta sequência de eventos não é completa, mas proporcionam uma explicação lógica do comportamento de *Sclerotinia* spp. em relação de afinidade entre hospedeiro-patógeno (LUMSDEN, 1979).

A forma prática de identificação destas espécies *in vitro* é a observação das características gerais dos escleródios, que são suas estruturas de resistência, distribuídas pelas placas de Petri. *S. sclerotium* apresenta escleródios grandes, com 2 a 6 mm de diâmetro, redondos a semi-esféricos, formando na placa um anel com 20 a 60 escleródios. *S. minor* tem escleródios pequenos, com 0,3 a 2 mm de diâmetro, geralmente redondos, às vezes unidos, assemelhando-se a um estroma, sendo irregular o padrão de distribuição pela placa, cobrindo toda a superfície, chegando a formar de 1.000 a 3.000 escleródios (WILLETTS & WONG, 1980; KOHN, 1979).

Existem poucas informações sobre a densidade de inóculo no solo das várias espécies de esclerotínia. Estas informações seriam úteis para se prever a severidade da doença na época de plantio da cultura e identificar os campos que necessitam ou não de médias de controle (ADAMS & AYERS, 1979). DILLARD & GROGAN (1985) mostraram uma correlação positiva significativa entre o número de escleródios no solo e a incidência de murcha em alface causada por *Sclerotinia minor*. Estas informações também seriam úteis

para um programa de controle integrado de doenças (ADAMS & AYERS, 1979).

As plantas hospedeiras, de um modo geral, podem ser atacadas em qualquer estágio de desenvolvimento, sob condições de umidade relativa alta (85 a 100%) e temperatura baixa (10 a 25°C, com um ótimo de 18°C). Nestas condições, o fungo cresce rapidamente invadindo os tecidos do hospedeiro, no qual uma podridão aquosa se desenvolve e um micélio branco cotonoso cresce sobre os tecidos infectados. Após alguns dias de crescimento micelial, estruturas pequenas e compactas desenvolvem-se tanto na superfície do hospedeiro quanto em cavidades no seu interior. Estas estruturas são os novos escleródios que se formam. Com o avançar da doença, um grande número de escleródios acumulam-se no hospedeiro, que ao decompor-se, permite que estes fiquem no solo, onde podem permanecer dormentes por períodos tão longos como oito anos ou mais, ou podem germinar após curto período de dormência (DOW et alii, 1988; IMOLEHIN et alii, 1980; PURDY, 1979; WILLETTS & WONG, 1980).

2.5.1. Germinação de escleródios de *S. minor* e *S. sclerotiorum*

Diferentes tipos de germinação podem ocorrer entre os escleródios de *S. minor* e *S. sclerotiorum*. A germinação pode ser carpogênica, hifal ou eruptiva (WILLETTS &

WONG, 1980). É importante o conhecimento do comportamento das duas espécies quanto à germinação de seus escleródios, pois esta condiciona a forma como as plantas hospedeiras vão sofrer a ação do inóculo (ABAWI & GROGAN, 1979).

A germinação hifal dos escleródios ocorre com o desenvolvimento de uma hifa individual, que emerge através do envoltório do escleródio. Esta hifa parasita primeiramente matéria orgânica em decomposição, pois necessita de uma fonte de nutrientes para continuar seu desenvolvimento e posteriormente forma um micélio que crescerá em direção ao hospedeiro infectando-o (WILLETTS & WONG, 1980).

Está comprovado que a infecção micelial direta, causada por *S. minor*, é de fundamental importância epidemiológica para algumas culturas, como a alface, sendo o tipo preferencial de germinação, embora os escleródios possam germinar pelos outros dois modos, dependendo das condições ambientais (HAWTHORNE, 1974; WONG, 1978).

Para o desenvolvimento do apotécio e a germinação dos ascosporos são necessárias condições especiais como longos períodos de umidade alta, temperaturas entre 10 a 15°C e água livre na superfície do hospedeiro. A germinação carpogênica ocorre com maior frequência em *S. sclerotiorum* e são os ascosporos o principal inóculo desta espécie (IMOLEHIN et alii, 1980; HAWTHORNE, 1973).

Na germinação carpogênica, o escleródio germina produzindo apotécios, onde são originados os ascóspo-

ros, que são os esporos sexuais do fungo. Os ascósporos são produzidos em grande quantidade e quando maduros são liberados violentamente no ar e disseminados pelo vento sobre hospedeiros susceptíveis. Estes ascósporos, sob condições ambientes favoráveis, germinam, emitindo uma hifa infectiva e um novo ciclo de infecção se estabelece (WILLETTS & WONG, 1980). O intervalo de temperatura ótimo para o crescimento de *Sclerotinia minor* e *S. sclerotiorum* é semelhante, variando entre 10 a 25°C, mas a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* é favorecida pelo limite inferior de temperatura, isto é, 10 a 15°C. Isto leva a crer que a diferença em relação as flutuações de temperatura é a razão porque *S. minor*, usualmente, predomina nos campos de produção de alface (HAWTHORNE, 1974; IMOLHIN et alii, 1980).

A germinação eruptiva dos escleródios é uma particularidade da espécie *S. minor*, pois os escleródios grandes de *S. sclerotiorum* não germinam desta maneira. Neste tipo de germinação ocorre o rompimento do envoltório do escleródio e uma massa micelial cresce vigorosamente (LE TORNEAU, 1979). A germinação eruptiva dos escleródios de *S. minor* ocorre inclusive em solos relativamente secos, enquanto a germinação carpogênica, com a posterior formação de apotécios em *S. sclerotiorum*, ocorre somente quando a umidade do solo é mantida próxima à saturação por duas ou mais semanas. Além disso, é necessário água livre sobre as folhas de alface, por 48 horas ou mais, para que ocorra a

infecção pelos ascósporos e se estabeleça a progressão da doença (PATERSON & GROGAN, 1984). ADAMS & TATE (1976) observaram micélio proveniente da germinação eruptiva, infectando diretamente plântulas de alface, sem necessidade de primeiro colonizar matéria orgânica em decomposição.

Com estas informações verifica-se que, sob o aspecto epidemiológico, *S. minor* tem um papel de destaque na ocorrência de podridão de esclerotínia nos cultivos de alface (ABAWI & GROGAN, 1979). A alface é suscetível tanto a *S. sclerotiorum* quanto a *S. minor*, mas a podridão em muitos locais, é causada quase que exclusivamente por *S. minor*, mesmo que *S. sclerotiorum* esteja presente (WILLETTS & WONG, 1980).

2.5.2. Medidas de controle da podridão esclerotínia em alface

As medidas de controle recomendadas para o combate à podridão esclerotínia não são eficientes (GROGAN, 1979). As principais são:

a) *inundação* - promove a completa destruição dos escleródios se o terreno infestado permanecer inundado por períodos longos como 20 a 45 dias. Este método dificilmente é aplicado porque, na maioria das situações, tem se mostrado técnica e economicamente inviável (CHAVES, 1961).

b) *rotação de culturas* - visa reduzir o potencial de inóculo no solo, mas é ineficiente devido ao longo período de sobrevivência dos escleródios no solo. Além disso, é difícil a escolha das espécies e planejamento da rotação devido ao grande número de espécies hospedeiras entre as culturas olerícolas ou não (STEADMAN, 1979).

c) *aplicação de fungicidas* - tem controlado parcialmente o fitopatógeno, inibindo a germinação dos escleródios e o subsequente desenvolvimento micelial (HAWTHORNE & JARVIS, 1973). No entanto, não reduz o potencial de inóculo no solo e exige um grande número de aplicações durante os cultivos. Já existem relatos da ocorrência de formas resistentes do fitopatógeno aos fungicidas recomendados, como certos isolados de *S. minor* resistentes ao benomyl (WILLETTS & WONG, 1980).

Na maioria das doenças causadas por *Sclerotinia* sp., os produtos químicos devem ser aplicados antes que a infecção ocorra nos órgãos senescentes, e prevenir a colonização destes órgãos. Em culturas como a alface, nas quais *S. minor* é o principal patógeno, a germinação miceliogênica dos escleródios causa infecção direta. Por isso, a proteção da região do colo da planta em contato com o solo e o período de aplicação do fungicida são os fatores mais importantes para obtenção do controle (STEADMAN, 1979). Assim, o hábito de crescimento da alface dificulta o controle químico. A necessidade de proteger a interface solo/

planta é bem documentada, como por exemplo, a técnica de solarização do solo, em que se coloca plásticos transparentes abaixo das folhas de alface, diminuindo significativamente a infecção de *S. minor* e reduzindo seu potencial de inóculo (STEADMAN, 1979; VANNACCI et alii, 1988; PHILLIPS, 1990).

Fungicidas como benomyl, PCNB e DCNA são parcialmente efetivos quando aplicados em uma única pulverização (MARCUM et alii, 1977). Várias aplicações de benomyl ou DCNA são necessárias periodicamente após o transplante das mudas para minimizar a murcha de alface causada por *S. minor* (STEADMAN, 1979). Segundo PORTER (1977), a utilização de benomyl para o tratamento de *S. minor* e *S. sclerotiorum* só foi eficiente quando aplicado em doses excessivamente maiores que as normalmente recomendadas. O uso de chlorothalonil em culturas de amendoim para controlar *S. sclerotiorum* e *S. minor* (PORTER, 1977; HAU & BEUTE, 1983) e de benomyl em capim-panasco para controlar *Pythium* sp. (WARREN et alii, 1976) aumentou a severidade da doença quando comparado com tratamentos onde não foram utilizados os fungicidas.

Não havendo variedades de alface, comercialmente conhecidas, com resistência à podridão esclerotínia (BARROS, 1988), um método alternativo de controle seria o uso de antagonistas para o biocontrole de *Sclerotinia minor*.

2.5.3. Controle biológico de *Sclerotinia* spp.

Até 1979 , mais de 30 espécies de fungos e bactérias, e também insetos e outros organismos foram relatados como antagonistas de *Sclerotinia* spp. (STEADMAN, 1979). *Coniothyrium minitans* Campbell (HUANG, 1980), *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens* (TU, 1980) e *T. viride* (HOES & HUANG, 1975) foram relatados parasitando escleródios de *S. sclerotiorum* no solo. *G. virens* previniram a formação de escleródios de *S. sclerotiorum* e parasitaram os escleródios em estudos *in vitro* (TU, 1980). *C. minitans* e *T. viride* destruíram escleródios de *S. sclerotiorum* após 100 dias de incubação no solo *in vitro* em temperatura ambiente de 20-22°C (HUANG, 1980). *G. virens* reduziu a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* (MUELLER et alii, 1985).

Em seu trabalho ADAMS (1989) avaliou oito antagonistas de *Sclerotinia* spp. pela sua capacidade de destruir escleródios de *S. minor* no solo. *Teratosperma oligocladium* causou uma redução de 94% na densidade de inóculo de *S. minor* em 10 sementes. *Dictyosporium elevans* e *C. minitans* foram intermediários em reduzir o número de escleródios após 30 semanas, no entanto, *Penicillium citrinum*, *Talaromyces flavus*, *Trichoderma* sp. e *G. virens* foram ineficientes. Quando várias concentrações de esporos de antagonistas foram adicionados ao solo úmido naturalmente infes-

tado com escleródio de *S. minor*, somente *Sporidesmium sclerotiorum* e *T. oligocladium* reduziram a densidade de inóculo de *S. minor*. ADAMS & AYERS (1980) também mostraram a eficiência de *S. sclerotiorum* em controlar *S. minor* em experimentos de campo.

IMOLEHIN & GROGAN (1980) verificaram muitos isolados de *Trichoderma* spp. parasitando escleródios não germinados de *S. minor* em campos de plantas de alface não infestados. LYNCH (1987) também verificou que um isolado de *T. harzianum* tinha uma grande atividade de biocontrole "in vitro" contra *S. sclerotiorum*, essa atividade era dependente de inóculo do antagonista e patógeno e também da temperatura.

MUELLER et alii (1985) observaram *T. viride* parasitando colônias de *S. sclerotiorum* em BDA indicando ser esse microrganismo um bom agente de controle biológico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram conduzidos nos Laboratórios do Departamento de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba, SP e do Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura - CNPDA/EMBRAPA, Jaguariúna, SP.

3.1. Hospedeiro-teste

Em todos os ensaios foi utilizada a cultivar de alface White Boston (tipo manteiga - ASGROW/EUA), suscetível ao *Sclerotinia minor*.

3.2. Isolados de *Trichoderma viride* Pers. ex S.F. Gray e *T. harzianum* Rifai

Foram utilizados os isolados de *Trichoderma* sp. pertencentes a micoteca do CNPDA: *T. viride* (Tal1); *T. viride* (T2b) e *T. harziannum* (Tal8) procedentes de culturas

de alface de Moji das Cruzes/SP; *T. viride* (Tlig jap) procedente do Japão; *T. harzianum* (TMA4) procedente de culturas de eucaliptus de Piracicaba/SP e *T. harzianum* (TW5) cedido pelo CNPSo-EMBRAPA (PR).

3.3. Isolamento de *Sclerotinia minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*

O isolamento foi realizado mediante a cultura de micélio ou de escleródios de plantas infectadas e plaqueados em meio BDA.

O micélio foi retirado cuidadosamente da superfície da área infectada, com uma alça de platina previamente flambada, e plaqueado imediatamente. Os escleródios foram desinfestados por imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 1,5% (QBoa 30%), durante 5 minutos, em seguida lavados por 3 vezes em água esterilizada e plaqueados. As placas foram mantidas a 22°C.

Após 10 dias de incubação, discos com 0,7 cm de diâmetro foram retirados dos bordos das culturas e plaqueados em meio de aveia, onde verificou-se um crescimento mais rápido do fungo.

A identificação das espécies de *S. minor* e *S. sclerotiorum* foi feita segundo WILLETS & WONG (1980) e também *S. rolfsii*, pela observação das características gerais dos escleródios formados em meio de cultura BDA.

3.4. Meios de cultura e soluções

3.4.1. Meio de BDA (Batata-Dextrose-Ágar)

- Batata	200,0 g
- Dextrose	20,0 g
- Ágar	15,0 g
- Água destilada (completar-se a 1000 ml)	
- pH	5,6

3.4.2. Meio BD

Preparado segundo item 3.4.1. não sendo adicionado ágar.

3.4.3. Meio de extrato de malte

- Malte	10 g
- Peptona	10 g
- Dextrose	20 g
- Ágar	20 g
- Água destilada	1000 ml
- pH	6,5

3.4.4. Meio de Aveia

- Aveia 40 g
- Ágar 20 g
- Água 1000 ml

O ágar foi derretido em 200 ml de água fervendo e misturado a aveia completando o volume a 1000 ml com água destilada. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 1 atm.

3.4.5. Solução de "tween-80" (0,1% v/v)

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

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

3.4.6. Solução salina (0,85% p/v)

- NaCl 0,85 g
- Água destilada 100,0 ml

A solução foi distribuída em frascos (9 ml para cada frasco), autoclavada e conservada no refrigerador a 4°C.

3.4.7. Solução Giemsa

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

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

3.4.8. Solução de albumina 50%

(TANAKA et alii, 1979)

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

3.4.9. Solução Tampão Fosfato pH 7,0

Solução A:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,73 g
- Água destilada	1000 ml

Solução B:

- KH_2PO_4 2,40 g
- Água destilada 1000 ml

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

3.4.10. Solução de desoxicolato de sódio

- Desoxicolato de sódio 8,0 g
- Água destilada 100,0 ml

3.4.11. Solução Estoque de Acrilamida

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

A solução foi filtrada e mantida a 4°C.

3.4.12. Tampão gel separador pH 8,9

- Tris-base 45,75 g
- Água destilada 60,00 ml

O pH foi ajustado para 8,9 com HCl 1N, e o volume completado para 100 ml com água destilada. A solução foi filtrada e armazenada à temperatura ambiente.

3.4.13. Tampão do gel Empilhador pH 6,8

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

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

A solução foi conservada sob refrigeração.

3.4.14. Tampão do Tanque

- Tris 63,2 g
- Glicina 39,9 g
- Água destilada 1000 ml

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

3.4.15. Tampão da amostra

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

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

3.4.16. Gel separador a 10%

- Tampão do gel separador 3,0 ml
- Acrilamida 10,0 ml
- Água destilada 16,8 ml
- Persulfato de amônia 10% 0,225ml
- TEMED 0,01 ml

O gel foi preparado no momento do uso.

3.4.17. Gel empilhador 4%

- Tampão do gel empilhador 1,5 ml
- Acrilamida 2,0 ml
- Água desmineralizada 11,4 ml
- Persulfato de amônia 10% 0,112ml
- TEMED 0,015ml

O gel foi preparado no momento do uso.

3.4.18. Fixador PAGE (esterase)

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

3.4.19. Corante-esterase

- "FAST BLUE, RR"	50,0 ml
- Tris-HCl 0,5M pH 7,1	5,0 ml
- α -naftil-acetato	0,75 ml
- β -naftil-acetato	0,75 ml
- Água destilada	45,5 ml

3.4.20. Fixador PAGE (proteínas totais)

- Metanol	45 ml
- Ácido acético	10 ml
- Água	45 ml

3.4.21. Corante - Proteínas totais

- Azul de Comassie ("Brilhante Blue R250"	50 mg
- Fixador PAGE	50 ml

3.4.22. Descorante - Proteínas totais

- Metanol	5 ml
- Ácido acético	7 ml
- Água	88 ml

3.5. Fungicidas

Benomyl:

Nome Químico: 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol car-
bamato de metilo.

Produto comercial: Benlate 500 (50% princípio ativo)

Iprodione:

Nome Químico: 3-(3,5-diclorofenil)-N-(1-metil-etil)-
2,4-dioxo-1-timidazolina carboximida

Produto Comercial: Rovral (50% princípio ativo)

Thiabendazole:

Nome Químico: 2-(tiazol-4-il)benzimidazol

Produto Comercial: Tecto 600 (60% princípio ativo)

Tiofanato metílico:

Nome Químico: 1,2-bis-(3-metoxycarbonil-2-tioureido)
benzeno

Produto Comercial: Cercobin 700 PM (70% do princípio
ativo).

3.6. Reação de sensibilidade de isolados de *T. viride* e *T. harzianum* aos fungicidas benomyl e iprodione

O objetivo foi verificar o comportamento dos seis isolados de *Trichoderma* sp. (Tal 1, T2b, T lig jap, Tal 8, TMA4 e TW5) às concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 ppm do princípio ativo do fungicida benomyl e 0; 2,5; 5,0; 10,0 e 100,0 ppm do princípio ativo do fungicida iprodione.

As colônias dos seis isolados selvagens foram inicialmente cultivadas em meio BDA e após 5 dias de incubação, discos de meio contendo micélio e conídios, com 0,7 cm de diâmetro foram retirados da margem das colônias e transferidos para placas de Petri contendo BDA suplementado com fungicida.

O meio de cultura com fungicida foi preparado dissolvendo-se o produto em acetona (5,0 ml) e complementando-se o volume para 100 ml com água destilada esterilizada (solução estoque) de acordo com a técnica de EDGINTON et alii (1971), modificada por MENTEN et alii (1976). A partir desta solução foram feitas diluições, transferindo uma alíquota de 1,0 ml de cada suspensão para 1000 ml de meio BDA fundente ($\pm 45^{\circ}\text{C}$) de maneira a obter-se as concentrações desejadas para cada fungicida.

A incubação deu-se a temperatura ambiente sob luz fluorescente contínua.

A avaliação constistiu de:

a. Esporulação, após sete dias de incubação e a partir do preparo de suspensão de esporos destas e contagem em câmara de Neubauer. As suspensões de esporos foram preparadas em tubos de ensaio com 10 ml de solução de "tween 80", colocando dois discos de meio com 0,7 cm de diâmetro, contendo conídios e micélio das margens das colônias. Em seguida, os tubos foram mantidos sob agitação por 10 minutos.

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

$$RC\% = (DP - CTF)DP \times 100, \text{ onde:}$$

DP, diâmetro da placa de Petri (9,0 cm) e CTF é o total de crescimento da colônia (em cm) nos tratamentos.

A medida do diâmetro das colônias em crescimento foi efetuada no momento em que as testemunhas (tratamentos na dose 0 ppm dos fungicidas) tiveram crescimento máximo na placa de Petri.

3.7. Teste de antibiose dos isolados de *T. harzianum* e *T. viride* contra *S. minor* in vitro

O objetivo foi avaliar o comportamento dos isolados de *Trichoderma* spp. (item 3.2) como antagonistas ao fitopatógeno *S. minor*.

Esse método consistiu em cobrir assepticamente a superfície da placa de Petri contendo meio extrato de malte com discos de papel celofane. A seguir, discos de meio BDA, de 0,7 cm de diâmetro contendo micélios e conídios de *Trichoderma* sp, foram colocados no centro das placas, sobre a superfície do papel celofane (DENNIS & WEBSTER, 1971).

As colônias foram incubadas por 2 dias, à temperatura ambiente, na presença de luz fluorescente contínua.

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

Discos de cultura de *S. minor*, em meio BDA com seis dias de crescimento retirados das bordas das colônias, foram transferidos para o centro das placas. As placas foram levadas para incubadora a 22°C, na ausência de luz. Após 7 dias de incubação, observou-se o diâmetro de crescimento das colônias, comparando-os com a testemunha crescida em ausência de *Trichoderma* sp.

A porcentagem de inibição foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{cresc. testemunha} - \text{cresc. tratamento}}{\text{crescimento testemunha}} \times 100$$

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 4 repetições.

3.8. Curva de sobrevivência a luz ultravioleta

O objetivo do ensaio foi verificar o comportamento dos seis isolados de *Trichoderma* spp. (item 3.2), após seus conídios terem sido submetidos a ação do agente mutagênico ultravioleta, avaliando-se a taxa de sobrevivência em diferentes doses e tempos de irradiação para experimentos posteriores de comparação no antagonismo à fitopatógenos e resistência à fungicidas.

Conídios de seis isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de colônias com quatro dias de crescimento foram transferidos para solução de "tween 80", estimando-se o número de esporos por mililitro, através da câmara de Neubauer. A seguir, 1 ml de suspensão de 10^7 esporos/ml foi adicionada a solução salina (1:10), colocada em placa de Petri esterilizada e, procedeu-se a irradiação, mantendo-se sempre a suspensão a ser irradiada a uma distância de 17 cm da fonte de luz ultravioleta (253 nm), em ambiente escuro. Os tempos de exposição a fonte de ultravioleta foram 0, 1, 2, 4, 8 e 12 minutos para o isolado T2b e 0, 1, 2, 4, 6 e 8 para os demais. Após cada irradiação, procedeu-se as diluições em água esterilizada até 10^{-2} esporos/ml e 0,1 ml da

suspensão foi semeada em placas de Petri (3 repetições) contendo meio BDA suplementado com desixicolato de sódio 2%.

A incubação deu-se no escuro à temperatura ambiente, e após três dias, procedeu-se a contagem do número de colônias sobreviventes. Calculou-se, então, a porcentagem de sobrevivência utilizando-se a metodologia proposta por BARACHO & ROSIN (1977). Com os dados obtidos construiu-se as curvas de sobrevivência.

3.9. Obtenção de novos biótipos de *Trichoderma* sp. através do uso de luz ultravioleta

Com o objetivo de obter novos biótipos de *Trichoderma* sp. resistentes ao benomyl, foram irradiados na dose de 5% de sobrevivência sob luz ultravioleta, conídios em solução salina com "tween 80" das seis linhagens selvagens (item 3.2) de *Trichoderma* sp. (10^7 esporos/ml) obtidos de colônia com quatro dias de crescimento. Colocou-se 0,1 ml da suspensão de conídios irradiada por placa de Petri (15 repetições por isolado) contendo BDA suplementado com 2000 ppm do princípio ativo do fungicida benomyl. O fungicida, antes de ser misturado ao meio, foi solubilizado em 5 ml de acetona.

Após 48 horas, procedeu-se a contagem das colônias emergentes. Foram selecionadas as colônias isoladas

para testes posteriores. Para confirmação, os novos biótipos foram transferidos com auxílio de alça de platina para meio BDA suplementado com 2000 ppm de benomyl (2 repetições). Após sete dias procedeu-se a avaliação através da medida do diâmetro de crescimento das colônias. Foram selecionadas as dez colônias de maior diâmetro para testes subsequentes.

3.10. Teste de estabilidade dos novos biótipos de

T. harzianum (TW5)

Os novos biótipos de *T. harzianum* (TW5) submetidos a dez repicagens sucessivas, em meio BDA na ausência de benomyl, foram transferidos em discos de meio BDA de 0,7 cm de diâmetro, contendo micélios e esporos para placas de Petri com meio BDA suplementado com 2000 ppm do princípio ativo do fungicida.

Em seguida, efetuou-se a avaliação do diâmetro de crescimento das colônias aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias de incubação. No 10º dia avaliou-se a esporulação, como descrito no item 3.6.

A incubação deu-se a temperatura ambiente sob luz fluorescente contínua. Foi utilizado o delineamento fatorial em blocos ao acaso com 3 repetições por tratamento.

3.11. Teste de sensibilidade dos novos biótipos de

T. harzianum (TW5) ao fungicida iprodione in vitro

O objetivo foi verificar o comportamento dos dez novos biótipos, resistentes ao benomyl, à concentração de 1000 ppm do princípio ativo do fungicida iprodione aos 2, 4 e 6 dias de incubação.

As colônias dos novos biótipos foram inicialmente cultivada em meio BDA e, após quatro dias de incubação, discos com 0,7 cm de diâmetro foram retirados da margem das colônias e transferidos para placas de Petri contendo BDA suplementado com 1000 ppm de iprodione.

Determinou-se o diâmetro de crescimento das colônias e avaliou-se a porcentagem de redução do crescimento, aos 2, 4 e 6 dias de incubação. No 14º dia de incubação avaliou-se a esporulação (com descritos no item 3.6). A incubação deu-se à temperatura ambiente sob luz fluorescente contínua. O delineamento utilizado foi o fatorial em blocos ao acaso com 3 repetições.

3.12. Teste de sensibilidade de três dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5) aos fungicidas thiabendazole e tiofanato metílico, in vitro

O objetivo foi verificar o comportamento dos três (2B1, 2B2 e 2B6) dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5), às concentrações de 0, 10, 100 e 1000 ppm do princípio ativo dos fungicidas thiabendazole e tiofanato metílico.

A metodologia seguida foi a mesma utilizada para o item 3.11.

Determinou-se o diâmetro de crescimento das colônias e avaliou-se a percentagem de redução do crescimento no 6º dia de incubação. No 14º dia de incubação avaliou-se a esporulação (para os tratamentos de 0 e 1000 ppm dos fungicidas) como descritos no item 3.6. A incubação deu-se à temperatura ambiente sob luz fluorescente. O delineamento utilizado foi o fatorial em blocos ao acaso com 4 repetições por tratamento.

3.13. Teste de sensibilidade de *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* aos fungicidas benomyl e iprodione, in vitro

O objetivo foi verificar o comportamento de

S. minor, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, às concentrações de 0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 ppm de iprodione e benomyl.

A metodologia seguida foi a mesma utilizada no item 3.6.

Determinou-se o diâmetro de crescimento da colônia e avaliou-se a percentagem de redução de crescimento no 6º dia de incubação. A incubação deu-se à 22°C em ausência de luz. O delineamento utilizado foi o fatorial em blocos ao acaso com 3 repetições por tratamento.

3.14. Teste de antibiose com os novos biótipos de

T. harzianum (TW5) contra *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, in vitro

O objetivo foi avaliar o comportamento dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5) como antagonistas aos fitopatógenos *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.

A metodologia foi a mesma utilizada para o teste com *S. minor*, como descrito no item 3.7.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 4 repetições.

3.15. Teste de inibição de germinação de escleródios de *S. minor*. in vitro

O objetivo foi verificar a influência de metabólitos produzidos pelos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5) em meio BD, na germinação de escleródios de *S. minor*.

As colônias dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5) foram inicialmente cultivadas em meio BDA e, após quatro dias de incubação, três discos do meio contendo micélios e conídios com 0,7 cm de diâmetro, foram colocados em erlenmeyers de 250 ml com 100 ml de meio BD e incubados sob agitação por 7 dias a temperatura ambiente em ausência de luz. Os meios foram filtrados em condições assépticas, sendo 5 ml de cada filtrado transferidos para frascos esterilizados de 15 ml. Em seguida, 40 escleródios foram colocados nestes frascos onde permaneceram 18 horas.

Para cada tratamento, dez escleródios, secos em papel de filtro esterilizado, foram dispostos separadamente nas placas de Petri contendo ágar-água. Após 4 dias de incubação a 22°C em ausência de luz, foi observado o número de escleródios germinados. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 4 repetições.

3.16. Teste de antagonismo em confrontação direta de
três dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5)
contra *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*,
in vitro

Dentre os novos biótipos de *T. harzianum* (TW5), selecionou-se três biótipos, os quais apresentaram bons resultados nos experimentos anteriores de resistência aos fungicidas e inibição de fitopatógenos.

Os biótipos foram testados através do teste de culturas pareadas, conforme BELL et alii (1982), onde discos de meio BDA de 0,7 cm de diâmetro, contendo micélio de *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, foram transferidos para placas de Petri (de 9,0 cm) contendo meio BDA, a uma distância de aproximadamente 2,0 cm de suas bordas.

Esse material foi incubado durante 48 horas a 22°C em ausência de luz. Em seguida, discos de 0,7 cm de diâmetro contendo micélio e esporos dos três biótipos de *T. harzianum* (TW5), foram transferidos para as placas em posição oposta à colônia do patógeno e assim, mantidas durante 60 horas, na presença de luz fluorescente contínua a temperatura ambiente.

As avaliações foram feitas baseando-se no critério de BELL et alii (1982), onde utilizou-se uma escala de notas variando de 1 a 5, na qual o valor 1 foi atribuído quando os biótipos do antagonista invadiram completamente o

fitopatígeno e colonizou todo o substrato; 2, quando o antagonista invadiu pelo menos 2/3 da superfície do meio; 3, quando o antagonista e o patógeno colonizaram ambas as metades da superfície do meio; 4, o patógeno colonizou no mínimo 2/3 da superfície do meio e este parece se opor ao antagonista; e finalmente, o valor 5, quando o patógeno invadiu completamente o antagonista e ocupou toda a superfície do meio.

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

3.17. Caracterização dos novos biótipos e do isolado selvagem de *T. harzianum* (TW5)

3.17.1. Técnica citológica

Nos biótipos selecionados e no isolado parental de *T. harzianum* (TW5) foram realizadas observações citológicas através da coloração de núcleos, estimando-se o número de núcleos por conídios e tamanho (comprimento e largura) dos conídios (TANAKA et alii, 1979). Para estes estudos, os biótipos foram previamente cultivados em BDA durante 5 dias.

Conídios dos referidos biótipos foram aderidos às laminulas através de solução de albumina, utilizando-se para fixação, uma solução de álcool-ácido-acético

3:1, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A hidratação foi efetuada por tratamento sucessivo em álcool 95% e 70%, procedendo-se, em seguida, a hidrólise em ácido clorídrico 1N a 60°C, variando o tempo de hidrólise de acordo com os biótipos.

Os conídios foram corados por imersão em solução Giemsa diluída de 1 para 6 com tampão fosfato 0,02 M pH 7,0, durante 10 a 15 minutos. O excesso de corante foi retirado por lavagem com o mesmo tampão. Para observações microscópicas foi utilizado o microscópio Olympus, modelo BHS, associado ao sistema fotomicrográfico Olympus modelo PM-10 AD, quando necessário.

3.17.2. Crescimento em meio de aveia

Com o objetivo de estudar a esporulação, crescimento e coloração das colônias dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5), cultivou-se inicialmente as colônias em meio BDA, e após quatro dias de incubação, discos de meio contendo micélio e conídios com 0,7 cm de diâmetro contendo micélio e conídios, foram retirados da margem das colônias e transferidos para placas de Petri contendo meio de aveia.

Foi determinado o diâmetro de crescimento das colônias e avaliou-se a percentagem de redução de crescimento, aos 1, 2 e 3 dias de incubação. No 7º dia de incubação observou-se a esporulação (como descritos no item

3.6), a coloração e a presença de setores nas colónias. A incubação deu-se à temperatura ambiente sob luz fluorescente contínua. O delineamento utilizado foi o fatorial em blocos ao acaso com 3 repetições.

3.18. Caracterização para padrões de esterase e proteínas totais de *T. harzianum* (TW5) e mutantes

Com o objetivo de verificar a diversidade genética dos novos biótipos 2B1, 2B2 e 2B6 e *T. harzianum* (TW5) utilizou-se a metodologia apresentada por PACCOLA-MEIRELLES et alii (1988) na extração de proteínas, preparo das amostras e do gel acrilamida para eletroforese.

3.18.1. Coloração para revelação da atividade esterase

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

3.18.2. Coloração para revelação da atividade de proteínas totais

Os géis de poliacrilamida foram incubados em solução corante, a temperatura ambiente, por uma noite. Fixou-se com fixador PAGE por uma hora e em seguida aplicou-se o descorante repetidas vezes.

3.19. Experimento em casa de vegetação

3.19.1. Preparo do inóculo de *S. minor* e dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5)

Foi colocado arroz integral em plásticos de polipropileno de 500 ml até 2/3 da capacidade, adicionando-se 40 ml de água destilada, e levados para esterilização em autoclave, a 120°C por 1 hora em dois dias consecutivos. Em seguida, colocou-se 200 a 300 escleródios de *S. minor* ou três discos de BDA de 0,7 cm de diâmetro contendo micélio e conídios dos três novos biótipos de *T. harzianum* (TW5), respectivamente em cada saco.

Para incubação os sacos contendo os fitopatógenos foram mantidos a 22°C, e para os antagonistas, à temperatura ambiente, até que os grãos de arroz estivessem totalmente colonizados pelos respectivos fungos.

3.19.2. Preparo do substrato

O Latossolo Vermelho amarelo "Paredão Vermelho", de textura média foi misturado com esterco bovino e areia lavada de rio, na proporção de 3:1:1 (Tabela 1). A mistura foi autoclavada a 121°C por 2 horas.

Tabela 1. Análise química da amostra da mistura do Latossolo Vermelho amarelo "Paredão Vermelho", areia lavada de rio e esterco bovino na proporção 3:1:1¹

	C%	PO_4^{-3}	K^+	Mg^{2+}	$H^+ + Al^{3+}$
pH	em miliequivalente/100g de terra				
5,5	3,4	226	3,25	3,29	2,0

¹ As análises químicas foram analisadas pelo Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes da ESALQ/USP.

3.19.3. Uso de três dos novos biótipos no controle integrado com o fungicida benomyl, de *S. minor* em plantas de alface

O objetivo foi verificar o efeito dos três novos biótipos resistentes ao benomyl (2B1, 2B2 e 2B6) sobre

a incidência de podridão de esclerotínia, causado por *S. minor*, em alface, em tratamentos combinados e não combinados com dose reduzida do princípio ativo do fungicida benomyl. O experimento foi feito em vasos com capacidade para 2 kg de solo (preparado segundo o item 3.19).

A inoculação dos biótipos foi feita na hora do plantio das mudas, sendo colocado 40g de inóculo preparado segundo o item 3.19. Também na hora do plantio, foi colocado 5 ppm do princípio ativo do fungicida benomyl por vaso em solução, para os tratamentos combinados.

O patógeno foi inoculado 14 dias após o plantio, colocando-se 5 grãos de arroz colonizados por *S. minor* próximo ao colo de cada planta de alface.

A avaliação consistiu da verificação do número de plantas mortas por vaso após 64 dias da montagem do experimento.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições e quatro plantas por repetição.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Reação de sensibilidade de isolados de *T. viride* e *T. harzianum* aos fungicidas benomyl e iprodione

4.1.1. Ação dos fungicidas sobre o crescimento micelial dos isolados selvagens de *Trichoderma* spp.

As análises de variância (Tabelas 1 e 2 do Apêndice) dos resultados obtidos para a reação de sensibilidade dos isolados de *T. viride* e *T. harzianum* aos fungicidas benomyl e iprodione, detectaram pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O efeito exercido pelos fungicidas benomyl e iprodione foi variável de acordo com os isolados e as concentrações testadas. Foram observadas interações significativas entre as concentrações testadas e os isolados, indicando que houve dependência entre os dois fatores.

De modo geral, os fungicidas benomyl e ipro-

dione, presentes em meio de cultura, exerceram efeito negativo sobre o crescimento micelial dos isolados *T. harzianum* e *T. viride*.

Para benomyl (Tabela 2), a partir de 2,50 ppm ocorreram reduções de 100% no crescimento dos isolados, com exceção do isolado TW5, em que a redução do crescimento micelial foi próxima a 50%, sendo o mais resistente. A 1,0 ppm os isolados TMA4 e Tlig jap sofreram 100% de redução e os isolados Tal8, T2b e Tal1 acima de 80% de redução, sendo que o isolado TW5 foi o mais resistente, com cerca de 7% de redução. As doses de 0,25 e 0,50 ppm do fungicida não diferiram significativamente entre si, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação a redução do crescimento micelial dos isolados. Nesta dose, foram observadas reduções do crescimento micelial dos isolados acima de 50%, com exceção do isolado TW5, que não foi sensível a essas doses.

Para iprodione (Tabela 3), foram observadas reduções de 100% no crescimento de todos os isolados a partir de 100 ppm. A 10 ppm os isolados T2b e Tlig jap sofreram 100% de redução e os isolados Tal8, TMA4 e Tal1 acima de 70% de redução, sendo o isolado mais resistente o TW5 com cerca de 50% de redução do crescimento micelial. Na concentração de 5,0 ppm e 2,50 ppm os isolados menos afetados foram TMA4 e TW5, sendo que o isolado mais resistente a 2,5 ppm foi TMA4 e a 5,0 ppm foi TW5.

Tabela 2. Percentagem de redução do crescimento micelial de seis isolados selvagens de *Trichoderma* spp., em meio BDA contendo diferentes concentrações de benomyl (média de três repetições).

Isolados	% de redução do crescimento micelial				
	Concentrações (ppm p.a.)				
	0,00	0,25	0,50	1,00	2,50
<i>T. harzianum</i> (Ta18)	0,00 aA	69,93 aB	72,97 aB	85,19 bC	100,00 aD
<i>T. harzianum</i> (TMA4)	0,00 aA	50,37 dB	57,44 dB	100,00 aC	100,00 aC
<i>T. viride</i> (T2b)	0,00 aA	71,95 aB	75,19 aB	85,57 bC	100,00 aD
<i>T. viride</i> (Ta11)	0,00 aA	61,85 bB	64,45 bB	83,00 bC	100,00 aD
<i>T. harzianum</i> (TW5)	0,00 aA	0,00 eA	0,00 eA	7,17 cB	49,25 bC
<i>T. viride</i> (T. lig jap)	0,00 aA	55,93 cB	60,37 cB	100,00 aC	100,00 aC

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si, para comparação de concentrações dentro de isolados (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, para comparação de isolados dentro de concentrações (teste de Tukey 1%).

Tabela 3. Percentagem de redução do crescimento micelial de seis isolados selvagens de *Trichoderma* spp, em meio BDA contendo diferentes concentrações de iprodione (média de três repetições).

Isolados	% de redução do crescimento micelial				
	Concentrações (ppm p.a.)				
	0,00	2,50	5,00	10,00	100,00
<i>T. harzianum</i> (Ta18)	0,00 aA	52,59 bB	77,04 bC	80,38 cC	100,00 aD
<i>T. harzianum</i> (TMA4)	0,00 aA	26,21 eB	60,74 dC	73,35 dD	100,00 aE
<i>T. viride</i> (T2b)	0,00 aA	48,50 cB	74,08 cC	100,00 aD	100,00 aD
<i>T. viride</i> (Ta11)	0,00 aA	68,17 aB	77,04 bC	82,61 bC	100,00 aD
<i>T. harzianum</i> (TW5)	0,00 aA	41,84 dB	47,77 eBC	50,37 eC	100,00 aD
<i>T. viride</i> (T.lig jap)	0,00 aA	67,43 aB	83,77 aC	100,00 aD	100,00 aD

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si, para comparação de concentrações dentro de isolados (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, para comparação de isolados dentro de concentrações (teste de Tukey 1%).

4.1.2. Ação dos fungicidas sobre a esporulação dos isolados selvagens de *Trichoderma* spp.

Através das análises de variância (Tabelas 3 e 4 do Apêndice) foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste F, ao nível de 1% de probabilidade. Foram observadas interações significativas entre as concentrações testadas e os isolados, indicando que houve dependência entre os dois fatores.

Como para o crescimento micelial, os fungicidas benomyl e iprodione, presentes em meio de cultura, também exerceram efeito negativo sobre a esporulação dos isolados de *T. harzianum* e *T. viride*. O efeito exercido pelos fungicidas foi variável de acordo com os isolados e as concentrações testadas.

Para benomyl (Tabela 4), a partir de 1 ppm não foi observada esporulação nos isolados, com exceção dos isolados Tal1 e TW5, que apesar de terem produzido esporos, a quantidade observada diferiu significativamente dos demais, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. A 0,5 e 0,25 ppm os isolados TMA4, Tal1 e TW5 foram os que mais esporularam em relação aos demais.

Para iprodione (Tabela 5), a partir de 10,0 ppm não houve esporulação dos isolados. A 5,0 ppm, apenas os isolados TMA4 e TW5 esporularam, sendo que o isolado TMA4 foi o que mais esporulou. A 2,5 ppm, os mais resistentes foram o TMA4 e T.lig jap, sendo ainda o TMA4 o melhor isolado.

Tabela 4. Esporulação de seis isolados selvagens de *Trichoderma* spp. em meio contendo diferentes concentrações de benomyl (média de três repetições).

Isolados	Esporos produzidos x 10 ⁵ / ml				
	Concentrações (ppm p.a.)				
	0,00	0,25	0,50	1,00	2,50
<i>T. harzianum</i> (Ta18)	21,35 aA	0,96 dB	0,08 dB	0,00 aB	0,00 aB
<i>T. harzianum</i> (TMA4)	13,27 eA	8,47 bAB	4,85 aB	0,00 aC	0,00 aC
<i>T. viride</i> (T2b)	14,64 dA	0,20 eB	0,00 dB	0,00 aB	0,00 aB
<i>T. viride</i> (Ta11)	15,49 cA	10,89 aA	2,88 bB	0,08 aC	0,00 aC
<i>T. harzianum</i> (TW5)	5,55 fA	1,60 cB	1,17 cBC	0,11 aC	0,00 aC
<i>T. viride</i> (T.11g jap)	16,09 bA	0,00 eB	0,00 dB	0,00 aB	0,00 aB

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si, para comparação de concentrações dentro de isolados (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, para comparação de isolados dentro de concentrações (teste de Tukey 1%).

Tabela 5. Esporulação de seis isolados selvagens de *Trichoderma* spp., em meio BDA contendo diferentes concentrações de iprodione (média de três repetições).

Isolados	Esporos produzidos x 10 ⁵ / ml				
	Concentrações (ppm p.a.)				
	0,00	2,50	5,00	10,00	100,00
<i>T. harzianum</i> (Ta18)	54,56 cA	1,15 cB	0,00 cC	0,00 aC	0,00 aC
<i>T. harzianum</i> (TMA4)	62,33 aA	3,64 aB	1,88 aB	0,00 aC	0,00 aC
<i>T. viride</i> (T2b)	26,33 fA	0,86 cB	0,00 cB	0,00 aB	0,00 aB
<i>T. viride</i> (Ta11)	44,68 dA	0,65 cB	0,00 cB	0,00 aB	0,00 aB
<i>T. harzianum</i> (TW5)	56,25 bA	0,61 cB	0,40 bB	0,00 aB	0,00 aB
<i>T. viride</i> (T. lig jap)	40,31 eA	2,33 bB	0,00 cC	0,00 aC	0,00 aC

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si, para comparação de concentrações dentro de isolados (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, para comparação de isolados dentro de concentrações (teste de Tukey 1%).

O interesse em estudar a resistência de isolados de *Trichoderma* spp a fungicidas está na utilização deste antagonista no controle integrado de fitopatógenos. Conídios e micélios de isolados resistentes podem ser usados em conjunto com fungicidas para tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo (PAPAVIZAS et alii, 1982).

O comportamento de *Trichoderma* spp. é variável em relação aos fungicidas de maneira geral, podendo ser resistentes a iprodione, mas não aos benzimidazóis (ABD-EL MOITY, 1982; ALLEN et alii, 1980; CHANG et alii, 1986; PAPAVIZAS, 1982; STRASHNOW et alii, 1985). Esta afirmação concorda com os resultados obtidos que mostram ser os isolados de *T. viride* e *T. harzianum* mais resistentes a iprodione em relação ao benomyl (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

HOMECHIN (1987) testou sete isolados de *T. harzianum* quanto a resistência aos fungicidas benomyl, thiram + iprodione, thiram, thiabendazole e captan. Concentrações acima de 0,1 ppm de todos os fungicidas testados inibiram o crescimento micelial, enquanto que, thiram e thiram + iprodione inibiram a esporulação. SANTOS (1989) testou isolados de *Trichoderma* spp. quanto a sua resistência ao benomyl, iprodione, captan e procymidone. Os isolados testados foram sensíveis a benomyl para todas concentrações testadas. Para iprodione, a partir de 1,0 ppm foi observada

inibição acima de 55%, para os fungicidas captan e procymidone a inibição foi variável entre os isolados.

Os resultados mostram (Tabelas 2, 3, 4 e 5) reduções no crescimento micelial e na esporulação a partir de 0,25 ppm de benomyl e 2,50 ppm de iprodione para os isolados de *T. harzianum* e *T. viride*.

4.2. Antibiose de *T. viride* e *T. harzianum* contra *S. minor* in vitro

Metabólitos dos isolados de *T. harzianum* e *T. viride* (Tabela 6) inibiram 100% o crescimento micelial de *S. minor*, com exceção do isolado T.lig jap com 98,88% de percentagem de inibição. No entanto, DENNIS & WEBSTER (1971) verificaram em seus experimentos de antibiose, que a produção de metabólitos tóxicos variou amplamente entre diferentes espécies e dentro de cada espécie de *Trichoderma*.

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

As medidas de controle recomendadas para o combate à podridão esclerotínia, em campos de alface, como inundação de terrenos infestados, rotação de culturas, aplicação de fungicidas e uso de variedades resistentes não são

muito eficientes (GROGAN, 1979; BARROS, 1988). Assim, um método alternativo de controle seria o uso de isolados selecionados de *Trichoderma* spp. para o controle de *S. minor*.

Tabela 6. Percentagem de inibição micelial de *S. minor* por metabólitos dos isolados selvagens de *T. viride* e *T. harzianum* (média de 4 repetições).

Isolados	Porcentagem de inibição
Ta18	100,00
TMA4	100,00
T2b	100,00
Ta11	100,00
TW5	100,00
T.lig jap	98,88
Controle	0,00

Vários metabólitos tóxicos são produzidos *in vitro* por *Trichoderma* spp. Isto é uma evidência de que esses metabólitos são produzidos em frações da matéria orgânica do solo (Wright, 1956² citado por PAPAVIZAS, 1985),

² WRIGHT, J.M. The production of antibiotics in soil. III. Production of gliotoxin in wheatstraw buried in soil. *Ann. Appl. Biol.*, 44: 461-6, 1956.

porém, não há evidência direta que os antibióticos sejam produzidos no solo em quantidade suficiente para induzir na área, resultados efetivos de controle biológico de fitopatógenos (PAPAVIZAS, 1985).

Muitos isolados de *Trichoderma* spp. produzem antibióticos não voláteis e ativos contra uma certa faixa de fungos. DENIS & WEBSTER (1971) observou que dois isolados de *T. harzianum*, um isolado de *T. aureoviride* e quatro de *T. pseudokoningii* produziram antibióticos não voláteis difusivos que causaram apreciável redução no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*.

4.3. Curva de sobrevivência a luz ultravioleta

Com o aumento do tempo de irradiação houve diminuição da sobrevivência. Houve variação quanto a sobrevivência de esporos dos isolados de *T. viride* e *T. harzianum* (Tabela 7). Houve variação quanto a sobrevivência dos isolados nos diferentes tempos de exposição à luz U.V. (Figura 1). Para todos os isolados, o nível de 5% de sobrevivência foi atingido em menos de 6 minutos de exposição. Para o isolado T2b o nível de 5% de sobrevivência esteve próximo aos 4 minutos de exposição a luz U.V., para Tal1 entre 1 e 2 minutos de exposição, T.lig jap entre 6 e 4 minutos, TMA4 e Tal8 entre 4 e 2 minutos e TW5 próximo aos 2 minutos.

Tabela 7. Percentagem de esporos de isolados de *Trichoderma* sp. sobreviventes à luz ultravioleta (média de três repetições).

Tempo de irradiação U.V. (minutos)	Percentagem de sobrevivência					
	Tal2	Tal1	T.lig jap	TMA4	TW5	Tal8
0	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000
1	44,280	22,570	95,450	91,090	26,680	18,520
2	26,690	0,900	26,580	54,210	5,370	14,950
4	4,490	0,800	10,090	0,420	0,010	0,680
6	-	0,160	0,120	0,060	0,000	0,040
8	0,050	0,100	0,030	0,030	0,000	0,004
12	0,030	-	-	-	-	-

Figura 1. Sobrevivência de conídios dos isolados Tal1, T2b, e T.lig jap de *Trichoderma viride* e Tal8, TMA4 e TW5 de *Trichoderma harzianum* em diferentes tempos de exposição à luz ultravioleta.

Embora os resultados mostrem a sensibilidade de todos os isolados a luz ultravioleta, resultados obtidos por HOMECHIN (1987) mostraram uma alta resistência de um isolado de *T. harzianum* a luz ultravioleta. Segundo o autor, tal resistência pode ser devida a um eficiente mecanismo de reparo existente no isolado e que deve ter se desenvolvido como proteção a luz solar.

A luz ultravioleta tem sido utilizada com sucesso na obtenção de mutantes das espécies do gênero *Trichoderma* (PAPAVIZAS et alii, 1982; PAPAVIZAS & LEWIS, 1983; GULLINO & GARIBALDI, 1988; LIU, 1988; BENSACI & NEUMANN, 1989; FURLANETO, 1989; MELO, 1989 e SILVA & MELO, 1989).

A existência de variabilidade genética para o caráter de sensibilidade à luz ultravioleta é muito importante do ponto de vista aplicado, pois uma das limitações na utilização dos fungos em condições de campo é a morte dos conídios pela radiação ultravioleta da luz solar (CORREIA & AZEVEDO, 1986).

4.4. Obtenção de novos biótipos de *Trichoderma* spp. através do uso de luz ultravioleta

Dos isolados de *T. viride* e *T. harzianum* somente foram obtidas colônias resistentes ao benomyl da suspensão de esporos irradiada do isolado TW5 de *T. harzianum*.

Foram selecionadas 26 colônias de 15 placas de Petri com BDA suplementado com 2000 ppm do fungicida. Em seguida, as colônias foram transferidas novamente para meio BDA com a mesma dose do fungicida, onde avaliou-se o diâmetro de crescimento (Tabela 8). Foram selecionadas as dez colônias de maior diâmetro para testes subsequentes.

Tabela 8. Diâmetro de crescimento de 26 biótipos do isolado de *Trichoderma harzianum* TW5 resistentes ao benomyl em meio BDA suplementado com 2.000 ppm do fungicida (média de 2 repetições).

Biótipos (n°)	Diâmetro de crescimento (cm)
1	9,00
2	8,25
3	8,00
4	7,50
5	6,30
6	7,25
7 e 8	7,00
9	6,50
10 a 18	6,00
19	5,85
20 e 21	5,75
22, 23, 24	5,50
25 e 26	5,00

Vários trabalhos têm relatado a eficiência da irradiação ultravioleta na obtenção de novos biótipos de *Trichoderma* spp. resistentes a benomyl (PAPAVIZAS et alii, 1982; PAPAVIZAS & LEWIS, 1983; LIU, 1988; BENSACI & NEWMANN, 1989). Mas somente pelo uso do mutagênico químico dietil sulfato se obteve um novo biótipo que pôde resistir a 1.000 ppm de benomyl, sem diminuir sua capacidade de micoparasitismo, lise e antibiose contra *R. solani* e *R. rolfsii* em relação ao isolado parental (LIU, 1988).

Com os resultados obtidos nesse experimento pode-se concluir que a luz ultravioleta também pode ser eficiente na obtenção de novos biótipos resistentes a altas concentrações de benomyl.

4.5. Estabilidade dos novos biótipos de

T. harzianum (TW5)

Após quatro repicagens sucessivas dos biótipos em meio BDA, na ausência de benomyl, os biótipos mantiveram a característica de crescimento e esporulação em meio BDA suplementado com 2.000 ppm do fungicida.

Tal resultado concorda com os resultados de PAPAVIZAS et alii (1982). Estes autores empregaram a irradiação ultravioleta em *T. harzianum* (WT-6) na obtenção de biótipos resistentes ao benomyl, sendo a característica de resistência estável para os novos biótipos.

4.5.1. Ação do fungicida benomyl sobre o crescimento micelial dos novos biótipos de *T. harzianum* TW5

As análises de variância (Tabela 5 do Apêndice) dos resultados obtidos para o fungicida benomyl, detectaram diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O efeito exercido pelo fungicida benomyl foi variável de acordo com os isolados e entre os dias de avaliação. Foram observadas interações significativas entre os isolados testados e os dias de crescimento, indicando que foi variável a velocidade de crescimento entre os isolados.

O isolado 2B2 obteve a menor percentagem de redução micelial, sendo o mais resistente, aos 10 dias de incubação, seguindo-se os isolados 2B4, 2B6 e 2B1 que foram estatisticamente semelhantes ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey (Tabela 9).

No 8º dia de incubação, o isolado 2B2 obteve a menor percentagem de redução de crescimento, seguindo-se os isolados 2B9 e 2B6. No 6º dia, o isolado 2B2 obteve também a menor percentagem de redução, seguindo-se os isolados 2B4 e 2B1. Aos 4 dias, 2B4 e 2B8 foram os isolados que obtiveram as menores percentagens de redução de crescimento micelial. Os diferentes comportamentos dos isolados em relação aos dias de incubação também indicaram que as velocidades de crescimento das colônias foram variáveis.

Tabela 9. Percentagem de redução do crescimento micelial dos novos biótipos de *Trichoderma harzianum* (TW5) resistente ao benomyl, em meio BDA suplementado com 2.000 ppm do fungicida (média de três repetições).

Biótipos	% de redução de crescimento micelial				
	Dias de incubação				
	2	4	6	8	10
2B1	78,92 bcdA	61,88 bcB	39,99 cdC	27,40 bcD	8,69 cdE
2B2	77,41 cdA	54,82 dB	31,85 eC	12,04 fD	0,00 eE
2B3	77,42 cdA	63,72 abcB	51,11 aC	32,88 aD	18,79 aE
2B4	76,33 dA	50,37 eB	38,14 dC	22,18 dD	5,52 dE
2B5	81,70 abA	65,56 aB	52,59 aC	29,24 bD	17,17 aE
2B6	80,37 abcA	60,76 cB	44,42 bC	20,69 deD	6,30 dE
2B7	83,36 aA	64,11 abB	44,81 bC	29,25 bD	10,05 cE
2B7	76,33 dA	51,11 eB	40,72 cB	22,88 dC	9,60 cD
2B8	81,59 abA	63,35 abcB	42,22 bcC	17,71 eD	10,38 bcD
2B9	81,52 abA	64,82 abB	51,11 aC	27,36 bcD	13,25 bE
2B10					

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si, para comparação de dias de incubação dentro de biótipos (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, para comparação de biótipos dentro de dias de incubação (teste de Tukey 1%).

4.5.2. Ação do fungicida benomyl sobre a esporulação dos novos biótipos de *T. harzianum* TW5

Através da análise de variância (Tabela 6 do Apêndice), foi detectado pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade. Como é mostrado na Tabela 10, o isolado 2B3 produziu menos esporos diferindo significativamente, a 1% pelo teste de Tukey, dos demais. Os demais isolados não diferiram estatisticamente na produção de esporos.

A obtenção de novos biótipos de *Trichoderma* spp. resistentes a fungicidas como benomyl, com características estáveis, favorece a utilização deste agente biológico no controle efetivo de um ou mais fitopatógenos, em combinação com fungicidas

Novos biótipos de *T. harzianum* resistentes a fungicidas como chlorotalonil, procymidone, iprodione e vinclozolin (PAPAVIZAS, 1980 e 1985) têm sido desenvolvidos pela exposição de conídios a concentrações crescentes de fungicidas em meios de cultura e pela seleção das colônias sobreviventes a altas concentrações. Alguns biótipos com resistência obtida por esse método, sobreviveram por mais tempo no solo, mas outros foram menos persistentes. Poucos biótipos selecionados mostraram um aumento na capacidade de biocontrole dos fitopatógenos. Vários biótipos resistentes perderam a capacidade de resistir aos fungicidas após repetidas transferências para meio de cultura sem fungicidas.

Se a resistência a fungicidas pelos biótipos, obtidos por esse método, resultaram de uma adaptação não genética, ela é instável. O desenvolvimento de biótipos resistentes pela modificação do genoma pode ser um trabalho mais promissor para o biocontrole de fitopatógenos. A mutagenese induzida tem sido utilizada com sucesso no aumento de produção de enzimas em linhagens de *Trichoderma*, usadas nos processos de microbiologia industrial, e também em isolados selvagens de *T. harzianum* e *T. viride* para o desenvolvimento de novos biótipos. Estes biótipos induzidos podem resistir a concentrações de 50 a 500 ppm de benomyl *in vitro* (PAPAVIZAS, 1985).

A modificação no sítio de ação, resultando em menor afinidade com o fungicida; desvio do sítio bloqueado por uma operação alternativa; redução da absorção ou acúmulo do fungicida; processos de destoxificação, etc. são alguns mecanismos que podem ser responsáveis pela resistência a fungicidas (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982; GHINI, 1989). Os fungicidas geneticamente ativos podem ser também responsáveis pela formação de novos biótipos de fungos, através da mutação gênica, quebra cromossômica, não disjunção mitótica e recombinação (ABD-DEL MOITY, 1982).

A ação dos benzimidazóis é sugerido ser específica na mitose, através da instabilidade mitótica a níveis baixos destes fungicidas ou da inibição da mitose a níveis mais altos. Os fungos filamentosos podem adquirir resis-

tência aos benzimidazóis pela alteração da β -tubulina, componente dos microtúbulos (DAVIDSE & FLACH, 1977).

Tabela 10. Esporulação dos novos biótipos de *Trichoderma harzianum* (TW5) resistentes a 2.000 ppm do fungicida benomyl em meio BDA suplementado com 2.000 ppm do fungicida (média de 3 repetições).

Biótipos	Esporos produzidos $\times 10^5$ /ml
2B1	38,418 a
2B2	37,327 a
2B3	12,444 b
2B4	28,640 a
2B5	41,225 a
2B6	39,997 a
2B7	34,060 a
2B8	26,340 ab
2B9	52,002 a
2B10	38,731 a

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

4.6. Sensibilidade dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5) ao fungicida iprodione, in vitro

4.6.1. Ação do fungicida iprodione sobre o crescimento micelial dos novos biótipos de *T. harzianum* TW5

Os resultados obtidos pelas análises de va-

riância (Tabela 7 do Apêndice) para o fungicida iprodione, mostraram diferenças significativas entre os tratamentos, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F.

O efeito exercido pelo fungicida iprodione foi variável de acordo com os isolados e entre os dias de avaliação. As interações significativas observadas entre os isolados e os dias de incubação indicaram que a velocidade de crescimento entre os isolados foi variável.

Os biótipos 2B1, 2B2, 2B4, 2B6 e 2B8 tiveram no 6º dia de incubação, a menor percentagem de redução de crescimento micelial (Tabela 11).

No 4º dia de incubação, os biótipos 2B1, 2B2, 2B10 e 2B7 tiveram a menor percentagem de redução de crescimento micelial. No 2º dia de incubação não houve diferença significativa, a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, entre os biótipos.

4.6.2. Ação do fungicida iprodione sobre a esporulação dos novos biótipos de *T. harzianum* TW5

Através da análise de variância (Tabela 8 do Apêndice) foi detectado pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos, pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade. Como é mostrado na Tabela 12), os isolados que mais esporularam foram o 2B2, 2B10, 2B4 e 2B7, os quais

foram estatisticamente semelhantes, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 11. Percentagem de redução de crescimento dos novos biótipos de *Trichoderma harzianum* TW5 resistentes ao benomyl em BDA suplementado com 1.000 ppm de iprodione, nos 2º, 4º e 6º dias de crescimento média de 3 repetições).

Biótipos	% redução de crescimento		
	Dias de incubação		
	2	4	6
2B1	87,04 aA	44,81 cB	0,00 cC
2B2	85,93 aA	47,40 cdB	0,00 cC
2B3	88,52 aA	81,55 aB	38,01 aC
2B4	84,83 aA	38,89 dB	0,00 cC
2B5	85,57 aA	42,59 dB	2,14 cC
2B6	88,89 aA	42,58 dB	0,00 cC
2B7	87,04 aA	54,45 bcB	15,91 bC
2B8	83,33 aA	41,09 dB	0,00 cC
2B9	88,89 aA	58,17 bB	37,38 aC
2B10	87,04 aA	45,92 cB	5,41 cC

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si, para comparação de dias de incubação dentro de biótipos (teste de Tukey).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para comparação de biótipos dentro de dias de incubação (teste de Tukey 1%).

SILVA & MELO (1989) obtiveram biótipos, resistentes a 2.000 ppm do p.a. de iprodione, que apresentaram diferenças entre si na esporulação e crescimento micelial, concordando com os resultados obtidos nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 12. Esporulação dos novos biótipos de *Trichoderma harzianum* TW5 em meio BDA suplementado com 1.000 ppm de fungicida iprodione (média de 3 repetições).

Biótipos	Esporos x 10 ⁷ /ml
2B1	1,146 abc
2B2	2,009 a
2B3	0,166 e
2B4	1,176 abc
2B5	0,869 bcd
2B6	0,555 cde
2B7	1,100 abc
2B8	0,776 bcde
2B9	0,306 de
2B10	1,509 ab

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

A indução de resistência à fungicidas em *Trichoderma* spp. e a seleção de biótipos estáveis para serem utilizados em combinações com fungicidas é uma das opções

para se obter um esquema de controle efetivo de um ou mais fitopatógenos.

Segundo ABD-EL MOITY (1982) a combinação de iprodione com um isolado de *T. harzianum*, estirpe T resistente a iprodione, deu um alto índice de controle de *S. cepivorum*, em cebola, quando comparado somente ao emprego do fungicida.

Os mecanismos de resistência aos fungicidas do grupo dos dicarbomixidas são ainda pouco conhecidos (GHINI, 1989).

4.7. Sensibilidade de três dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5) aos fungicidas thiabendazole e tiofanato metílico, in vitro

4.7.1. Ação do fungicida tiofanato metílico sobre o crescimento micelial de três dos novos biótipos de *T. harzianum* TW5

Os resultados obtidos pelas análises de variância (Tabela 9 do Apêndice) para o fungicida tiofanato metílico mostraram diferenças significativas entre os tratamentos, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O efeito exercido pelo fungicida tiofanato metílico na redução de crescimento dos novos biótipos até 100 ppm do p.a. foi nulo, sendo que o isolado selvagem TW5 obteve redução de crescimento de 100% na mesma dose. O

efeito exercido pela dose de 1.000 ppm (p.a.) do fungicida foi variável entre os novos biótipos, sendo que o isolado 2B6 apresenta a menor percentagem de redução de crescimento (Tabela 13).

Tabela 13. Percentagem de redução de crescimento micelial de três novos biótipos de *Trichoderma harzianum* (TW5) em BDA suplementado com diferentes doses de tiofanato metílico (média de 4 repetições).

Biótipos	% de redução de crescimento micelial			
	Tiofanato metílico (ppm p.a.)			
	0	10	100	1000
TW5	0,00 aA	86,77 aB	100,00 aC	100,00 aC
2B1	0,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	59,45 bB
2B2	0,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	46,66 cB
2B6	0,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	40,55 dB

- Médias seguidas de mesma letra maiúsculas não diferem entre si para comparação de concentrações dentro de biótipos (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para comparação de biótipos dentro de concentrações (teste de Tukey 1%).

4.7.2. Ação do fungicida thiabendazole sobre o crescimento micelial de três dos novos biótipos de *T. harzianum* TW5

Através da análise de variância (Tabela 10 do Apêndice), foi detectado pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos, pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade. Como é mostrado na Tabela 14, os novos biótipos apresentaram percentagens de redução de crescimento acima de 70% a 100 ppm do p.a. do fungicida. Sendo que o isolado 2B6 apresentou o menor valor, diferindo estatisticamente dos demais ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 14. Percentagem de redução de crescimento micelial de três dos novos biótipos de *Trichoderma harzianum* (TW5) em BDA suplementado com diferentes doses de thiabendazole (média de 4 repetições).

Biótipos	% de redução de crescimento micelial			
	Thiabendazole (ppm p.a.)			
	0	10	100	1000
TW5	0,00 aA	100,00 aB	100,00 aB	100,00 aB
2B1	0,00 aA	26,10 bB	76,70 bC	80,63 bD
2B2	0,00 aA	12,77 cB	77,08 bC	83,36 bD
2B6	0,00 aA	5,53 dB	72,22 cC	76,70 Cd

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si para comparação de concentrações dentro de biótipos (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para comparação de biótipos dentro de concentrações (teste de Tukey 1%).

4.7.3. Ação dos fungicidas tiofanato metílico e thiabendazole sobre a esporulação de três novos biótipos de *T. harzianum* TW5

As análises de variância (Tabela 11 do Apêndice) dos resultados obtidos para esporulação dos novos biótipos detectaram pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O efeito exercido pelos fungicidas thiabendazole e tiofanato metílico foi variável entre os três biótipos de *T. harzianum* TW5. Como é visto na Tabela 15, o biótipo 2B2 foi o que mais esporulou nos meios suplementados com 1.000 ppm do p.a. dos fungicidas, diferindo significativamente dos demais ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

HOMECHIN (1987) testou sete isolados de *T. harzianum* quanto à sua resistência a thiabendazole. Concentrações acima de 0,1 ppm inibiram o crescimento micelial do isolado. Conforme os resultados mostrados nas Tabelas 14 e 15, o isolado selvagem *T. harzianum* TW5 não esporulou e nem cresceu na dose de 10,0 ppm do fungicida thiabendazole.

Os resultados apresentados nas Tabelas 13 a 15 concordam com os resultados de PAPAVIZAS & LEWIS (1983) sobre a resistência de mutantes de *T. viride*, obtidos por exposição do selvagem a irradiação ultravioleta, às doses

acima de 100 ppm do p.a. de thiabendazole, tiofanato metílico e benomyl.

Tabela 15. Esporulação de 3 dos novos biótipos de *Trichoderma harzianum* (TW5) em 1.000 ppm do p.a. dos fungicidas thiabendazole (Tb) e tiofanato metílico (TM) (média de 4 repetições).

Isolados	Esporos x 10 ⁵ /ml		
	0 ppm	1000ppm TM	1000ppm Tb
TW5	21,37 cA	0,00 dB	0,00 dB
2B1	25,77 aA	17,20 bA	4,50 bB
2B2	23,00 bA	59,37 aB	8,32 aC
2B6	6,02 dA	2,00 cA	3,75 cA

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si para comparação de concentrações dentro de biótipos (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si para comparação de concentrações dentro de concentrações (teste de Tukey 1%).

4.8. Sensibilidade de *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* aos fungicidas benomyl e iprodione, in vitro

Como pode ser observado nas análises de variâncias (Tabela 12 do Apêndice) dos resultados obtidos para

o crescimento micelial dos fitopatógenos em benomyl e iprodione, houve pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O efeito exercido pelos fungicidas benomyl e iprodione foi variável de acordo com os fitopatógenos (Tabelas 16 e 17), o fitopatógeno *S. rolfsii* foi o único com crescimento acima de 0,1 ppm do p.a. dos fungicidas. O crescimento de *S. minor* e *S. sclerotiorum* foi variável, a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, na dose de 0,1 ppm dos fungicidas nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 ppm de benomyl, *S. rolfsii* mostrou uma alta resistência ao fungicida, com percentagens de crescimento micelial acima de 88%. *S. rolfsii* foi mais sensível ao iprodione em relação ao benomyl, com 63,75% e 35,91% nas concentrações de 1,0 e 2,0 ppm, respectivamente. O crescimento de *S. minor* e *S. sclerotiorum* foi variável, a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, na dose de 0,1 ppm do p.a. dos fungicidas, sendo que *S. minor* foi menos sensível ao benomyl e *S. sclerotiorum* ao iprodione, na mesma dose. O crescimento micelial de *S. minor* e *S. sclerotiorum* foi totalmente inibido nas doses acima de 0,1 ppm dos fungicidas iprodione e benomyl.

Embora *S. minor*, *S. sclerotiorum* tenham se mostrado sensíveis às baixas concentrações dos fungicidas *in vitro*, não ocorre o mesmo *in vivo*, como é observado na literatura. Fungicidas como benomyl, PCNB e DCNA são parcialmente efetivos quando aplicados em uma única pulve-

rização (MARCUM et alii, 1977). Várias aplicação de benomyl ou DCNA são necessárias periodicamente após o transporte das mudas para minimizar a murcha de alface (STEADMAN, 1979). Segundo PORTER (1977), a utilização de benomyl para o tratamento de *S. minor* e *S. sclerotiorum* só foi eficiente quando aplicado em doses excessivamente maiores que as normalmente recomendadas.

Tabela 16. Percentagem de crescimento micelial de *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* nas doses de 0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 ppm do p.a. do fungicida benomyl (média de repetições).

Patógenos	Porcentagem de crescimento micelial				
	Benomyl (ppm p.a.)				
	0	0,1	0,5	1,0	2,0
<i>S. minor</i>	100,00aA	22,89bB	0,00bC	0,00bC	0,00bC
<i>S. sclerotiorum</i>	84,65aA	0,99cB	0,00bB	0,00bB	0,00bB
<i>S. rolfsii</i>	98,45aA	98,45aA	98,16aA	91,11aB	88,89aB

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si, para comparação de concentrações dentro de patógenos (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, para comparação de patógenos dentro de concentrações (teste de Tukey 1%).

Tabela 17. Percentagem de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* nas doses de 0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 ppm do p.a. do fungicida iprodione (média de 4 repetições).

Patógenos	Percentagem de crescimento micelial				
	Iprodione (ppm p.a.)				
	0	0,1	0,5	1,0	2,0
<i>S. minor</i>	100,00aA	20,72cB	0,00bC	0,00bC	0,00bC
<i>S. sclerotiorum</i>	100,00aA	47,03bB	0,00bC	0,00bC	0,00bC
<i>S. rolfsii</i>	100,00aA	100,00aA	100,00aB	63,75aB	35,91aC

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si, para comparação de concentrações dentro de patógenos (teste de Tukey 1%).
- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, para comparação de patógenos dentro de concentrações (teste de Tukey 1%).

4.9. Antibiose dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5) contra *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, in vitro

Como é observado na Tabela 18, todos os biótipos foram 100% inibidores do crescimento micelial de *S. minor*, através da produção de metabólitos tóxicos. No teste contra *S. sclerotiorum*, somente os biótipos 2B6 e 2B8 apresentaram percentagem de inibição do crescimento inferior a

100%. Somente o biótipo 2B1 inibiu o crescimento micelial de *S. rolfsii* acima de 95%, sendo comparado, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, com o selvagem *T. harzianum* (TW5). O isolado 2B10 diferiu estatisticamente dos demais, tendo a menor percentagem de inibição micelial de *S. rolfsii*.

Tabela 18. Percentagem de inibição micelial de *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* por metabólitos tóxicos dos novos biótipos e do selvagem de *Trichoderma harzianum* (TW5) média de 4 repetições).

Biótipos	Percentagem de inibição micelial (%)		
	<i>S. minor</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>
2B1	100,00 a	100,00 a	95,02 a
2B2	100,00 a	100,00 a	47,50 b
2B3	100,00 a	100,00 a	55,57 b
2B4	100,00 a	100,00 a	52,78 b
2B5	100,00 a	100,00 a	41,10 b
2B6	100,00 a	58,62 c	39,41 b
2B7	100,00 a	100,00 a	55,62 b
2B8	100,00 a	64,74 b	42,99 b
2B9	100,00 a	100,00 a	63,35 b
2B10	100,00 a	100,00 a	9,74 c
TW5	100,00 a	100,00 a	100,00 a

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

Os resultados obtidos concordam com DENNIS & WEBSTER (1971) que verificaram em seus experimentos de antibiose, que a produção de metabólitos tóxicos variou amplamente entre diferentes espécies e dentro de cada espécie de *Trichoderma*.

PAPAVIZAS et alii (1982) induziram mutação em *T. harzianum* e os novos biótipos produziram dois metabólitos não identificados, sendo um termo-instável e o outro termo-estável. Os resultados mostram diferenças na percentagem de inibição entre alguns biótipos e o selvagem. Através desses resultados pode-se deduzir que a ação da luz ultravioleta pôde modificar também a característica de produção de antibióticos do isolado selvagem *T. harzianum* TW5.

A resistência de um antagonista não deve se restringir ao seu crescimento ou esporulação, mas principalmente, suas características de produção de metabólitos fungitóxicos e de hiperparasitas que devem ser preservados (SANTOS, 1988).

4.10. Inibição da germinação de escleródios de

S. minor in vitro

As análises de variância (Tabela 13 do Apêndice) dos resultados obtidos para inibição de escleródios de *S. minor* através de metabólitos tóxicos produzidos pelos novos biótipos, detectaram pelo menos um contraste signifi-

cativo entre os tratamentos, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O efeito exercido pelos metabólitos dos novos biótipos na germinação dos escleródios foi variável. Os isolados 2B2, 2B6, 2B7, 2B8 e 2B1 apresentaram os melhores resultados (Tabela 19) não diferindo significativamente entre si, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, mas diferindo significativamente do selvagem *T. harzianum* (TW5) na inibição da germinação de escleródios de *S. minor* através da produção de metabólitos tóxicos.

Tabela 19. Germinação de escleródios de *Sclerotinia minor* após uma noite em metabólitos dos novos biótipos de *Trichoderma harzianum* TW5 (média de 4 repetições).

Biótipos	Nº de escleródios germinados por placa
Controle	10,00 a
TW5	8,75 ab
2B1	5,75 cd
2B2	3,75 ab
2B3	9,50 ab
2B4	9,75 ab
2B5	8,75 ab
2B6	4,75 d
2B7	5,00 d
2B8	5,00 d
2B9	8,50 ab
2B10	7,50 bc

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente, durante o processo de vida do antagonista. É conhecido também, que antibiose e competição se sobrepõem quando microrganismos em populações mistas obtêm nutrientes pela secreção de metabólitos desencorajando o crescimento de competidores (COOK & BAKER, 1983).

Os antibióticos são produzidos no solo por *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Streptomyces* sp., etc. Os antibióticos produzidos em contato direto entre microrganismos, embora sejam produzidos continuamente e em baixa concentração, estão menos sujeitos a decomposição biótica (BAKER, 1987). O uso de antagonistas para controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos tem sido bastante relatado, a maioria deles mostram que os *Trichoderma* spp. estão entre os mais promissores (ELAD et alii, 1983; HADAR et alii, 1979).

4.11. Antagonismo em confrontação direta de três dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5) contra *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, in vitro

Foram observadas as melhores notas para o biótipo 2B2, que invadiu completamente os patógenos *S. minor* e *S. sclerotiorum* e colonizou todo o meio, sendo comparado apenas ao selvagem na confrontação direta contra *S. minor* e *S. sclerotiorum*., para *S. rolfsii* só foi observado o mesmo

resultado quando em confrontação direta com o selvagem *T. harzianum* (TW5) (Tabela 20).

Tabela 20. Antagonismo em confrontação direta de três dos novos biótipos de *Trichoderma harzianum* (TW5) contra *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, in vitro.

Biótipos	Notas ¹		
	Patógenos		
	<i>S. minor</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>
TW5	1	1	1
2B1	1	2	3
2B2	1	1	4
2B6	2	2	5

¹ Os valores médios de notas de 4 repetições de acordo com o critério de BELL et alii (1982).

Várias espécies de fungos, bactérias, insetos e outros organismos são antagonistas de *Sclerotinia* spp. (STEADMAN, 1989).

Isolados de *Trichoderma* spp. parasitando escleródios não germinados em campos com plantas de alface não infectadas (IMOHELIN & GROGAN, 1980), a atividade de biocontrole in vitro a *S. sclerotiorum* por *T. harzianum* (LYNCH,

1987), o parasitismo de *S. sclerotiorum* em BDA por *T. viride* (MUELLER et alii, 1985) e o antagonismo de *T. harzianum* contra *S. minor* e *R. solani* (PERES & MELO, 1989), são alguns exemplos que indicam que *Trichoderma* spp. é um bom agente de controle biológico de *Sclerotinia* spp.

MELO (1989) observou em seus resultados que o grau de antagonismo de *T. viride* pôde ser aumentado pela indução de biótipos através do uso de luz ultravioleta. O biótipo M-19 protegeu plantas de alface contra *S. minor* em 50%, quando comparado com o selvagem. SILVA & MELO (1989) obtiveram através do tratamento de conídios com luz ultravioleta, biótipos de duas linhagens de *T. harzianum* (TMA4 e TW5) resistentes a iprodione, que inibiram em até 100% o crescimento radial de *S. minor*, tais resultados concordam com os observados na Tabela 20.

4.12. Caracterização dos novos biótipos e do isolado selvagem de *T. harzianum* (TW5)

4.12.1. Caracterização citológica dos novos biótipos

Os novos biótipos foram caracterizados citologicamente pela técnica de coloração de núcleos, estimando o tamanho dos conídios e o número de núcleos por coní-

dio. Foram analisados 100 conídios de cada biótipo, cujos resultados se encontram na Tabela 21. A obtenção de biótipos com esporos uninucleados constitui um material propício para futuros estudos genéticos, uma vez que a obtenção e seleção de mutantes é facilitada a partir de conídios uninucleados. Pode-se concluir, portanto, que a característica de *T. harzianum* TW5 apresentar conídios uninucleados facilitou a obtenção dos novos biótipos.

O comprimento e largura dos conídios entre os novos biótipos foram variáveis (Tabela 21). O biótipo de maior tamanho de conídios foi o 2B6, com 3,66 μm de comprimento e 3,31 μm de largura, pouco diferindo dos biótipos 2B9, 2B2, 2B1 e 2B4. O biótipo de menor comprimento foi o 2B3 enquanto o de menor largura foi o 2B8. Conídios dos isolados 2B1, 2B2, 2B6 e do selvagem TW5 são apresentados na Figura 2.

Os resultados mostram que apesar de os novos biótipos serem provenientes de um mesmo isolado selvagem, estes apresentam conídios com características morfológicas diferentes, e concordam com os resultados de PERES & MELO (1989) sobre a variabilidade morfológica de conídios de isolados de *T. harzianum*.

Tabela 21. Tamanho dos conídios e frequência de núcleos por conídios dos novos biótipos e o selvagem de *Trichoderma harzianum* TW5 (média de 100 conídios).

Biótipos	Tamanho (μm)				Frequência de núcleos por conídios	
	Comprimento	$\hat{s}_1^1$	Largura	$\hat{s}_2^1$	uninucleados	binucleados
2B1	3,12	0,1949	2,75	0,1211	100	-
2B2	3,22	0,2048	2,71	0,1371	100	-
2B3	2,92	0,1830	2,61	0,2062	90	10
2B4	3,18	0,1215	2,98	0,0778	97	3
2B5	3,07	0,2471	3,02	0,2515	100	-
2B6	3,66	0,4636	3,31	0,4140	91	9
2B7	3,01	0,1377	2,75	0,0783	98	2
2B8	2,94	0,2749	2,55	0,0783	91	9
2B9	3,24	0,3235	3,06	0,2077	100	-
2B10	2,93	0,1201	2,60	0,1456	100	-
TW5	2,97	0,1495	2,72	0,1555	100	-

1: $\hat{s}_1$ e $\hat{s}_2$: desvios padrões do comprimento e largura, respectivamente.

Figura 2. Conídios dos biótipos 2B1, 2B2 e 2B6 e *Trichoderma harzianum* (TW5).

4.12.2. Verificação do crescimento em meio de aveia

4.12.2.1. Crescimento micelial dos novos biótipos em meio de aveia

As análises de variância (Tabela 14 do Apêndice) dos resultados obtidos para o crescimento micelial em meio de areia para os novos biótipos de *T. harzianum* TW5, detectaram pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O crescimento micelial foi variável no 2º dia de incubação para os biótipos entre si e o selvagem (Tabela 22). Os isolados 2B5, 2B2, 2B10, 2B1 e 2B6 apresentaram as menores percentagens de redução de crescimento no 2º dia de incubação e no 3º dia, todos os biótipos apresentaram crescimento máximo.

4.12.2.2. Esporulação dos novos biótipos em meio de aveia

Através das análises de variância (Tabela 15 do Apêndice) foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste F, ao nível de 1% de probabilidade.

A esporulação dos biótipos e o selvagem foi variável em meio de aveia como é mostrado na Tabela 22. Os biótipos 2B5, 2B2, 2B3, 2B6, 2B8 e 2B10 foram os que mais produziram esporos não diferindo estatisticamente do selvagem *T. harzianum* TW5, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 22. Verificação do crescimento dos novos biótipos e o selvagem de *Trichoderma harzianum* TW5 em meio de aveia (média de três repetições).

Biótipos	Porcentagem redução crescimento (dias de incubação)			Esporulação esporos x 10 ⁵ /ml	Colônias		
	1	2	3		Coloração	Anéis	Setores
2B1	75,45 aA	19,58 abB	0,00 aC	13,74 cd	verde escuro	branco	-
2B2	72,62 aA	16,41 abB	0,00 aC	38,76 abc	verde escuro	-	-
2B3	78,59 aA	25,40 bcB	0,00 aC	32,89 abc	verde escuro	-	-
2B4	77,05 aA	37,03 dD	0,00 aC	8,12 d	verde escuro	branco	-
2B5	74,46 aA	13,37 aB	0,00 aC	68,09 ab	verde escuro	branco	-
2B6	77,04 aA	20,30 abB	0,00 aC	59,37 abc	amarelo	-	-
2B7	76,45 aA	25,40 bcB	0,00 aC	25,94 bc	verde escuro	verde claro	-
2B8	77,42 aA	30,67 cdB	0,00 aC	44,87 abc	amarelo	-	+
2B9	77,84 aA	35,18 dB	0,00 aC	6,70 a	verde claro	-	-
2B10	71,19 aA	18,41 abB	0,00 aC	46,90 abc	verde escuro	-	-
TW5	76,32 aA	12,04 aB	0,00 aC	91,62 a	verde escuro	-	-

- Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si, para dias de incubação dentro de biótipos (teste de Tukey 1%).

- Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, para biótipos dentro de dias de incubação (teste de Tukey 1%).

-: não há formação de setores nas colônias.

+: há formação de setores nas colônias.

4.12.2.3. Morfologia das colônias

Como é observado na Tabela 22, as colônias dos novos biótipos apresentaram diferentes tipos de coloração e formação de anéis de crescimento. A colônia do mutante 2B8 apresentou formação de setores com coloração verde-claro. Na Figura 3 é mostrado a diferença de coloração das colônias dos biótipos 2B1, 2B2 e 2B6 e do selvagem *T. harzianum* TW5.

Os resultados apresentados na Tabela 22, concordam com os resultados obtidos por MELO (1989) que mostraram que se pode aumentar a variabilidade genética através do tratamento com luz ultravioleta.

PAPAVIZAS et alii (1982) obtiveram biótipos diferentes do isolado de *T. harzianum* selvagem quanto a morfologia através da irradiação ultravioleta. PAPAVIZAS & LEWIS (1983) obtiveram biótipos de *T. viride*, por exposição do selvagem a irradiação ultravioleta, que diferiram do selvagem na aparência, hábito de esporulação, habilidade de crescimento em meio líquido a vários valores de pH.

Figura 3. Colônias dos biótipos 2B1, 2B2, 2B6 e *Trichoderma harzianum* (TW5).

4.13. Caracterização eletroforética de três dos novos biótipos e o selvagem de *T. harzianum* TW5

Os biótipos obtidos provieram do isolado selvagem *T. harzianum* TW5. No entanto, estes apresentaram

características morfológicas diferentes, de acordo com o observado para a característica de colônias (Figura 3) em meio de aveia e de conídios. Tal fato pode estar relacionado com alteração genética através do uso de luz ultravioleta. Sendo assim, foram escolhidos os padrões enzimáticos de proteínas totais e esterase para detectar diferenças entre três dos novos biótipos obtidos. Segundo PACCOLA-MEIRELLES et alii (1988), os perfis isoenzimáticos permitem detectar diferenças mais sensíveis entre os organismos do que os perfis de proteínas totais.

Os novos biótipos selecionados e o selvagem (*T. harzianum* TW5) foram caracterizados eletroforeticamente quanto aos padrões de esterase e proteínas totais. De acordo com a Figura 4, pode-se identificar a presença de bandas α e β esterases em todos os biótipos analisados, caracterizando esta quanto a produção desta enzima. No entanto, foram detectadas diferenças quanto ao número e posição das bandas indicando uma variabilidade nos novos biótipos entre si, e entre estes e o selvagem. Pode-se identificar também, presença de bandas diferentes para os novos genótipos e o selvagem para os padrões de proteínas totais.

Figura 4. Padrões de proteínas totais e esterases dos biótipos 2B1, 2B2, 2B6 e *Trichoderma harzianum* (TW5).

Alguns autores têm correlacionado diferenças nos perfis enzimáticos com alteração no material genético ocorrido por mutações, responsáveis pelos padrões com diferentes posições de migrações em linhagens selvagens e mutantes (PACCOLA-MEIRELLES, 1988; FURLANETTO, 1989). Sendo assim, podemos sugerir a utilização dos perfis de esterase e proteínas totais para a detecção da variabilidade induzida por irradiação ultravioleta, uma vez que os dois padrões

possibilitaram obtenção de bandas visíveis nos três biótipos obtidos e o selvagem.

Como é observado na Figura 4, o biótipo 2B6 é o que possui maior variabilidade genética induzida por irradiação ultravioleta em relação ao selvagem *T. harzianum* (TW5) para os perfis de bandas de esterase e proteínas totais. No entanto, o número e posições de bandas nos perfis de esterase e proteínas totais, também foram variáveis entre os biótipos 2B1 e 2B2 e o selvagem *T. harzianum* (TW5). Pode-se concluir, portanto, que os biótipos 2B1, 2B2 e 2B6 possuem variabilidade genética, obtida através da irradiação ultra-violeta, em relação ao selvagem *T. harzianum* (TW5).

4.14. Uso de três dos novos biótipos no controle integrado com o fungicida benomyl, de *S. minor* em plantas de alface em casa de vegetação

As análises de variância (Tabela 16 do Apêndice) dos resultados obtidos para o experimento em casa de vegetação, detectaram pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos.

O efeito exercido pelo fungicida benomyl associado ou não com os biótipos foi variável de acordo com os tratamentos (Tabela 23).

Como é observado na Tabela 23, os tratamentos

com os novos biótipos 2B1 e 2B6 não diferiram estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, da testemunha inoculada. No entanto, foi observado que o tratamento 2B1 associado ao benomyl diferiu estatisticamente da testemunha inoculada, e que o tratamento 2B6 foi estatisticamente inferior, ao nível de 5% de sobrevivência pelo teste de Tukey, ao tratamento 2B6 associado ao benomyl. Os tratamentos 2B2 e 2B2 associado ao benomyl, não diferiram estatisticamente entre si, mas apresentaram bom nível de controle, pois não foi verificado nesses tratamentos nenhuma planta morta pela doença (Tabela 23).

Como já foi discutido, a associação de benomyl aos biótipos 2B1 e 2B6 aumentou o controle de *S. minor* em alface, em relação aos tratamentos com os mesmos biótipos na ausência do fungicida. Tais resultados concordam com os resultados de HENIS et alii (1979); UPADHYAY & MUKHOPADHYAY (1986); STRASHNOW et alii (1985); COLE & ZUENYICA (1988); LIFSHITZ et alii (1985); ORDENTLICH (1990); ABD-EL MOITY (1982) e GULLINO & GARIBALDI (1988) que mostraram que a combinação de fungicidas com controle biológico produziram melhores resultados de controle de fitopatógenos.

Mesmo que não haja diferença entre os tratamentos com fungicidas somente e os tratamentos com antagonistas associados a doses reduzidas de fungicidas, como os resultados observados na Tabela 23 para os biótipos 2B1, 2B2 e *T. harzianum* (TW5), a utilização do controle integrado é

um controle mais seguro, havendo menor perigo de desenvolvimento de resistência no patógeno, pela menor quantidade de fungicida utilizado (TRONSMO, 1989).

Tabela 23. Número de plantas mortas de alface por *Sclerotinia minor* por vaso nos tratamentos com três dos novos biótipos de *Trichoderma harzianum* (TW5) associados ou não ao benomyl (média de 4 repetições).

Tratamentos	Nº de plantas mortas/vaso com 4 plantas (média de 4 repetições)
2B6	2,8871 a
Testemunha (inoculada)	2,6275 ab
2B1	1,2261 abc
TW5	0,4571 bc
Benomyl + 2B6	0,3975 bc
Benomyl	0,2178 c
Benomyl + 2B1	0,0000 c
Benomyl + TW5	0,0000 c
2B2	0,0000 c
Benomyl + 2B2	0,0000 c
Testemunha não inoculada	0,0000 c

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

5. CONCLUSÕES

Dos estudos realizados, nas condições de laboratório e casa de vegetação, foram obtidas as seguintes conclusões:

- A luz ultravioleta provoca mutação em *T. harzianum* (TW5) permitindo a obtenção de novos biótipos resistentes à concentração de 2.000 ppm do princípio ativo do fungicida benomyl.

- Os novos biótipos são variáveis em relação ao crescimento, esporulação, coloração e formação de anéis nas colônias. Apresentam variabilidade em relação a frequência de conídios uninucleados e/ou binucleados, assim como quanto ao tamanho dos conídios. Têm comportamento variável em relação ao crescimento e esporulação aos fungicidas benomyl (2.000 ppm p.a.), iprodione (1.000 ppm p.a.), thiabendazole (1.000 ppm p.a.) e tiofanato de metila (1.000 ppm p.a.), ao antagonismo contra *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*. Os biótipos 2B1, 2B2 e 2B6 e o isolado *T. harzianum* (TW5) apresentam diferentes padrões de eletroforese para esterase e proteínas totais.

- Em condições de casa de vegetação, o biótipo 2B2 de *T. harzianum* (TW5), associado ou não ao benomyl é eficaz contra *S. minor* em plantas de alface. A associação de benomyl aos biótipos 2B1 e 2B6 de *T. harzianum* (TW5) aumenta a eficiência de controle de *S. minor* em alface, em relação aos tratamentos com os mesmos biótipos na ausência do fungicida. Dessa forma, os biótipos 2B1, 2B2 e 2B6 poderão ser utilizados no controle integrado de *S. minor* com benomyl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S. & GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 899-904, 1979.
- ABD-EL MOITY, T.H.; PAPAIVIZAS, G.L.; SHATLA, M.N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. *Phytopathology*, St. Paul, 72: 394-400, 1982.
- ADAMS, P.B. Comparison of antagonists of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, 79: 1345-7, 1989.
- ADAMS, P.B. & AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* Species. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 896-9, 1979.
- ADAMS, P.B. & AYERS, W.A. Factors parasitic activity of *Sporidesmium sclerotivorum* on sclerotia of *Sclerotinia minor* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 366-8, 1980.
- ADAMS, P.B. & TATE, C.J. Mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* on soil. *Plant Diseases Reporter*, Washington, 60(6): 515-18, 1976.

- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Induction rizosphere conference in *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, St. Paul, 75: 1302, 1985.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Competitive saprofitic ability and cellylolytic activity of rizosphere - competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, St. Paul, 77: 358-62, 1987a.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, St. Paul, 77: 182-9, 1987b.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Growth of Rhizosphere - competent mutants of *Trichoderma harzianum* on carbor substrates. *Canadian Journal of Microcobiology*, Ottawa, 34: 807-14, 1988a.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Rhizosphere competence of benomyl-tolerant mutants of *Trichoderma* spp. *Canadial Journal of Microbiology*, Ottawa, 34: 694-6, 1988b.
- ALLEN, R.N.; PEGG, K.G.; GORSBERG, L.I., FIRTH, D.J. Fungicidal control in pineapple and avocato of diseases caused by *Phytophthora cinamoni*. *Australian Journal of Experimental Agricultural and Animal Husbrandry*, Melbourne, 20: 119-24, 1980.
- BACKMAN, P.A. & RODRIGUEZ-KABANA, R. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. *Phytopathology*, St. Paul, 65: 819-21, 1985.

- BAKER, K.F. Envolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, 25: 67-85, 1987.
- BAKER, K.F. & COOK, R.J. *Biological of plant pathogens*. San Francisco, W.H. Frieman, 1974. 433p.
- BAKER, R. *Trichoderma* spp. AS plant growth stimulants. *Critical Reviews in Biotechnology*, Boca Raton, 7(2): 97-103, 1988.
- BAKER, R. Improved *trichoderma* ssp. for promoting crop productivity. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, 7: 34-8, 1989.
- BARACHO, J.R. & ROSIN, R.T. Tabela por la kalkulado de MD 95, en fungo. *Sciencia Revuo de Internancia Sciencia Asocio Esperantista*, Beogradia, 78: 223-6, 1977.
- BARNETT, H.L. The nature of mycoparasitism by fungi. *Anual Review of Microbiology*, Palo Alto, 17: 1-14, 1963.
- BARNETT, H.L. & BINDER, F.L. The fungal host-parasite relationship. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 16: 273-92, 1973.
- BARROS, I.B.I. Reação de *Lactuca* sp. ao *Sclerotinia minor* Jagger e hibridação interespecífica no gênero *Lactuca*. Piracicaba, 1988. 175p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

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

BENSACI, M. & NEUMANN, P. Selection of *Trichoderma* spp. strains as biocontrol agents, resistant to fungicides. Abstract. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ontario, 11: 185-6, 1989.

BOOSALIS, M.C. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 2: 363-75, 1963.

CHANG, Y.C.; BAKER, R.; KLEIFELD, R., CHET, I. Increased growth of plants in presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, Beltsville, 70: 145-8, 1986.

CHAVES, G.M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Viçosa, 1961. 81p. (Livre Docência - Escola Superior de Agricultura/UREMG).

CHET, I. & ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. In: Les antagonismes microbiens. Mode d'action et application a la lutte biologique controle les maladies des plantes. Bordeaux, mai. 1983, Colloque de l'I.N.R.A., 18: 35-40, 1983.

CHET, I.; HADAR, Y.; ELAD, Y.; KATAN, J.; HENIS, Y. Biological control of soilborne plant pathogen by *Trichoderma harzianum*. In: SHIPPER, B. & GAMS, W., ed. Soilborne plant pathogens. London, Academic Press, 1979. p. 585-91.

- COLE, J.S. & ZUENYIKA. Integrated control of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* in tobacco transplants with *Trichoderma harzianum* and triadimenol. *Plant Pathology*, London, 37: 271-7, 1988.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogen. St. Paul. The American Phytopathological Society, 1983. 539p.
- CORRÊA, G.S. & AZEVEDO, J.L. Influência da radiação solar na viabilidade de contídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 61: 119-30, 1986.
- DAVIDSE, L.C. & FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Cell Biology*, New York, 72: 174-93, 1977.
- DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S.G. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. 265p.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species - groups of *trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, Londres, 57: 25-39, 1971.
- DILLARD, H.R. & GROGAN, R.G. Relationship between sclerotial spatial pattern and density of *Sclerotinia minor* and the incidence of lettuce drop. *Phytopathology*, St. Paul, 75: 90-4, 1985.

- DOW, R.L.; PORTER, D.M.; POWELL, N.L. Effect of environmental factors on *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia* blight of peanut. *Phytopathology*, St. Paul, 78: 672-6, 1988.
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, St. Paul, 61: 42-4, 1971.
- ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I.; HENIS, Y. Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma* spp. and plant pathogenic fungi. *Phytopathology Zeitschrift*, Berlin, 107: 168-75, 1983.
- FURLANETO, M.C. Recombinação genética e produção de celulasas em *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*. Piracicaba, 1989. 151p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GHINI, R. Resistência de fungos a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas; uma revisão. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. 21p. (EMBRAPA/CNPDA/Documentos, 9).
- GROGAN, G.R. *Sclerotinia* species: summary and comments on needed research. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 908-10, 1979.
- GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. Biological and integrated control of grey mould of grape in Italy. *Trichoderma Newsletter*, Coventry, (4): 4, 1988.

- HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat-ban culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 64-8, 1979.
- HAU, F.C. & BEUTE, M.K. Effects of chlorothalonil on the virulence and physiology of a nontarget pathogen, *Sclerotinia minor*. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 475-9, 1983.
- HAWTHORNE, B.T. Production of apothecia of *Sclerotinia minor*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 16: 559-60, 1973.
- HAWTHORNE, B.T. *Sclerotinia minor* on lettuce: effect of plant growth on susceptibility to infection. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 17: 387-92, 1974.
- HAWTHORNE, B.T. & JARVIS, W.R. Differential activity of fungicides on various stages in the cycle of *Sclerotinia* spp. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 16: 551-7, 1973.
- HENIS, Y.; GHAFAR, A.; BAKER, R. Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: effect of successive plantings, PCNB, and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 900-7, 1979.
- HOES, J.A. & HUANG, H.C. *Sclerotinia sclerotiorum* viability and separation of sclerotia from soil. *Phytopathology*, St. Paul, 65: 1431-2, 1975.

HOMECHIN, M. Potencial em emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum* Rifai, para controle de patógenos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Piracicaba, 1987. 186p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

HOY, M.A. & HERZOG, D.C. Biological control in agricultural IPM systems. New York, Academic Press, 1985. 477p.

HUANG, H.C. Control of sclerotinia wilt of sinflowlers by hyperparasites. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ontario, 2: 26-32, 1980.

IMOLEHIN, E.D. & GROGA, R.G. Factors affecting survival of *Sclerotia*, and effects of inoculum density, relative position and distance of sclerotia from the host on infection of lettuce by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 1162-7, 1980.

IMOLEHIN, E.D.; GROGAN, R.G.; DUNIWAY, J.M. Effect of temperature and moisture tension on growth, sclerotial production, germination and infection by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology*, St. Paul, 70(12): 1153-7, 1980.

KOHN, L.M. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 881-6, 1979.

Le TORNEAU, D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 887-90, 1979.

- LIFSHITZ, R.; LIFSHITZ, S.; BAKER, R. Decrease in incidence of *Rhizoctonia* preemergence damping-off by use of integrated chemical and biological controls. *Plant Disease*, Beltsville, 69: 431-4, 1985.
- LIU, S. The use of benomyl resistant mutant of *Trichoderma koningii* as a biocontrol agent against root rot disease of chrysanthemum and adzuki bean. *Trichoderma Newsletter*, Coventry (4): 5, 1988.
- LYNCH, J.M. In vitro identification of *Trichoderma harzianum* as a potential antagonist of plant pathogens. *Current Microbiology*, New York, 16: 49-53, 1987.
- MARCUM, D.B.; GROGAN, R.G.; GRETEATHEAD, A.S. Fungicide control of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* 'minor'. *Plant Disease Reporter*, Washington, 61: 555-9, 1977.
- MELO, I.S. Obtenção de novos biótipos de *Trichoderma viride* antagônicos à *Sclerotinia minor* Jagger. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., Piracicaba, 1989. *Anais*. Piracicaba, FEALQ, Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. p.101.
- MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. in vitro. In: CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 9., Campinas, 1976. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 1(2): 57-66, jun. 1976.

- MUELLER, J.D.; CLINE, M.N.; SINCLAIR, J.B.; JACOBSEN, B.J.
An in vitro test for evaluating efficacy of mycoparasites
on sclerotinia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant
Disease**, Beltsville, 69: 584-7, 1985.
- MUNNECKE, D.E.; KOLBEZEN, M.J.; WILBUR, W.D.; OHR, H.D. In-
teractions involved in controlling *Armillaria mellea*..
Plant Disease, beltsville, 65: 384-9, 1981.
- ORDENTLICH, A.; NACHMAS, A.C.; STRASHNOV, Y.; CHET, I. In-
tegrated control of soilborne plant pathogens. **Phyto-
parasitica**, Bel Dagan, 18(1): 83-94, 1990.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; AL-
FENAS, A.C. **Manual de técnicas eletroforéticas em mi-
croorganismos**. Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.
- PAPAVIZAS, G.C. Induced tolerance of *Trichoderma harzianum*
to fungicides. **Phytopathology**, St. Paul, 70: 691-2,
1980.
- PAPAVIZAS, G.C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil
and in pea and bean rhizospheres. **Phytopathology**, St.
Paul, 72: 1212, 1982.
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and gliocladium: biology, eco-
logy, and potential for biocontrol. **Annual Review
Phytopathology**, Palo Alto, 23: 23-54, 1985.
- PAPAVIZAS, G.C. & LEWIS, J.A. Physiological and biocontrol
characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride*
resistant to MBC fungicides. **Phytopathology**, St. Paul,
73: 407-11, 1983.

- PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A.; ABD-EL MOITY, T.H. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl enhanced biocontrol copability. *Phytopathology*, St. Paul, 72: 126-32, 1982.
- PARTYKA, R.E. & MAI, W.F. Effects of environment and some chemicals on *Sclerotinia sclerotiorum* in laboratory and potato field. *Phytopathology*, St. Paul, 52: 766-70, 1962.
- PATERSON, C.L. & GROGAN, R.G. Cause and control of lettuce drop in California. Davis, University of California, Depart. Plant Pathol., 1984. 10p.
- PERES, E. & MELO, I.S. Variabilidade em *Trichoderma harzianum*. In: REUNIAO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS, 3., Piracicaba, 1989. *Anais*. Piracicaba, FEALQ; Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. p.99.
- PHILLIPS, A.J.L. The effects of soil solarization on sclerotial populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, 39: 38-43, 1989.
- PORTER, D.M. The effect of chlorothalonil and benomyl on the severity of sclerotinia blight of peanuts. *Plant Disease Reporter*, Washington, 61: 995-8, 1977.
- PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology*, St. Paul, 69(8): 875-80, 1979.
- RICHARDSON, L.T. The persistence of thiram in soil and its relationship to microbial balance and damping-off-control. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 32: 335-46, 1954.

- RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, Wallingford, 116: 56, jan. 1969.
- SANTOS, T.M.C. Seleção de microrganismos antagônicos a *Rhizoctonia solani* (Khun) e *Cylindrocladium scoparium* (Morgan) agentes causais de tombamento em *Eucalyptus*. Piracicaba, 1988. 139p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SANTOS, T.M.C. dos & MELLO, I.S. Resistência de isolados de *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. a fungicidas "in vitro". Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. 18p. (EMBRAPA/CNPDA. Boletim de Pesquisa, 5).
- SILVA, A.C.F. & MELO, I.S. Mutantes de *Trichoderma harzianum* resistentes a Iprodione e antagônicos ao *Sclerotinia minor*. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS, 3., Piracicaba, 1989. Anais. Piracicaba, FEALQ; Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. p.102.
- STEADMAN, J.R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 904-7, 1979.
- STRASHNOW, Y.; ELAD, Y.; SIVAN, A.; CHET, I. Integrated control of *Rhizoctonia* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology*, London, 34: 146-51, 1985.
- TANAKA, T.; MURATA, N.; KATO, H. Behavior of nucleic and chromossomes during ascus development in the matting between rice-strain or weeping lovegrass - strains and ragi-strain of *Pyricularia*. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, Tokyo, 45: 182-91, 1979.

- TRONSMO, A. *Trichoderma harzianum* used in integrated control of *Botrytis cinerea* rot on apple. *Phytopathology*, St. Paul, 79: 1153, 1989.
- TU, J.C. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 670-4, 1980.
- UPADHYAY, J.P. & MUKHOPADHYAY, A.N. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* in sugar-beet. *Tropical Pest Management*, London, 32(3): 215-20, 1986.
- VANNACCI, G.; TRIOLO, E.; MATERAZZI, A. Survival of *Sclerotinia minor* Jagger sclerotia in solarized soil. *Plant and Soil*, Dordrecht, 109: 49-55, 1988.
- WARREN, C.G.; SANFERS, P.L.; COLE Jr, H. Increased severity of pythium blight associated with use of benzimidazole fungicides on creeping bentgrass. *Plant Disease Reporter*, Washington, 60: 932-5, 1976.
- WELLS, H.D.; BELL, D.K.; JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, St. Paul, 62: 442-7, 1972.
- WENSLEY, R.N. & HUANG, C.M. Control of fusarium wilt of musk melon and other effects of benomil soil drenches. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 16: 615-20, 1970.

WILLETTS, H.J. & WONG, J.A.L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *The Botanical Review*, New York, 46(2): 101-6, 1980.

WONG, J.A.L. Identity, host range and modes of infection of *Sclerotinia* spp. their implications for the control of *Sclerotinia* diseases. *Australian of Plant Pathology Society Newsletter*, Canberra, 7: 35, 1978.

APÊNDICE

Tabela 1. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV) da ação de benomyl sobre o crescimento micelial de isolados de *Trichoderma* spp.¹

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	2	
Doses	4	15084,0569960**
Tratamentos	5	4109,7475915**
Doses x Tratamentos	20	373,3348319**
Resíduo	58	5,6531592
Total	89	

Média Geral = 47,544000; Coeficiente de Variação = 5,001%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\text{arc.sen. } \sqrt{\%}$.

Tabela 2. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV) da ação do iprodione sobre o crescimento micelial de isolados de *Trichoderma* spp.¹

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	2	
Doses	4	17749,1096855**
Tratamentos	5	546,9834150**
Doses x Tratamentos	20	182,6931902**
Resíduo	58	2,2062501
Total	89	

Média geral = 52,101500; Coeficiente de variação = 2,851%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\text{arc.sen. } \sqrt{\%}$.

Tabela 3. Valores e significância dos QM e CV da ação de benomyl sobre a esporulação dos isolados de *Trichoderma* spp.¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	2	
Doses	4	21,4556011**
Tratamentos	5	1,8983360**
Doses x Tratamentos	20	0,9377760**
Resíduo	58	0,072682
Total	89	

Média geral = 0,890883; Coeficiente de variação = 31,202%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\log(x+1)$.

Tabela 4. Valores e significâncias dos QM e CV da ação de iprodione sobre a esporulação dos isolados de *Trichoderma* spp.¹

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	2	
Doses	4	48,1431439**
Tratamentos	5	0,5624382**
Doses x Tratamentos	20	0,2031981**
Resíduo	58	0,0661474
Total	89	

Média geral = 0,985613; Coeficiente de variação = 26,095%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\log(x+1)$.

Tabela 5. Valores e significâncias dos QM e CV da ação de benomyl sobre o crescimento micelial dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5).¹

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	2	
Dias	4	9580,8681109**
Mutantes	9	181,9892349**
Dias x Mutantes	36	23,1101052**
Resíduo	98	5,3758196
Total	149	

Média geral = 40,400150; Coeficiente de variação = 5,739%.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\text{arc.sen.}\sqrt{\%}$.

Tabela 6. Valor e significância dos QM e CV da ação de benomyl sobre a esporulação dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5).¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	2	
Tratamentos	9	0,4560069**
Resíduo	16	0,0501618
Total	29	

Média geral = 5,801727; Coeficiente de variação = 3,860%.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\log (x+1)$.

Tabela 7. Valores e significâncias dos QM e CV da ação de iprodione sobre o crescimento micelial dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5).¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	2	
Dias	2	2265,5318864**
Mutantes	9	498,5029305**
Dias x Mutantes	18	153,4730542**
Resíduo	58	28,6094364
Total	89	

Média geral = 42,455210; Coeficiente de variação = 12,608%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\text{arc.sen. } \sqrt{\%}$.

Tabela 8. Valores e significâncias dos QM e CV da ação de iprodione sobre a esporulação dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5).¹

Causas da Variação	GL	QM
Tratamentos	9	0,2517497**
Blocos	2	
Resíduo	18	0,0146029
Total	29	

Média geral = 0,636769; Coeficiente de Variação = 18,977%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\log (x+1)$.

Tabela 9. Valores e significâncias dos QM e CV da ação de tiofanato metílico sobre o crescimento micelial de três dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5).¹

Causas da Variação	GL	QM
Bloco	3	0,7317065
Tratamentos	3	1046,0202394**
Doses	3	8716,1824120**
Tratamentos x Doses	9	1508,2526301**
Resíduo	45	1,1869047
Total	63	

Média geral = 23,859740; Coeficiente de variação = 4,566%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\text{arc.sen } \sqrt{\%}$.

Tabela 10. Valores e significâncias dos QM e CV da ação de thiabendazole sobre o crescimento micelial de três dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5).¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	3	0,1938523
Tratamentos	3	3955,9910677**
Doses	3	17130,9455969**
Tratamentos x Doses	9	833,9333052**
Resíduo	45	1,0783127
Total	63	

Coeficiente de variação = 2,350%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\text{arc.sen } \sqrt{\%}$.

Tabela 11. Valores e significâncias dos QM e CV da ação dos fungicidas thiabendazole e tiofanato metílico sobre a esporulação de três dos novos biótipos de *T. harzianum* (TW5).¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	2	
Doses	4	7432,5509955**
Tratamentos	2	9133,4574040**
Doses x Tratamentos	8	920,8688833**
Resíduo	28	1,0649718
Total	44	

Média geral = 40,963460; Coeficiente de variação = 2,519%.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\log(x+1)$.

Tabela 12. Valores e significâncias dos QM e CV da sensibilidade de *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* aos fungicidas benomyl e iprodione.¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	2	
Doses	4	4531,4425430**
Patógeno	2	16189,5411571**
Doses x Patógeno	8	992,2764986**
Resíduo	28	1,9262372
Total	44	

Média geral = 40,535860; Coeficiente de variação = 3,424%.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\text{asc. sen } \sqrt{\%}$.

Tabela 13. Valores e significâncias dos QM e CV da inibição da germinação de escleródios de *S. minor* "in vitro".¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	3	
Tratamentos	11	20,0662879**
Resíduo	33	0,7026515
Total	47	

Média geral = 7,229167; Coeficiente de variação = 11,595%.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\log(x+1)$.

Tabela 14. Valores e significâncias dos QM e CV do crescimento micelial dos novos biótipos em meio de aveia.¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	2	
Dias	2	25836,2325553**
Mutantes	10	44,7766573**
Dias x Mutantes	20	30,7482134**
Resíduo	64	13,7003364
Total	98	

Média geral = 31,361330; Coeficiente de variação = 11,802%.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\text{arc.sen} \sqrt{\%}$.

Tabela 15. Valores e significâncias dos QM e CV da esporulação dos novos biótipos em meio de aveia.¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	2	
Tratamentos	10	2,0964466**
Resíduo	20	0,0926140
Total	32	

Média geral = 5,739255; Coeficiente de variação = 5,303%.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\log(x+1)$.

Tabela 16. Valores e significâncias dos QM e CV da inibição do número de plantas mortas/vaso no controle integrado, com três dos novos biótipos e o fungicida benomyl, de *S. minor* em casa de vegetação.¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	3	
Tratamentos	10	0,5387614**
Resíduo	30	0,0892442
Total	43	

Média geral = 1,260172; Coeficiente de variação = 23,706%.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\sqrt{x+1}$.

Tabela 17. Valores e significâncias do QM e CV da percentagem de inibição micelial de *S. sclerotiorum* por metabólitos tóxicos dos novos biótipos e o selvagem de *T. harzianum* (TW5).¹

Causas da Variação	Gl	QM
Blocos	3	
Tratamentos	10	754,8981294**
Resíduo	30	0,3889275
Total	43	

Média geral = 10,493830; Coeficiente de variação = 5,943%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\sqrt{x+1}$.

Tabela 18. Valores e significâncias dos QM e CV da percentagem de inibição micelial de *S. rolfii* por metabólitos tóxicos dos novos biótipos e o selvagem de *T. harzianum* (TW5).¹

Causas da Variação	GL	QM
Blocos	3	
Tratamentos	10	1379,6266552**
Resíduo	30	45,3134135
Total	43	

Média geral = 41,698230; Coeficiente de variação = 16,143%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\sqrt{x+1}$.