"SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGONICOS A
Rhizoctonia solani (KHUN) E Cylindrocladium
scoparium (Morgan) AGENTES CAUSAIS DE TOMBAMENTO

TANIA MARTA CARVALHO DOS SANTOS

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 1988

S237s

Santos, Tania Marta Carvalho dos

Seleção de microrganismos antagônicos à Rhizoctonia solani (KHUN) e Cylindrocladium scoparium (Morgan) agentes causais de tombamento em Eucalyptus. Piracicaba, 1988.

142p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia

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

CDD 634.9734

" SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS À Rhizoctonia solani
(KHUN) E Cylindrocladium scoparium (Morgan) AGENTES CAUSAIS
DE TOMBAMENTO EM Eucalyptus"

Tania Marta Carvalho dos Santos

Aprovado em: 27/05/88

Comissão Julgadora:

Prof ^a . Dr ^a . ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER	ESALQ/USP
Dr. ITAMAR SOARES DE MELO	CNPDA/EMBRAPA
Dr ^a . SIU MUI TSAI SAITO	CENA/ESALQ

^a ^a *Aline A. Pizzirani-Kleiner*
Prof . Dr . ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER
Orientador

A Severino e Élide meus pais
e Ana Márcia, minha irmã

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

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

- A Prof. Dr. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pela orientação e amizade;
- Ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo pela orientação apoio e amizade;
- Ao Depto. de Genética pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho;
- Ao Depto. de Solos, geologia e Fertilizantes e ao Depto. de Ciências Florestais pelos auxílios prestados;
- Ao Depto. de Biologia da Universidade Federal de Pernambuco;
- Ao CIAGRI - Centro de Informática na Agricultura - pelas instalações;
- A FINEP - Financiadora de Estudos e Pesquisas, pelo auxílio concedido;
- Aos funcionários do Depto. de Genética, em especial a Alaor de Oliveira pelas fotografias e cortesia; Luiz Próspero, João Alcine e Antonio Menucci pela dedicação e cortesia;
- A auxiliar de laboratório Sandra Elisabete Rocha Campos Wher pela amizade, ajuda e dedicação;
- Ao técnico Antônio José de Rocha Campos pelo treinamento e

cortesia nos trabalho de laboratório;

- A Bióloga Ana Maria Rodrigues Cassiolato pelas sugestões e críticas, pela revisão dos originais mas, principalmente pela amizade, estímulo e apoio no decorrer do curso e deste trabalho;

- Ao Engenheiro Agrônomo Luciano Lourenço Nass pela força, pelo estímulo e pela amizade;

- Ao Dr. Rivail Salvador Lourenço pela amizade e estímulo;

- A Bibliotecária Nilce T. P. Sigríst pelo auxílio na revisão bibliográfica; e, principalmente pela amizade;

- Ao estagiário Gerson Antonio Conus Pela ajuda e amizade;

- Ao Prof. Dr. Paulo Vanderlei Ferreira pela iniciação em pesquisa;

- A Elisabeth Ann Vessey pela revisão do sumary;

- Pela especial amizade e estímulo no decorrer do trabalho:

- Biólogo Eduardo Bagalhi;

- Engenheiro Agrônomo Ima Célia Guimarães Vieira;

- Bióloga Izabel Maura de Farias Lavendowski;

- Engenheiro Agrônomo Telmo Cantom.

SUMARIO

	Página
RESUMO	XV
SUMMARY	XVIII
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. O tombamento de mudas em essências florestais	04
2.2. Etiologia de <u>Cylindrocladium scoparium</u>	08
2.3. Etiologia de <u>Rhizoctonia solani</u>	10
2.4. Aspectos gerais do controle biológico	12
2.4.1. Controle biológico de patógenos do rizoplano por actinomicetos	13
2.4.2. Controle biológico de patógenos do rizoplano por bactérias	16
2.4.3. Controle biológico de patógenos do rizeplano por fungos	20
2.5. Controle biológico de <u>Cylindrocladium scoparium</u>	26
2.6. Controle biológico de <u>Rhizoctonia solani</u>	27
2.7. Ação de fungicidas sobre fungos agentes de biocontrole	36

3. MATERIAIS E METODOS	39
3.1. Local de investigação	39
3.2. Isolamento de microrganismos	39
3.3. Isolados de microrganismos antagonistas	40
3.4. Meios de cultura para isolamento de microrganismos	41
3.4.1. Meio para isolamento de fungos (meio de Martin)	41
3.4.2. Meio para isolamento de bactérias (meio Warksman ágar	42
3.4.3. Meio para isolamento de actinomicetos meio amido caseína, KUSTER & WILLIAMS	42
3.5. Fungicidas	43
3.6. Hospedeiro teste	44
3.7. Amostragem de solo para isolamento de mi- crorganismos	44
3.8. Testes de antagonismo in vitro	45
3.8.1. Inóculo de bactérias e actinomiceto para testes de incorporação e difusão	45
3.8.2. Inóculo de fungos	45
3.8.3. Inóculo de <u>Rhizoctonia solani</u> e <u>Cylindrocladium scoparium</u>	46
3.9. Bioensaios	46
3.9.1. Seleção de microrganismos antagonistas	46

3.9.2. Avaliação da eficiência como antagonistas dos isolados selecionados	47
3.9.2.1. Bactérias e actinomicetos	47
3.9.2.1.1. Testes de incorporação e difusão	47
3.9.3. Fungos	48
3.9.3.1. Teste de interação de hifas e hiperparasitismo	48
3.9.3.2. Produção de substâncias inibidoras	49
3.9.4. Influência dos antagônicos na incidência de tombamento de pré-emergência	49
3.9.4.1. Bactérias e actinomiceto	50
3.9.4.2. Fungos	50
3.9.3.3. Fungicida	51
3.9.5. Tolerância e sensibilidade de isolados de <u>Trichoderma</u> spp, <u>Penicillium variabile</u> e <u>Penicillium verruculosum</u> a fungicidas	51
3.10. Experimento em casa-de-vegetação	52
3.10.1. Preparo de inóculo de bactérias e actinomiceto	52
3.10.2. Fungos	52
3.10.3. Inóculo de <u>Rhizoctonia solani</u> e <u>Cylindrocladium scoparium</u>	53
3.10.4. Preparo do solo	53
3.10.5. Experimento	54

3.10.5.1. Bactérias e actinomiceto antagonistas	54
3.10.5.2. Fungos antagonistas	54
3.10.5.3. Fungicida	55
4. RESULTADOS	56
4.1. Isolamento e seleção de microrganismos antagonistas	56
4.2. Avaliação da eficiência dos isolados selecionados como antagonistas	58
4.2.1. Bactérias e actinomiceto	58
4.2.1.1. Teste de difusão	58
4.2.1.2. Teste de incorporação	62
4.2.2. Fungos	65
4.2.2.1. Interação de hifas e hiperparasitismo	65
4.2.2.2. Produção in vitro de substâncias inibidoras	70
4.3. Influência dos microrganismos antagônicos e do fungicida benomil sobre o tombamento de pré-emergência em condições de laboratório	74
4.4. Influência dos microrganismos antagônicos e do fungicida benomil sobre o tombamento de pós-emergência em casa-de-vegetação	80
4.3. Sensibilidade dos isolados de fungos à fungicidas	86

4.3.1. Ação dos fungicidas sobre o crescimento micelial dos isolados	86
4.3.2. Ação dos fungicidas procymidone e captan sobre a esporulação dos isolados	88
5. DISCUSSÃO	97
5.1. Seleção de microrganismos	97
5.2. Avaliação da eficiência dos isolados selecionados como antagonistas	98
5.2.1. Bactérias e actinomiceto	98
5.2.2. Fungos	101
5.2.2.1. Interação de hifas e hiperparasitismo	101
5.2.2.2. Antibiose	103
5.2.3. Influência dos microrganismos antagônicos e de benomil no tombamento de pré e pós-emergência	105
5.3. Tolerância e sensibilidade isolados de <u>Trichoderma</u> spp, <u>Penicillium variabile</u> e <u>Penicillium verruculosum</u> à fungicidas in vitro	112
6. CONCLUSÕES	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
8. APÊNDICE	134

9. LISTA DE FIGURAS

Fig.1. Efeito antagônico de isolados de bactérias e actinomiceto à <u>Rhizoctonia solani</u> em meio de BDA (teste de difusão)	59
Fig.2. Efeito antagônico de isolados de bactérias actinomiceto a <u>Cylindrocladium scoparium</u>	60
Fig.3. Efeito antagônico de isolados de bactérias actinomiceto a <u>Cylindrocladium scoparium</u>	61
Fig.4 Percentagem de inibição do crescimento micelial de <u>Rhizoctonia solani</u> por isolados de bactérias e actinomiceto (teste de incorporação)	64
Fig.5 Percentagem de inibição do crescimento micelial de <u>Cylindrocladium scoparium</u> por isolados de bactérias e actinomiceto (teste de incorporação)	64
Fig.6 Percentagem de redução do crescimento micelial de <u>Rhizoctonia solani</u> por diferentes isolados de fungos, em meio de BDA	67
Fig.7 Percentagem de inibição de redução do crescimento micelial de <u>Cylindrocladium scoparium</u> por diferentes isolados de fungos em meio de BDA	68
Fig.8 Tipos de interações observadas entre as hifas dos antagonicos e as hifas de <u>Rhizoctonia solani</u>	69
Fig.9 Efeito de substâncias inibidoras produzidas por diferentes isolados de fungos antagonicos, no crescimento micelial de <u>Rhizoctonia solani</u> , em meio de malte	72
Fig.10 Efeito de substâncias inibidoras produzidas por diferentes isolados de fungos antagonicos no crescimento micelial de <u>Cylindrocladium scoparium</u> , em meio de malte	73

Fig.11	Efeito de isolados antagônicos de bactérias e do fungicida benomil no ataque de <u>Rhizoctonia solani</u> em pré-emergência, sob condições de laboratório	76
Fig.12	Efeito de isolados antagônicos de fungos e do fungicida benomil no ataque de <u>Rhizoctonia solani</u> em pré-emergência, sob condições de laboratório	77
Fig.13	Efeito de isolados antagônicos de bactérias, actinomiceto e do fungicida benomil no ataque de <u>Cylindrocladium scoparium</u> em pré-emergência, sob condições de laboratório	78
Fig.14	Efeito de isolados antagônicos de fungos e do fungicida benomil no ataque de <u>Cylindrocladium scoparium</u> em pré-emergência, sob condições de laboratório	79
Fig.15	Efeito de isolados antagônicos de bactérias, actinomiceto e do fungicida benomil no ataque de <u>Rhizoctonia solani</u> em pós-emergência, sob condições de casa-de-vegetação	82
Fig.16	Efeito de isolados antagônicos de fungos e do fungicida benomil no ataque de <u>Rhizoctonia solani</u> em pós-emergência, sob condições de casa-de-vegetação	83
Fig.17	Efeito de isolados antagônicos de bactérias, actinomiceto e do fungicida benomil no ataque de <u>Cylindrocladium scoparium</u> em pós-emergência, sob condições de casa-de-vegetação	84
Fig.18	Efeito de isolados antagônicos de fungos e do fungicida benomil no ataque de <u>Cylindrocladium scoparium</u> em pós-emergência, sob condições de casa-de-vegetação	85
Fig.19	Efeito de diferentes concentrações do fungicida iprodione no crescimento micelial de isolados antagônicos em meio de BDA	92

Fig.20 Efeito de diferentes concentrações do fungicida captan no crescimento micelial de isolados antagônicos em meio de BDA	93
Fig.21 Efeito de diferentes concentrações do fungicida procymidone no crescimento micelial de isolados antagônicos em meio de BDA	94

10. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise química das amostras de solo coletadas para isolamento dos microrganismos antagonistas	40
Tabela 2. Identificação dos isolados de microrganismos utilizados nos experimentos	41
Tabela 3. Análise química da amostra da mistura do solo, terra roxa estruturada série "Luiz de Queiroz", com um quarto de esterco animal, adubo químico, bagacilho de cana e areia lavada de rio	53
Tabela 4. População de microrganismos isolados	56
Tabela 5. Composição da população de microrganismos antagônicos à <u>Rhizoctonia solani</u> e <u>Cylindrocladium scoparium</u>	57
Tabela 6. Efeito antagônico de isolados de bactérias e actinomiceto à <u>Rhizoctonia solani</u> e <u>Cylindrocladium scoparium</u> em meio de BDA	58
Tabela 7. Percentagem de inibição do crescimento micelial de <u>Rhizoctonia solani</u> e <u>Cylindrocladium scoparium</u> por isolados de bactérias e actinomiceto (teste de incorporação)	63
Tabela 8. Efeito antagônico de diferentes isolados de fungos a <u>Rhizoctonia</u>	

<u>solani</u> testado em meio de BDA	65
Tabela 9. Efeito antagônico de diferentes isolados fungos a <u>Cylindrocladium scoparium</u> testado em meio de BDA	66
Tabela 10. Percentagem de inibição do crescimento micelial de <u>Rhizoctonia solani</u> e <u>Cylindrocladium scoparium</u> por substâncias inibidoras produzidas por diferentes isolados de fungos em meio de malte (teste de membrana de diálise)	71
Tabela 11. Efeito de isolados antagônicos e do fungicida benomil no ataque de <u>Rhizoctonia solani</u> e <u>Cylindrocladium scoparium</u> em pré-emergência, sob condições de laboratório	75
Tabela 12. Efeito de isolados antagônicos e do fungicida benomil no ataque de <u>Rhizoctonia solani</u> e <u>Cylindrocladium scoparium</u> em pós-emergência, sob condições de casa-de-vegetação	81
Tabela 13. Percentagem de redução do crescimento micelial dos isolados de fungos em meio de BDA contendo diferentes concentrações do fungicida iprodione	87
Tabela 14. Percentagem de redução do crescimento micelial dos isolados de fungos em meio de BDA contendo diferentes concentrações do fungicida captan	90
Tabela 15. Percentagem de redução do crescimento micelial dos isolados de fungos em meio de BDA contendo diferentes concentrações do fungicida procymidone	91
Tabela 16. Percentagem de redução da esporulação de isolados de fungos em meio de BDA contendo diferentes concentrações do	

fungicida captan 95

Tabela 17. Percentagem de redução da
esporulação de isolados de fungos
em meio de BDA contendo
diferentes concentrações do
fungicida procymidone 96

" SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS A
Rhizoctonia solani (KHUN) E Cylindrocladium
scoparium (Morgan) AGENTES CAUSAIS DE TOMBAMENTO
EM Eucalyptus"

Autor: TANIA MARTA CARVALHO DOS SANTOS

Orientador: Prof. Dr. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos isolar e avaliar microrganismos capazes de diminuir a incidência de tombamento causado por Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium detectar os possíveis mecanismo envolvidos e, verificar a tolerância de fungos antagônicos aos fungicidas benomil, captan, iprodione e procymidone.

Foram feitos ensaios em laboratório e casa-de-vegetação, sendo obtidos os seguintes resultados. Foram selecionados quatro isolados de bactérias sendo três do gênero Bacillus, um isolado não identificado; um isolado de actinomiceto pertencente ao gênero Streptomyces; quatro isolados de Trichoderma pseudokoningii; três do isolados de Trichoderma aureoviride e um de Trichoderma harzianum; um isolado de Penicillium variabile e um de Penicillium verruculosum.

Para avaliar os isolados selecionados foram feitos testes de incorporação e difusão para bactérias e actinomiceto; interação de hifas e hiperparasitismo, e, membrana de diálise para fungos.

No teste de difusão os isolados de Bacillus spp e o isolado não identificado Streptomyces sp. inibiram o crescimento de Rhizoctonia solani, tendo sido observado a formação e zonas de inibição, enquanto que para Cylindrocladium scoparium os isolados de Bacillus spp avançaram impedindo o crescimento do patógeno, provavelmente o mecanismo envolvido foi o hiperparasitismo. No teste de incorporação todos os isolados de bactérias inibiram o crescimento dos dois patógenos, porém, o isolado de Streptomyces se destacou com inibição de 74,20 e 100 % para Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium respectivamente.

Entre os fungos os isolados das duas espécies de Penicillium foram antagônicos apenas a Rhizoctonia solani. Observou-se colonização das hifas dos dois patógenos por todos isolados dos fungos antagonistas. Os isolados de Trichoderma pseudokoningii (EST.4, EST.3, EQ.2 e MA.7) produziram in vitro, substâncias antibióticas não voláteis capazes de inibir significativamente o crescimento de Rhizoctonia solani. Para Cylindrocladium scoparium as substâncias antibióticas produzidas não inibiram efetivamente o seu crescimento.

O isolado de Bacillus sp SR.5 proporcionou o melhor controle de tombamento de pré-emergência induzida pelos dois patógenos, tendo sido observado 65 e 100 % de emergência de plântulas para Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium respectivamente. Em condições de casa-de-vegetação o isolado de Trichoderma harzianum MA.4, proporcionou o melhor controle de tombamento de pós-emergência para o patógeno Rhizoctonia solani, enquanto que, os isolados de Bacillus spp, EST.4 e EQ.16 e de Streptomyces sp MA.6, foram os mais efetivos para o patógeno Cylindrocladium scoparium.

Observou-se que todos isolados de fungos foram sensíveis ao fungicida benomil para todas as concentrações testadas. Foi observada inibição acima de 50 % para iprodione para todas as concentrações testadas; o fungicida captan foi o menos prejudicial aos isolados testados com inibição variando de 0 a 97 %, enquanto que para procymidone variou de 37,30 a 100%. Todos os fungicidas inibiram a esporulação dos isolados em mais de 80 %. Os isolados de Trichoderma aureoviride, EQ.7, EQ.8, SR.7 e de Trichoderma harzianum MA.4 foram os mais tolerantes aos fungicidas captan, iprodione e procymidone.

"SELECTION OF ANTAGONISTIC MICROORGANISMS AGAINST
Rhizoctonia solani (KHUN) AND Cylindrocladium
scoparium (Morgan) CAUSAL AGENTS OF DAMPING-OFF
IN Eucalyptus."

Author: TANIA MARTA CARVALHO DOS SANTOS

Adviser: Prof. Dr. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

SUMMARY

The present study aimed isolating and evaluating microorganisms capable decreasing incidence of Eucalyptus seedling diseases caused by both Rhizoctonia solani and Cylindrocladium scoparium; detecting the mechanisms involved, and verifying tolerance of antagonist fungi to benomyl, captan, iprodione, procymidone.

Trials were carried out in laboratory and greenhouse, obtaining the following results: four isolates of bacteria were selected, three of them of the Bacillus genus and also a nonidentified isolate; a isolate of actinomycet of the genus Streptomyces; four isolates of Trichoderma pseudokoningii; three of Trichoderma aureoviride; one of Trichoderma harzianum; one of Penicillium variabile and one of Penicillium verruculosum.

In the difusion experiment the Bacillus and Streptomyces isolates inhibited the pathogen growth, showing

inhibition zones for the fungus Rhizoctonia solani, while for the Cylindrocladium scoparium fungus the Bacillus isolates impeded the pathogen growth. In the incorporation experiments all bacteria isolates inhibited the growth of both pathogens, but the Streptomyces isolate stood itself out with inhibition of 74,20 and 100% for Rhizoctonia solani and Cylindrocladium scoparium, respectively.

It was observed a hiper parasitism, where the pathogens were affected by all antagonistic fungal isolates. The Trichoderma pseudokoningii isolates (EST. 3; EST. 4; EQ. 4; and MA. 7) produced, in vitro, nonvolatile antibiotic substances against Rhizoctonia solani. The same antibiotic substances did not inhibit effectively the Cylindrocladium scoparium growth.

The best results of biological control of damping-off diseases caused both pathogens were achieved by applying Bacillus sp SR.5 isolate with 65,00 and 100% of seedlings emergence to Rhizoctonia solani and Cylindrocladium scoparium, respectively. From the data obtained under greenhouse conditions Trichoderma harzianum presented the best results in the control of post-emergence damping-off caused by Rhizoctonia solani. For Cylindrocladium scoparium, the Bacillus spp isolates, EST. 4 e EQ.16 and Streptomyces MA. 6 were more effective.

In relation to fungicides, it was shown that all fungal isolates were sensitive to benomyl in all

concentration used. It was also observed inhibition up to 50% to iprodione. The captan fungicide used was the one that caused less damage to the isolates tested with inhibition from 0,0 to 97%. On the other hand, the procymidone fungicide ranged from 37,30 to 100%.

The sporulation of all fungi was inhibited by the fungicides used. Trichoderma aureoviride isolates EQ. 7; EQ.8; and SR. 7 and Trichoderma harzianum were the most tolerant to captan, iprodione and procymidone fungicides.

1. INTRODUÇÃO

O tombamento de mudas ou damping-off em eucalipto se constitui em um grave problema, tendo em vista a suscetibilidade que esta essência florestal apresenta à doença. O controle ou proteção desta doença é muito complicado pela existência de muitos patógenos envolvidos, que atuam isoladamente ou combinados.

Comumente são usados fungicidas para controlar esses patógenos, porém, o controle nem sempre é efetivo, e, o uso intensivo de fungicidas aumentam a poluição ambiental, induzem a fitotoxidade e ao aparecimento de novas raças do patógeno.

Para reduzir os efeitos da aplicação de fungicidas são necessários métodos alternativos, por isso é importante desenvolver procedimentos economicamente viáveis de controle biológico para ser usado na agricultura.

Controle biológico é a redução da quantidade de inóculo ou da atividade de produção da doença.

pelo patógeno, realizado através de um ou mais organismos, exceto o homem (COOK & BAKER, 1983). A atividade de produção de doença envolve crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outros atributos do patógeno, no desenvolvimento de sintomas e na reprodução.

Raramente o controle biológico elimina o patógeno do local, normalmente reduz a população ou propágulos e, com isso a sua habilidade de produzir doença. Os objetivos dessa prática são: a destruição dos propágulos ou biomassa dos patógenos; prevenção da formação do inóculo; enfraquecimento ou eliminação de sua fonte de alimentação e, redução do vigor e agressividade do patógeno.

O controle biológico pode ser obtido através de antagonismo (onde organismos atuam diretamente sobre o patógeno); indução de proteção (indução de resistência, proteção cruzada, imunização e pré-imunização)

O uso de antagonistas para controlar doenças induzidas por fungos fitopatogênicos do solo tem sido bastante estudado, sendo constatado controle mais efetivo com os gêneros de fungo, Chaetomium, Gliocladium, Penicillium e Trichoderma, bactérias do gênero Bacillus, raças avirulentas de algumas espécies de Pseudomonas e Streptomyces.

O primeiro passo em um programa de controle biológico clássico, ou seja, manipulação direta de microrganismos antagônicos específicos visando determinada

doença, seria um bom conhecimento das interações ecológicas entre tais microrganismos epífitas ou residentes e, os fitopatógenos, incluindo a dinâmica de populações e estádios fenológicos do hospedeiro. Em tais programas de biocontrole clássico, após os isolamentos e caracterização dos epífitas, são investigados em condições de laboratório (*in vitro*), casa-de-vegetação ou condições simuladas de campo (*in vivo*) os possíveis mecanismos antagônicos envolvidos na redução ou supressão do patógeno chave, em condições ambientais controladas. Em certos casos também são avaliados com fungicidas convencionais, para fins de eficiência e economicidade (ROBBES, 1986).

Baseado nesse contexto foram feitos experimentos visando: a) isolamento de microrganismos com potencial antagônico a Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium; b) avaliação da eficiência e os possíveis mecanismos envolvidos no controle dos patógenos em condições de laboratório; c) comportamento dos antagônicos envolvidos no controle dos patógenos em condições de casa-de vegetação; d) verificar a tolerância dos isolados de fungos à fungicidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TOMBAMENTO DE MUDAS EM ESSÊNCIAS FLORESTAIS

O tombamento de mudas ou damping-off em essências florestais, se constitui em um grave problema devido a suscetibilidade que muitas delas apresentam à doença. O controle ou a proteção desta doença é complicado pela existência de muitos patógenos envolvidos que atuam isoladamente ou combinados nos mais de 80 tipos de plantas de viveiros (STEPHEN et alii, 1981).

Os agentes causais de tombamento são habitantes normais do solo, onde podem sobreviver saprofiticamente ou através de estruturas de repouso como: escleródios, microescleródios, clamidosporos e oosporos. Os propágulos dos fungos são disseminados através de água ou irrigação, vento ou partículas de terra aderidas a implementos agrícolas. A penetração desses fungos se dá diretamente através das paredes celulares da epiderme da

raiz ou hipocótilo com a subsequente invasão, pelo micélio, dos tecidos da planta, que acabam por serem degradados pela ação de enzimas e ou toxinas (KRUGNER, 1980).

De um modo geral as temperaturas favoráveis para o crescimento das platinhas são as mesmas para o desenvolvimento da doença, embora a ocorrência de temperaturas suficientemente baixas para retardar o crescimento das platinhas possam intensificar a doença, pelo fato de induzir as mesmas à um período mais prolongado de suscetibilidade. A presença de solos úmidos e a umidade relativa do ar favorecem a ocorrência da doença (KRUGNER, 1980).

A composição do solo afeta diretamente a ocorrência da doença através de seu conteúdo em matéria orgânica, a qual pode favorecer o crescimento de fungos causadores de tombamento. Indiretamente, a composição do solo afeta a doença através de sua textura, que entre outros efeitos, regula a umidade do mesmo. A fertilidade do solo também pode influenciar na ocorrência de tombamento, principalmente com respeito ao nitrogênio. Fertilização pesada com este nutriente predispõe as mudinhas ao ataque dos patógenos, uma vez que prolonga o período de suscetibilidade das mesmas, fazendo-as mais tenras por um maior período de tempo (KRUGNER, 1980).

Mais de trinta fungos diferentes são agentes causais de tombamento, porém, os mais comuns são as

espécies dos gêneros: Rhizoctonia, Cylindrocladium, Pythium, Phytophthora, Fusarium, Botrytis, Diplodia, Pestalotia, etc, que mesmo não sendo específicos quanto ao hospedeiro encontram nos tecidos tenros das platinhas, condições ideais para o seu desenvolvimento (GOMEZ-NAVA, s.d.; FOSCO MUCCI & SHIMURA YOKOMIZO, 1979).

O tombamento de mudas pode se manifestar em pré e pós-emergência. No primeiro caso as sementes são mortas no solo antes que germinem, com isso as sementeiras mostram-se raleadas e, na semeadura direta, aparecem com falhas de germinação ou com número de plantas aquém do esperado (FERREIRA, 1985).

No tombamento em pós-emergência, as mudas aparecem mortas com folhagem murcha ou seca, dependendo do estágio que são observadas, decorrente de lesões que anelam suas hastes. Essas lesões tem coloração que varia de marrom-arroxeadas a marrom-escuras. Quando ocorrem nas sementeiras, incidem geralmente ao nível do coleto e a doença na maioria das vezes, é notada na forma de reboleiras mortas e tombadas, dada a facilidade de disseminação do inóculo e ao contato direto entre os hospedeiros resultantes da alta densidade de plantio (FERREIRA, 1985; FOSCO MUCCI & SHIMURA YOKOMIZO, 1979).

No regime de semeadura direta são observados três estágios dessa produção. No primeiro, o de pré-desbaste, que vai da semeadura até o desbaste, a doença

apresenta-se com lesões ao nível do coleto, folhagem murcha ou seca, com ou sem o prostrar das hastes. No segundo estágio o de pós-desbaste, que vai do desbaste até o fechamento de canteiros, a doença é mais rara e, quando se manifesta, apresenta lesões ao nível do coleto, levando as mudas à morte, em geral sem o tombamento de hastes. No terceiro estágio, o de fechamento dos canteiros ou o tocar de copas das plantas, as lesões incidem em diferentes alturas da haste, geralmente a partir de cerca de 3,0m do coleto, inclusive, em algumas regiões a doença passou a ser designada por canela-preta (FERREIRA, 1985).

O tombamento em essências florestais foi observado na Europa no século XVIII, e chegou a fazer-se importante nos Estados Unidos no início deste século, quando se intencionou produzir mudas de pinus em grande escala para reflorestamento (GOMEZ-NAVA, s.d.).

VAARTAJA et alii (1961) através de isolamentos e teste de patogenicidade, verificaram a importância das espécies de Rhizoctonia e Pythium como patógenos de tombamento, também foram encontradas cepas dos gêneros Phytophthora e Cylindrocarpus, porém, com menor frequência. Em 1967, VAARTAJA, estudando isolados de viveiros de coníferas no sul da Austrália, verificou como patógenos mais importantes Pythium irregulare, Pythium ultimum, Pythium mamilatum, Rhizoctonia spp e Thanatephorus cucumeris. Foram isolados também Botrytis cinerea, Pythium

debaryanum, Cylindrocladium scoparium, Alternaria spp e Sclerotium sp como patógenos potenciais. Cylindrocarpus e Fusarium foram associados à plantas sadias e doentes.

SAKSENA & VAARTAJA (1961) estudando isolados de Rhizoctonia originários de viveiros florestais no Canadá, identificaram 10 espécies e uma variedade. Estas espécies tiveram comportamento diferente quanto a patogenicidade e sintomatologia em vários hospedeiros.

Segundo RAM REDY (1969) Rhizoctonia solani é o principal agente de tombamento, responsável por grandes perdas em viveiros de coníferas na Índia.

REIS & CHAVES (1965) relatam sérias perdas de mudas de eucalipto pelas principais companhias reflorestadoras de Minas Gerais devido ao ataque de Cylindrocladium scoparium.

O tombamento em mudas de eucalipto pode ser causado pelos seguintes fungos em ordem de importância: Cylindrocladium scoparium, Botrytis cinerea, Rhizoctonia solani, Pythium sp e Fusarium sp (FERREIRA, 1985).

2.2. ETIOLOGIA DE Cylindrocladium scoparium

O gênero Cylindrocladium inicialmente descrito por Morgan em 1892, caracteriza-se

pela formação de conidióforos eretos, hialinos, dicotômica ou tricotomicamente ramificados, cada um terminando em duas ou três fiálides. A partir dos conidióforos origina-se uma haste longa, delgada, hialina e septada. Seu segmento distal, a partir do último septo recebe a denominação de vesícula (ALFENAS, 1986). O formato da vesícula parece ser a característica mais importante para classificar espécies de Cylindrocladium (SOBERS & SEYMOUR, 1967). A fase teliomórfica (peritecial) de Cylindrocladium tem sido posicionada no gênero Calonectria (BEEL & SOBERS, 1966; SOBERS, 1969).

No Brasil, um total de sete espécies do gênero Cylindrocladium foram relatados em diversas áreas e de uma faixa ampla de hospedeiros. As espécies são Cylindrocladium scoparium, Cylindrocladium clavatum, Cylindrocladium scoparium var brasiliensis, Cylindrocladium quingueseptata, Cylindrocladium ilicicola, Cylindrocladium theae, Cylindrocladium pterides e Cylindrocladium crotalarie, sendo as duas primeiras encontradas mais frequentemente (ALMEIDA & BOLKAN, 1981).

Cylindrocladium scoparium apresenta vesícula elíptica ou oval, e, conídio com apenas um septo medindo $33-66 \times 4-5 \mu\text{m}$ (ALFENAS, 1986). Provoca podridões de raízes tombamento e manchas foliares em Eucalyptus spp (Alfenas et alii, 1979 x1, citados por ALMEIDA & BOLKAN, 1981). THIES & PANTTON (1970) sugeriram o viveiro como

fonte primária de infecção nas enfermidades de plantas florestais ocasionadas por Cylindrocladium scoparium. Porém, resultados obtidos por ALFENAS & BOLKAN (1981). indicam que a fonte primária de inoculação das enfermidades em plantas florestais causadas por Cylindrocladium não é obrigatoriamente restrita ao viveiro, pois o fungo também pode estar presente em solos virgens.

Segundo REIS & CHAVES (1965) em estudo sobre efeito da temperatura sobre o crescimento micelial de Cylindrocladium scoparium, foi verificado que a temperatura ótima para o crescimento ,está em torno de 28° C e que o máximo desenvolvimento foi obtido no sétimo dia de incubação. A temperatura letal foi de 37° C e a máxima de crescimento 31° C.

2.3. ETIOLOGIA DE Rhizoctonia solani

Rhizoctonia solani KUHN fase assexual de Thanatephorus cucumeris (Frank) DOWK, caracteriza-se por apresentar: a) células multinucleadas na hifa jovem; b) um septo proeminente do tipo dodiporo; c) ramificação próxima ao septo da hifa vegetativa; d)

*1. ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, K.; FERREIRA, F.A.; HODGES, Identificação, características culturais e patogenicidade de três espécies de Cylindrocladium isoladas de manchas foliares de folhas de Eucalyptus spp. Fitopatologia brasileira, Brasília, 4: 445-59, 1979.

contração na base da ramificação; e, e) colônias com pigmentação amarronzada. Os isolados geralmente apresentam células monilióides e escleródios com anel e medula, hifa vegetativa com mais de cinco micra de diâmetro e crescimento micelial rápido (PARMETER JUNIOR & WHITNEY, 1970).

O fungo Rhizoctonia solani apresenta grande variabilidade quanto a patogenicidade e gama de hospedeiros e produção de escleródios. Cosmopolita e de distribuição extensiva nos solos o fungo é de significado ecológico imenso, pois tem mais 200 espécies de hospedeiros, porém, é colonizador pioneiro de matéria seca no solo (Davey & Papavizas, 1959 *2, citados por KUNDU & NANDI, 1985).

A tendência atual para classificação dos diversos isolados de Rhizoctonia solani é a reação de anastomose de hifas, a qual tem implicações na taxonomia, em virtude das possibilidades de divisões sub-específicas, com base em diferentes características não culturais e de patogenicidade dos grupos de anastomose, bem como na distribuição ecológica do fungo (PARMETER JUNIOR et alii, 1969; PARMETER JUNIOR & WHITNEY, 1970; SHERWOOD, 1969).

Uma das dificuldades encontradas

 *2. DAVEY, C.V. & PAPAIVIZAS, G.C. Effect of organic soil amendments on Rhizoctonia disease of snap beans. Agron. J., 51: 493-6, 1959 .

quando se trabalha com Rhizoctonia solani é a produção in vitro de escleródios. Isto torna-se um entrave para a obtenção de bons níveis de infestação do solo uma vez que o micélio puro e triturado pode ser facilmente parasitado por Trichoderma sp e Penicillium sp (BOOSALIS, 1956).

2.4. ASPECTOS GERAIS DO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS

O controle biológico de doenças de plantas foi definido por COOK & BAKER (1983), como a redução total do inóculo ou do processo da doença, através de um ou mais organismos exceto o homem.

Como mecanismos controladores incluem-se: a) uso de indivíduos ou populações apatogênicas ou hipopatogênicas dentro de espécies patogênicas atuando na destruição de propágulos dos patógenos ou, por desajolamento de saprófitas em resíduos de cultura infestados ou mesmo lesões. A principal função é reduzir a virulência e a agressividade do patógeno; b) manipulação da planta hospedeira empregando-se práticas culturais e/ou microrganismos, tornando sua resistência mais efetiva através de ambiente favorável para interações entre antagonistas e patógenos do solo; c) emprego de microrganismos antagonistas com capacidade para atuar na sobrevivência e atividades do patógeno (COOK & BAKER,

1983).

A atuação de microrganismos como agentes de biocontrole de fitopatógenos envolve mecanismos básicos de antagonismos válidos para o rizoplano e o filoplano. Estes podem ser incluídos nas seguintes categorias: a) parasitismo direto ou hiperparasitismo; b) antibiose, através da produção de metabólitos tóxicos ou antibióticos; c) competição por nutrientes ou sítios de sobrevivência e penetração do patógeno e, d) estímulo do hospedeiro para mecanismos de resistência a colonização do patógeno (Blakermann & Brodie, 1976 *3 citados por ROBBIS, 1986).

2.4.1. CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DO RIZOPLANO POR ACTINOMICETOS

Actinomicetos, particularmente Streptomyces spp frequentemente possuem algum potencial para afetar o desenvolvimento de outros microrganismos, através da produção de antibióticos e enzimas liticas ou por competição de nutrientes e substrato. MEREDITH et alii (1941) testaram 1020 isolados de actinomicetos, obtidos de

*3. BLAKERMANN, J.P. & BRODIE, I.D.S. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. In: DICKINSON, C.H. & PREECE, T. E. ed. Microbiology of aerial plant surfaces, Londres. Academic Press, 1976. p. 529-57.

certas áreas da Jamaica, contra Fusarium oxysporum cubense. Os autores verificaram que 122 isolados se mostraram antagônicos ao patógeno, in vitro. Os autores atribuíram a resistência de bananeiras à Fusarium oxysporum cubense, naquelas áreas à ação antagônica dos actinomicetos. THAYSEN & BUTLIN (1945) verificaram a presença de um substância termolábil não filtrável em filtro de porcelana, com ação inibitória sobre o desenvolvimento de Fusarium oxysporum cubense, nos metabólitos dos actinomicetos relatados por MEREDITH (1941).

BUXTON et alii (1955) testaram actinomicetos isolados de diferentes solos, quanto a sua capacidade para inibir o crescimento de oito estirpes de Fusarium oxysporum in vitro. Nove isolados inibiram o crescimento micelial das estirpes igualmente, enquanto que, quatro inibiram o crescimento das estirpes com diferente intensidade para cada uma delas.

ZOGG & JAGG (1974) testaram a estirpe de Streptomyces lavendulae B 84 que mostrou intensa atividade hifolítica contra Gaeumanomyces graminis var. tritice, agente causal do mal-do-pé em trigo, porém causou poucos prejuízos a outros fungos fitopatogênicos. TSCAUDI & KERN (1979) isolaram enzimas com atividade hifolítica de culturas filtradas da estirpe B 84.

Seis espécies de Streptomyces, incluindo Streptomyces nigriscens, Streptomyces albus,

Streptomyces griseus, Streptomyces hallstedii, Streptomyces violaceoruber e Streptomyces ruber isolados de solo, foram testados contra Curvularia lunata, Aspergillus humicola, Pestalotus sp, Rhizoctonia solani e Fusarium oxysporum. Os resultados obtidos sugerem que Streptomyces spp produzem várias substâncias voláteis que causaram efeitos diferentes nos fungos testados. Para Rhizoctonia solani a maior percentagem de inibição foi conferida por Streptomyces griseus (61,14 %) enquanto que, Streptomyces albus foi mais efetivo para inibir Fusarium oxysporum (72.7 %) (GUPTA & TANDON, 1977).

Isolados de actinomicetos obtidos de xilema e floema de olmo Americano foram avaliados para antagonismo in vitro de Ceratocystis ulmi, agente causal de "Dutch Elm Disease". O crescimento micelial de um isolado do patógeno agressivo e de outro não agressivo foram em média inibidos por 75-76 %. Um isolado de Streptomyces albovinaceus e outro de Streptomyces griseus que inibiram vários isolados de Ceratocystis ulmi por 64-90 % in vitro, falharam para prevenir os sintomas da doença quando inoculados em olmo com um semana (OBRIEN et alii, 1984).

CASSIOLATO et alii (1987) verificaram que um isolado de Streptomyces sp inibiu o crescimento micelial de Rhizoctonia solani, Cylindrocladium scoparium, Verticillium dahliae, Pyrenochaeta terrestris e Phytophthora sp em testes realizados in vitro. Através do

método de incorporação foi verificado 100 % de inibição para todos fitopatógenos.

2.4.2. CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DO RIZOPLANO POR BACTÉRIAS

Vários resultados têm sido obtidos por pesquisadores em laboratórios, casa-de-vegetação, condições de campo utilizando-se bactérias como agente de biocontrole.

Segundo AXELROOD & SCHROTH (1985)

Erwinia carotovora subesp. cetavascularum é antagonista a Erwinia carotovora subesp. carotovora durante o desenvolvimento da podridão de tubérculos de batata. O autor relata que foi detectada a produção de um antibiótico pelo antagonista.

KERR & HTAY (1974) verificaram que o crescimento micelial de muitas estirpes de Agrobacterium tumefaciens foram inibidos por colônias de Agrobacterium radiobacter estirpe 84 que aparentemente produz uma bacteriocina. Os autores mostraram que a estirpe preveniu a infecção de Agrobacterium tumefaciens em plântulas de tomate. ROBERTS et alii (1979) isolou e caracterizou a bacteriocina chamada de 6- fosforomiolate de um nucleotídeo análogo a adenina. Segundo MOORE (1979) Agrobacterium radiobacter estirpe 84 controla mal-do-pé em trigo e pode

ser manipulado de maneira similar ao Rhizobium.

Isolados de actinomicetos de várias espécies de Pseudomonas fluorescentes, de raiz de trigo foram testadas quanto a sua capacidade de antagonizar Gaeumannomyces graminis var. tritice (agente causal do mal-do-pé em trigo). Em testes realizados in vitro, foram observados vários graus de deformação e inibição do patógeno. Em solo estéril, apenas um dos isolados de bactéria não teve efeito sobre a doença. Em solo não estéril a doença foi reduzida por todos os isolados de bactérias só ou em mistura, e por quatro isolados de actinomicetos isoladamente ou em mistura. Embora a mistura de todos isolados de Pseudomonas fluorescente tenha reduzido a doença, nenhum deles produziram efeitos similares quando testados sozinhos (SIVASITAMPARAM & PARKER, 1978).

FAULL & CAMPBELL (1979) estudaram a interação dentre Gaeumannomyces graminis e um isolado de Bacillus micoides estirpe 31, que reduziu lesões de raiz em trigo sob condições gnobióticas. Os autores observaram ultraestrutura de infecção em Gaeumannomyces graminis, bem como a penetração e a formação de lignotubérculos. Na presença da bactéria as hifas do patógeno foram lisadas, sugerindo ser essa a razão do controle da doença. ROVIRA & CAMPBELL (1975) através de exame em microscópio eletrônico mostraram que a perfuração e a lise da hifa pela bactéria estavam associadas com o declínio da doença.

SCHREIBER & HOCH (1975) observaram a presença de bactérias colonizadoras do xilema, exibindo antagonismo à patógenos de murcha vascular. Os autores demonstraram *in vitro* inibição do crescimento de Ceratocistis ullmi e Verticillium dalhiae por bactérias isoladas de caules de plântulas de Acer sacharinum.

Bacillus sp, originalmente isolados de tecidos sadios de caule de Acer sacharinum foram introduzidos em feridas de caule de Acer sacharinum e ou plântulas de Acer platanoides. Após três ou quatro dias os caules foram inoculados com um suspensão de Verticillium dalhiae. Vários isolados reduziram a percentagem de caules de Acer sacharinum colonizados pelo patógeno. Um isolado reduziu a percentagem de caules de Acer platanoides colonizados pelo fungo (HALL et alii, 1986).

OLD (1965) relata que várias bactérias isoladas do solo foram antagonistas *in vitro* aos fungos causadores de podridões de raiz: Fusarium graminearum, Fusarium moniliforme, Helminthosporium sativum, Rhizoctonia solani, Cylindrocladium scoparium e Phymatotrichum omnivorum. Foi observada inibição de germinação de esporos e de fragmentos de hifas dos fitopatógenos, quando os solos foram infestados com as bactérias. Todos os isolados produziram metabólitos fungistáticos difusíveis no meio de cultura.

SINGH & MEHROTRA (1980)

trabalhando com microrganismos isolados de solo, obtiveram quatro isolados de bactérias e seis de actinomicetos antagônicos a Rhizoctonia bataticola. Esses antagonistas quando testados em casa-de-vegetação, reduziram significativamente os sintomas causados pelo patógeno, bem como aumentaram o crescimento da planta e a produção de matéria seca por grama.

RANDHAWA & SCHAAD (1984) selecionaram bactérias antagonistas à Rhizoctonia solani e Pseudomonas solanacearum, de pepino e tomate respectivamente. Sementes pré-tratadas com organismos antagônicos, após 24-60 horas de semeadura foram inoculadas com o patógeno. Doze isolados inibiram Pseudomonas solanacearum em raízes de tomate por 95 %, ao passo que apenas um isolado controlou tombamento de pepino.

SNEH et alii (1984) testaram bactérias e actinomicetos isolados de solo supressivos a Fusarium, quanto a sua capacidade para produzir quitinase (enzima que degrada a parede celular de fungos, lisa, e, mata tubos de germinação de clamidoporos), e, para a produção de compostos fluorescentes (sideróforos) em meio deficiente de ferro. Os autores verificaram que a murcha de Fusarium em pepino foi suprimida mais vigorosamente pelos sideróforos altamente fluorescente de Pseudomonas que por outros isolados, contudo, algumas bactérias não fluorescente também suprimiram a doença. Combinações de bactérias liticas

flourescentes não aumentaram a supressividade.

2.4.3. CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DO RIZOPLANO POR FUNGOS

São vários os exemplos de proteção de plantas usando-se fungos como agentes de biocontrole. COOK & BAKER (1983) relatam que Hartley 1921 *4, inoculou solos de florestas com treze fungos antagonistas numa tentativa de controlar tombamento de plântulas de pinus. Testes feitos em vasos com solo autoclavado e inoculado com Pythium debarianum resultou em 27,5 % de tombamento. Quando Phoma betae, Phoma sp, Chaetomium sp, Rhizopus nigricans, Trichoderma roseum, Trichoderma koningii, Aspergillus spp, Rosellinea sp e Penicillium sp foram adicionados, a percentagem da doença foi de 16,9 %.

TVEITT (1953) verificou que a introdução de isolados de Chaetomium cochliodes em solos não esterelizados, diminuía a severidade da doença causada por Helminthosporium victorio em plântulas de aveia. TVEITT & WOOD (1955) observaram que alguns isolados de Chaetomium cochliodes e Chaetomium globosum se mostraram eficientes no controle de Fusarium nivale.

*4. HARTLEY, C. Damping-off in forest nurseries.
U.S.Dpto.Agric. Bull. 934: 1-99, 1921.

CHANG & KOMMEDAHL (1968) usando sementes de milho cobertas com Chaetomium globosum ou Fusarium roseum subesp. cerealis graminearum, obtiveram controle da doença em plântulas sob condições de casa-de-vegetação. Anteriormente, WAKSMAN & BUGIE (1944) isolaram a chaetomina, uma substância antibiótica produzida pelo gênero Chaetomium que tem ação semelhante a penicilina.

ANWAR (1949) relatou proteção in vivo em plantas de cevada contra Helminthosporium sativum quando Trichoderma lignorum e Penicillium sp estavam presentes no solo.

Isolados de Trichoderma viride e Penicillium frequentans obtidos de plântulas doentes, de rizosfera beterraba e de solos infestados com Pythium ultimum mostraram-se antagônicos ao patógeno in vitro. Sementes cobertas com os dois antagonistas preveniram tombamento de pré-emergência, mas, não de pós-emergência, em solos infestados artificialmente em condições de casa-de-vegetação. A infestação simultânea com o patógeno e um ou outro antagonista reduziu significativamente tombamento de plântulas de beterraba. Os antagonistas foram menos efetivo quando misturados ao solo esterelizado onde o patógeno já estava estabelecido ou quando adicionados simultaneamente com o patógeno, em solo não esterelizado (LIU & VAUGHAN, 1965).

HARMANN et alii (1980) observaram

que o micoparasitismo foi o principal mecanismo de controle de tombamento induzido por Pythium spp quando sementes de rabanetes e ervilhas foram cobertas com Trichoderma hamatum. Segundo os autores, na presença de Pythium spp o antagonista foi capaz de produzir as enzimas hidrolíticas β -1-3 glucanase e celulase.

Aplicação de uma preparação de Trichoderma hamatum combinados com o fungicida prothiocarb a um meio infestado com Pythium aphanidermatum, teve um efeito sinergístico, reduzindo a incidência da doença melhor que outro tratamento isolado. Sementes de ervilha e pepino, cobertas com uma suspensão de esporos, reduziu a incidência da doença por 67-88 % (SIVAN & CHET, 1982; SIVAN et alii, 1984).

ELAD et alii (1982) verificaram que a habilidade de isolados de Trichoderma harzianum para controle de Pythium aphanidermatum foi correlata com o nível de produção de enzimas hidrolíticas no solo. LIFSHITZ et alii (1986) aplicando conídios de Trichoderma harzianum ou Trichoderma koningii, em sementes de ervilha reduziu a incidência de tombamento induzido por Pythium sp. Não foi observado micoparasitismo nas hifas do patógeno, sugerindo que esse mecanismo não foi ativo no controle do patógeno. Porém, os antagonistas produziram um fator que resultou em plasmólise das células de Pythium antes do contato do micélio. Culturas filtradas de isolados de Trichoderma spp

inibiram o crescimento do patógeno in vitro.

Uma preparação de Trichoderma harzianum quando incorporada ao solo simultaneamente com inóculo de Phytophthora cinnamomi, foi significativamente efetivo em reduzir a incidência de tombamento, induzido pelo patógeno em pinus de folha pequena (KELLEY, 1976).

OLIVEIRA et alii (1984) testaram vários fungos isolados de amostras de solo proveniente de regiões de alta incidência de podridão branca de alho na cidade de Amarantina, Minas Gerais. Após testes realizados in vitro para antagonismo frente a Sclerotium cepivorum três fungos se mostraram altamente inibidores ao patógeno: Trichoderma harzianum, Paecilomyces lilacinus e Penicillium sp. Os antagonistas produziram substâncias não voláteis que inibiram significativamente o crescimento do patógeno. Foi observado micoparasitismo pelo antagônico Trichoderma harzianum. Em condições de casa-de-vegetação com solos infestados artificialmente, Trichoderma harzianum reduziu significativamente a severidade da doença e aumentou o stand de plantas.

DUTTA (1981) estudou o controle biológico de murcha de Verticillium com microrganismos antagônicos a Verticillium albo-atrum isolados de rizosfera de tomateiro. Penicillium spp (incluindo Penicillium chrysogenum) e Fusarium culmorum inibiram o crescimento do patógeno, enquanto que Trichoderma viride, Gliocladium spp e

Penicillium vermiculatum suprimiram o crescimento do patógeno por invasão e penetração. A imersão das raízes de plântulas de tomate em uma suspensão contendo propágulos de Trichoderma viride ou Penicillium crysogenum foi eficiente no controle da doença em solos infestados. Esses antagonistas devem produzir substâncias antibióticas que inibem o crescimento normal de propágulos do patógeno no solo, e/ou o crescimento saprofítico dos antagonistas suprime o crescimento do patógeno e, conseqüentemente reduz o potencial de inóculo, reduzindo a severidade da doença.

SMITH (1957) relata o efeito de Cephalosporium sobre a murcha fusariana em tomateiro. O autor atribuiu esse resultado a ação de uma substância antibiótica sistêmica produzida pelo fungo. PHILLIPS et alii, (1967) observaram a indução de formação de tiloses em tomateiro por Cephalosporium spp, retardando a colonização dos vasos da planta por Fusarium oxysporum f. subesp. lycopersici.

MARTIN et alii (1984) estudaram interação entre o fungo antagonista Laetisaria arvalis e o patógeno de sementes Phoma betae. A doença induzida pelo patógeno foi significativamente reduzida, quando solo pasteurizado foi inoculado com o antagonista, ou as sementes, infestadas com o patógeno e esclerócios do antagonista. MARTIN et alii (1983) verificaram que Laetisaria arvalis aplicado ao solo em farelo de trigo

reduziu significativamente o sintoma de escurecimento de hipocótilo que frequentemente precede tombamento de pós-emergência e reduz o stand . Em campo de beterraba naturalmente infestado com Pythium ultimum e Rhizoctonia solani, sintomas de tombamento foram reduzidos quando o solo foi corrigido com Laetisaria arvalis (MARTIN et alii, 1984).

DEACON (1976), DEACON & HENRI (1978), DRECHSTER (1946), SNEH et alii (1977), KAO & KO (1983) descrevem as espécies de Pythium spp: Pythium oligandrum, Pythium acanthicum, Pythium splendens e Pythium periplocum como potenciais antagonistas a fitopatógenos. VESELY (1979) relata que Pythium oligandrum protege plântulas de beterraba de tombamento induzido por Pythium ultimum e Pythium debaryanum. A proteção foi observada inoculando-se a semente com o micélio do micoparasita ou usando-se uma suspensão de oosporos do mesmo.

LIFSHTIZ et alii (1984) associou declínio na densidade populacional ou propágulos de Pythium sp ao aumento populacional de um espécie de Pythium sp micoparasita que lisou esporângio germinado do patógeno. Adição do micoparasita ao solo, suprimiu a habilidade saprofítica do patógeno e também sua capacidade de induzir tombamento de pré-emergência em pepino.

MARTIN & HANCOK (1981, 1982, 1983) verificaram que Pythium oligandrum ficou entre os principais competidores de Pythium ultimum, em San Joaquim Valley na

Califórnia. O antagonista é favorecido pela alta concentração de íons clorídicos solúveis no solo, suprimindo o crescimento saprofítico do patógeno.

MACLAREN et alii (1985) relatam que Talaromyces flavus destruiu hifas de Sclerotinia sclerotium in vitro. Estudos de três anos em campo mostraram que o antagonista reduziu significativamente a incidência de murcha.

Sporidesmium sclerotium, um micoparasita de Sclerotinia sp controlou podridão em alface, por quatro plantios consecutivos, quando o solo foi tratado com 100 e 1000 conídios por grama de solo (ADAMS & AYERS, 1982).

2.5. CONTROLE BIOLÓGICO DE Cylindrocladium scoparium

OLD (1965) relatou que um isolado de bactéria inibiu a germinação de Cylindrocladium scoparium in vitro e em solos autoclavados e, infestados naturalmente. Vários isolados de Bacillus sp oriundos de folhas de Eucalyptus grandis se mostraram antagônicos a Cylindrocladium scoparium in vitro. Usando-se um cultura líquida de Bacillus sp sobre folhas destacadas de Eucalyptus grandis e Eucalyptus urophila inoculadas com esporos do patógeno, obteve-se um controle semelhante ao benomil. Quando essa cultura líquida foi aplicada 24 e 48 horas após

a inoculação do patógeno o antagonista não apresentou controle. Não foram verificados efeitos fitopatogênicos do Bacillus sp nem efeitos tóxicos de seus metabólitos (BETTIOL et alii, 1988).

HOMECHIN (1986) usando a técnica do papel celofane sobre o meio de BDA, verificou a inibição do crescimento micelial de Cylindrocladium scoparium através de substâncias liberadas por nove isolados de Trichoderma harzianum.

CASSIOLATO et alii (1987) trabalhando com um isolado de Streptomyces sp verificou que este inibiu o crescimento micelial de Cylindrocladium scoparium em testes realizados in vitro. Através da técnica de incorporação verificou-se supressão total do crescimento micelial do patógeno.

2.6. CONTROLE BIOLÓGICO DE Rhizoctonia solani

O emprego de microrganismos antagonistas tem sido bastante investigado como forma de controle alternativo de Rhizoctonia solani. ALLEN & HAENSELER (1935) em estudos de laboratórios e casa-de-vegetação, observaram que Trichoderma viride interfere na atividade do patógeno. Os autores verificaram que houve redução na percentagem de tombamento de plântulas de pepino e ervilha-de-cheiro. Filtrados de colônias com cinco dias,

foram letais ao patógeno quando empregado concentrado ou diluída a 40 % e sua eficiência diminuiu a partir da autoclavagem a 80 ° C. WEINDLING & FAWCETT (1936) estudaram o controle da rizoctoniose de mudas de citros acidificando-se o solo. Os autores concluíram que o efeito controlador desta prática se deve ao aumento nestas condições da população de Trichoderma spp.

Vários autores atribuíram a supressividade de alguns solos a Rhizoctonia solani à alta população de Trichoderma spp (BAKER et alii, 1967; CHET & BAKER, 1980; COOK & BAKER, 1983; WIJETUNGA & SATACK, 1984). LIU & BAKER (1965) relatam a supressividade de solo de cultivo de rabanete à Rhizoctonia solani. Segundo os autores esse efeito deve-se ao aumento da população de Trichoderma spp, seguido do decréscimo na densidade de inóculo do patógeno.

HADAR et alii (1979) trabalhando com um isolado de Trichoderma harzianum observaram que o mesmo atacava o micélio de Rhizoctonia solani em testes realizados in vitro. Quando uma cultura do antagonista em farelo de trigo, foi aplicada a um solo artificialmente infestado com o patógeno, controlou tombamento em feijão e beringela sob condições de casa-de-vegetação. O decréscimo da percentagem de plantas doentes teve correlação positiva com o aumento da cultura de Trichoderma adicionado ao solo. Essa preparação permaneceu ativa mais que um ciclo de

crescimento de feijão. BACKEMAN & KABANA (1975); WELLS et alii (1972) usando respectivamente melaço e capim centeio como nutriente básico para Trichoderma obtiveram resultados similares.

ELAD et alii (1981) obtiveram resultados satisfatórios contra Rhizoctonia solani em morango, utilizando Trichoderma harzianum. Os autores observaram que a suscetibilidade à doença nas plantas foi reduzida a 18-46 % sob condições de casa-de-vegetação. Em solos de viveiros infestados contendo feijão houve um controle de 92 % em relação a testemunha. Quando plântulas tratadas com Trichoderma harzianum foram transferidas para o campo observou-se um aumento de 21-31 % na produção de novas plantas.

CHET & BAKER (1980); CHET et alii (1979); ELAD et alii (1982); HADAR et alii (1979) observaram que Trichoderma harzianum se estabelecia sobre o patógeno liberando celulase, β (1 - 3) glucanase e quitinase, lisando a parede celular de Rhizoctonia solani, levando o patógeno a morte.

MIHUTA & ROWE (1984) testaram oito isolados de Trichoderma spp obtidos de rizosfera de rabanete, como antagonistas a Rhizoctonia solani. Dois desses isolados (ambos de Trichoderma hamatum) testados em dois locais, sob condições de campo, reduziram a doença à 9 e 32 %, comparando com 89 % do controle, e, 52 e 51 % em

relação a 64 % do controle.

HARMAN et alii (1980) observou que quando sementes de rabanete e ervilha foram tratadas com Trichoderma hamatum o número de propágulos do antagonista aumentou em 100 vezes, e o replantio no mesmo solo por uma ou duas vezes, utilizando sementes não tratadas resultou na redução da incidência de tombamento induzido por Rhizoctonia solani.

GARIBALDI (1983) observou que inoculando Trichoderma hamatum na concentração de 10⁶ conídios por grama de solo, ocorreu supressividade à Rhizoctonia solani, sendo verificada redução na percentagem de tombamento de plântulas de ervilha induzido pelo patógeno.

HOMECHIN (1986) relata que nove isolados de Trichoderma harzianum liberaram, in vitro, substâncias capazes de inibir o crescimento micelial de Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii e Cylindrocladium scoparium. A produção e liberação de tais substâncias foi verificada 60 horas após a presença dos isolados sobre o meio de cultura.

HOMECHIN (1987) verificou a inibição de Macrophomina phaseolina, Sclerotium rolfsii e Rhizoctonia solani por cinco isolados de Trichoderma harzianum em testes realizados in vitro. O tratamento de sementes de soja com esporos desses isolados reduziu a

incidência de tombamento induzido por Rhizoctonia solani, sob condições de campo.

MELO (1986) testando isolados de Trichoderma spp quanto a sua capacidade de antagonizar o crescimento e parasitar o micélio de Rhizoctonia solani, in vitro, observou que dois isolados de Trichoderma pseudokoningii (IG-21-P e IG-41), produziram substâncias que inibiram o crescimento do patógeno. Sob condições de casa-de-vegetação em solo artificialmente infestado, o isolado IG-21-P reduziu significativamente a incidência da doença em beringela quando aplicado ao solo.

MELO & COSTA (1986) relatam a interação de hifas de Trichoderma pseudokoningii (IG-21-P) com hifas de Rhizoctonia solani. O antagonista produziu estruturas semelhante a apressórios na parede celular da célula hospedeira. Subsequentemente foi verificada a ocorrência de outro tipo de interação como: penetração e crescimento do parasita dentro do micélio de Rhizoctonia solani.

A incidência de doenças causadas por Rhizoctonia solani e Sclerotium rofsii, em iris, foram significativamente reduzidas sob condições de casa-de-vegetação quando bulbos foram tratados com um preparado de Trichoderma harzianum. Sob condições de campo, a incidência da doença induzida por Rhizoctonia solani foi eficazmente reduzida até 93 % quando Trichoderma harzianum foi espalhado

ou usado para recobrir o bulbo (CHET et alii, 1982).

Tratamento de bulbos de iris com conídios de Trichoderma hamatum em uma mancha de goma arábica, protegeu bulbos e plântulas de fitopatógenos de solo. Doenças causadas por Rhizoctonia solani e Sclerotium rolfsii foram reduzidas por 73 e 89 % respectivamente. A interação célula-célula entre o antagonista e o fungo patogênico foi estudada por exame e transmissão em microscópio eletrônico. O estudo mostrou que hifas de Trichoderma ataca seu hospedeiro através da formação de apressórios ou de enrolamento em torno do patógeno. Sítios de interação parasita-hospedeiro foram detectados. A descoberta indica que a parede celular de Rhizoctonia solani pode ter um lectin de ligação tipo "O". Foi considerada também a possibilidade de Rhizoctonia solani ser reconhecida por Trichoderma através dos lectins (CHET, 1982; ELAD et alii, 1983).

WEINDLING (1941) isolou e testou toxinas produzidas por Gliocladium fimbriatum e por algumas espécies de Trichoderma, verificando sua alta ação antagônica contra espécies de Sclerotinia americana e hifas de Rhizoctonia solani.

LEWIS & PAPAIVIZAS (1984) usando uma preparação micelial contendo vários isolados de Trichoderma reduziram podridão de frutos de tomate e tombamento de algodão induzido por Rhizoctonia solani, sob

condições de casa-de vegetação. Foi também observada uma redução do inóculo do patógeno e aumento da densidade populacional dos antagonistas. Preparação micelial de oito isolados de Trichoderma spp e Gliocladium virens reduziu em pelo menos 50 % a sobrevivência de Rhizoctonia solani em beterraba. O crescimento saprofítico do patógeno, no solo e em sementes de beterraba, foi reduzido pelo antagonista. Os isolados de Trichoderma hamatum e Gliocladium virens foram mais efetivos que os de Trichoderma harzianum e Trichoderma viride (LEWIS & PAPAVIDAS 1985a).

LEWIS & PAPAVIDAS (1985b) observaram enrolamento de hifas de Trichoderma viride (T-1-R4), Trichoderma hamatum (TR1-4), Trichoderma harzianum (WT-G-24) e Gliocladium virens (G-21) em volta de hifas de Rhizoctonia solani em solo natural. Os isolados G-21 e TRI-4 reduziram a doença, interagindo com 50-80 % das hifas do patógeno.

Uma linhagem de Gliocladium virens isolada de hifas parasitadas de Rhizoctonia solani suprimiu significativamente tombamento induzido pelo patógeno em algodão, quando o antagonista foi aplicado à semente e, semeado em solo infestado. O tratamento com o antagonista resultou em uma redução de 63 % no número de esclerócios viáveis do patógeno (HOWELL, 1982).

TU & VAARTAJA (1981) observaram que, quando hifas de Gliocladium virens entram em contato

com hifas de Rhizoctonia solani ocorre a seguinte sequência de eventos: a) contato das hifas do antagonista com as hifas do hospedeiro; b) formação de apressórios; c) penetração das células hospedeiras; d) formação de hifas intracelulares; e) colapso e morte das células hospedeiras. Testes em casa-de-vegetação mostraram que a presença do antagonista no momento do plantio diminuiu a incidência de tombamento em feijão, induzido por Rhizoctonia solani.

ODVODY et alii, (1980) trabalhando com um isolado de Corticium sp verificaram que o mesmo reduziu significativamente o tombamento de beringela causado por Rhizoctonia solani, sob condições de casa-de-vegetação. Aplicação de micélio e esclerócios do antagonista à sementes de beterraba açucareira, resultou em stand 100 % maior que o controle, sob condições de campo em solo naturalmente infestado com o patógeno.

Aspergillus niger isolado de rizosfera de plântulas de café, mostrou-se antagonista a Rhizoctonia solani in vitro. Em teste de difusão houve um completo parasitismo das hifas do patógeno pelas hifas do antagonista. Sementes de café tratadas com esporos do antagonista teve sua germinação acentuada. Houve redução da doença em testes realizados em casa-de-vegetação e em campo, usando-se solo infestado naturalmente e artificialmente, e, sementes tratadas com Aspergillus niger (VENKATASUBAIAH & SAFEULLA, 1984).

VELVIS & JAGER (1983) verificaram que Verticillium biguttatum mata escleródios de Rhizoctonia solani. Sementes de batata tratadas com esclerócios do antagonista reduziram os sintomas da doença no primeiro estágio do desenvolvimento da planta. Experimentos preliminares em campo, mostraram que o tratamento com o antagonista não reduziu os sintomas no caule, entretanto, foi observada uma marcante redução na formação de escleródios no tubérculo recém-formado. JAGER & VELVIS (1985); VAN DEN BOOGERT (1984) relataram resultados similares.

Inoculação combinada de isolados de Azotobacter chroococcum com Verticillium biguttatum protegeu efetivamente brotos, caules e estolões de batata contra infecção de Rhizoctonia solani. O efeito da inoculação variou com a temperatura do solo. Não foi observada a formação de esclerócios do patógeno em batatas colhidas de vasos, cujo solo foi inoculado com uma combinação dos dois antagonistas, sob condições de casa-de-vegetação. A colheita foi significativamente maior em relação ao controle (MESHRAM, 1984).

KUTER & HOITINK (1985) verificaram que uma variedade de fungos e bactérias induzem supressão de tombamento causado por Rhizoctonia solani e Pythium ultimum, em meio de turfa com adição de nutrientes. Combinações de Trichoderma spp com várias bactérias foram mais efetivas em

reduzir a doença.

Em mais de 3500 isolamentos realizados em 60 amostras de solo, BROADBENT et alii (1971) observaram que quatro isolados de Bacillus sp e um de Streptomyces sp controlaram tombamento causado por Rhizoctonia solani. GOMEZ-NAVA (1975) trabalhando com Bacillus subtilis, verificou sua atividade antagônica contra os fitopatógenos florestais: Rhizoctonia solani, Rhizoctonia endophytica, Rhizoctonia dichotoma e Rhizoctonia sp isolados de Pinus montezumae afetado pela doença.

MEW & ROSALES (1984) verificaram que Pseudomonas fluorescente e não fluorescente, isoladas de Rhizoctonia solani de campo de arroz irrigado, inibiram o crescimento micelial do patógeno e afetou a viabilidade de seus escleródios. O efeito da bacterização da plantas de arroz com esses isolado foi avaliado em casa-de-vegetação, sementes embebidas em um suspensão bacteriana de 10^6 células por ml, por 10 minutos antes da semeadura reduziu a doença e a produção de escleródios do patógeno. Plantios subsequentes a este no mesmo solo também reduziu a severidade da doença.

2.7. AÇÃO DE FUNGICIDAS SOBRE FUNGOS AGENTES DE BIOCONTROLE

Os mecanismos de resistência a fungitoxicante são três: adaptação não genética, que pode ser perdida se o fungo for cultivado em um meio livre de

fungicida; adaptação genética que pode depender de um troca cromossômica; e, adaptação devido a herança extracromossômica (Delp, 1980 *5 citado por ABD EL MOITY, 1982). Hastie, 1979 *6 citado por ABD EL MOITY, 1982, também discutiu o papel dos fungicidas geneticamente ativo em causar a formação de novos tipos de fungos, segundo o autor entre o efeito desses produtos pode ser incluída mutação, quebra cromossômica, não disjunção mitótica e recombinação.

ABD EL MOITY (1982) salienta que apesar da abundância de trabalhos de tolerância de fitopatógenos a fungicidas, poucos têm sido feito à propósito de tolerância em agentes de biocontrole, para seu uso em controle integrado de doenças. Conídios e micélio de isolados tolerantes podem ser usados em conjunto com fungicidas para tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo (PAPAVIDAS, 1982).

RICHARDSON (1954) observou que o fungicida thiram até a concentração de 30 ppm não inibiu Trichoderma viride, e, Penicillium spp sobreviveu até a concentração de 50 ppm. WENSLEY & HUANG (1970) recuperaram Trichoderma sp e Penicillium sp de solos tratados com 40 a

*5. DELP, C. J. Coping with resistance to plant disease control agents. Plant Dis. 54: 652-7, 1980.

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

160 μg de benomil por grama de solo. Em laboratório Trichoderma viride se desenvolveu em solo contendo 5 μg por grama de solo, apesar de ter sido inibido em meio de agar contendo 1 μg do fungicida.

BOLLEN (1971) isolou duas espécies de Penicillium (Penicillium brevicompactum e Penicillium corinbyferum) de pecíolos senescentes de ciclamen e de bulbos de lírios tratados com benomil. Os isolados voltaram a ser resistentes quando cultivados em ágar-malte contendo o fungicida. A resistência foi mantida por até três meses, após repetidos subcultivos em ágar livre do fungicida. A resistência a benomil coincide com a resistência a metiltiofanato e em menor intensidade a thiabendazol e furidazol.

Trichoderma spp têm comportamento variável em relação a fungicidas, são tolerantes a brometo de metila, captan, iprodione, etheridiazole, metalaxil, PCNB e thiram, mas não são tolerantes a benzimidazóis (ABD EL MOITY, 1982; ALLEN et alii, 1980; CHANG et alii, 1986; PAPAIVIZAS, 1982; STRASNOW et alii, 1985).

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE INVESTIGAÇÃO

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Genética de Microrganismos e na casa-de-vegetação do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, em Piracicaba, S.P. latitude de 22° 42' 30" S.

3.2. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos foram isolados de solos coletados de rizosfera de árvores de Eucaliptus spp em diferentes locais do município de Piracicaba. As amostras cuja análise química encontra-se na tabela 1, foram retiradas de uma profundidade de 10 cm.

3.3. ISOLADOS DE MICRORGANISMOS ANTAGONISTAS

Para experimentos de antagonismos foram usados os isolados, cuja identificação encontra-se na tabela 2.

Tabela 1. Análise química das amostras de solo coletadas para isolamento dos microrganismos antagonistas^{1/}. Piracicaba S.P., 1986.

			-3	+	2+	2+	+	3+
	pH	C%	PO ₄	K	Ca	Mg	H	AL
em miliequivalente/ por 100 g de terra								
*1	6,20	4,19	10,0	0,26	9,67	2,93		3,08
*2	6,50	4,09	6,1	0,26	4,45	1,31		5,22
*3	5,80	3,35	24,6	0,96	8,70	0,94		3,43
*4	6,70	3,81	12,2	0,42	8,70	2,61		2,50

1/ As análises químicas foram realizadas pelo Departamento de Solos Geologia e Fertilizantes da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.

*1 Amostra coletada na estrada Mons. Martinho Salgot, Piracicaba, S.P.

*2 Amostra coletada na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, S.P.

*3 Amostra coletada na Fazenda Santa Rosa, Piracicaba, S.P.

*4 Amostra coletada no Bairro Monte Alegre, Piracicaba, S.P.

Tabela 2. Identificação dos isolados de microrganismos utilizados nos experimentos 1/

Isolados	Identificação
EQ.2	<u>Trichoderma pseudokoningii</u> Rifai
EQ.7	<u>Trichoderma aureoviride</u> Rifai
EQ.8	<u>Trichoderma aureoviride</u> Rifai
EST.3	<u>Trichoderma pseudokoningii</u> Rifai
EST.4	<u>Trichoderma pseudokoningii</u> Rifai
MA.4	<u>Trichoderma harzianum</u> Rifai
MA.7	<u>Trichoderma pseudokoningii</u> Rifai
SR.1	<u>Penicillium verruculosum</u> Peyronil
SR.2	<u>Penicillium variabile</u> Sopp
SR.7	<u>Trichoderma aureoviride</u> Rifai
EQ.8	Isolado de bactéria não identificado
EQ.16	<u>Bacillus</u> sp
EST.4	<u>Bacillus</u> sp
MA.4	<u>Streptomyces</u> sp
SR.5	<u>Bacillus</u> sp

1/ Os isolados de fungos foram identificados pelo Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

3.4. MEIOS DE CULTURA PARA ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

3.4.1. Meio para isolamento de fungos (meio de Martin,

MARTIN, 1950).

Agar	20,0	g
KH ₂ PO ₄	1,0	g
K ₂ HPO ₄	0,5	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5	g
Peptona	5,0	g
Dextrose	10,0	g
Extrato de levedura	0,5	g
Rosa bengal	0,033	g
Água destilada	1000	ml
pH	5.7	

3.4.2. Meio para isolamento de bactérias (Meio Warksman
Ágar, WARKSMAN, 1957).

Bacto ágar	15,0	g
Caseína	5,0	g
Glicose	10,0	g
NaCl	5,0	g
Extrato de carne	3,0	g
Água destilada	1000	ml
pH	6.7	

3.4.3. Meio para isolamento de actinomicetos (Meio amido
caseína, KUSTER & WILLIAMS, 1964).

Agar	15,0	g
Amido	10,0	g
Caseína	0,3	g
KNO ₃	2,0	g
NaCl	2,0	g
K ₂ HPO ₄	2,0	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,05	g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01	g
Água destilada	1000	ml
pH	7,20	

3.5. FUNGICIDAS

Foram usados ingredientes ativos dos seguintes fungicidas.

Benlate	Benomil	metil 1-(butil-carbonil)-2-benzimidazole carbamato 50 %.
	Captan	(n - triclorometil -mercapta-4-ciclohexeno-1,2- dicarboximida) 75 %.
	Iprodione	3 - (3,5-diclorofenil)- n-(1-metiletil)- 2,4 - dioxo - 1-imidazollidine-carboxamida 50 %.
	Procymidone	3 - (3,5-diclorofenil) -1,5 - dimetil- 3 -azalíciclo-(3,1,0) hexane 2,4-dione 50%

3.6. HOSPEDEIRO TESTE

Na execução dos experimentos foi usado como hospedeiro Eucalyptus grandis. As sementes foram procedentes de Mogi das Cruzes, fornecidas pelo Departamento de Ciências Florestais, ESALQ/USP.

3.7. AMOSTRAGEM DE SOLO PARA ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Foram coletadas 10 sub-amostras de solo de quatro localidades de Piracicaba. Após homogeneizadas essas sub-amostras formaram uma amostra de cada solo, cujas análises encontram-se na tabela 1. Essas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, e em seguida secas ao ar por 24 horas e, depois peneiradas.

De cada amostra de solo foi tomada uma sub-amostra de 10 gramas, que foi suspensa em água destilada esterilizada. Após agitação foram feitas diluições em série. De cada uma das diluições pipetou-se um alíquota de 1,0 ml, que foi vertida em placas de Petri contendo meio seletivo para isolamento de cada grupo de microorganismo. Foram utilizadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para isolamento de fungos e actinomicetos, e 10^{-5} e 10^{-6} para isolamento de bactérias.

Três a cinco dias após o plaqueamento, as colônias foram contadas e os microrganismos repicados para placas de Petri contendo meio de BDA (ágar

18,0 g; extrato de batata 200 ml; dextrose 18 g; água destilada 1000 ml). Posteriormente os microrganismos foram transferidos para tubos inclinados contendo meio de BDA e armazenados em geladeira.

3.8. TESTES DE ANTAGONISMO "IN VITRO"

3.8.1. Inóculo de bactérias e actinomiceto para testes de incorporação e difusão

Os isolados foram cultivados em frascos erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de BDA. Foram feitas suspensões, transferindo-se inóculo a partir de placas de Petri contendo meio de BDA para frascos contendo 10ml de solução salina (NaCl 08 g; água destilada 1000 ml) estéril. Destas suspensões foram transferidas um aliquota de 2,0 ml para cada erlenmayer. As culturas foram então incubadas com agitação. Após quatro dias foi adicionado agar a cada erlenmayer e o meio foi autoclavado por 20 minutos à 120 ° C.

Para teste de difusão os isolados de bactérias e actinomicetos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de BDA durante 4 dias a 28 ° C.

3.8.2. Inóculo de fungos

Os isolados foram cultivados em

placas de Petri contendo meio de BDA por cinco dias a 28o C.

3.8.3. Inóculo de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium

Os isolados de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium foram cultivados em placas de Petri contendo meio de BDA por cinco e dez dias, respectivamente.

3.9. BIOENSAIOS

3.9.1. Seleção de microrganismos antagonistas

A fim de selecionar isolados antagônicos à Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium, foram testados 75 isolados de bactérias; 68 de fungos; e , 3 de actinomicetos.

Para o centro de placas contendo meio de BDA foi transferido um disco de 1,0 cm de diâmetro de colônia de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium. Após 24 e 48 horas (para Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium respectivamente) discos de 1,0 cm de diâmetro dos prováveis antagonistas (bactérias e actinomicetos) foram transferidos para cada extremidade da placa. As placas foram incubadas por 72 horas, quando foi observada a inibição, e os isolados com capacidade

antagônica preservados.

Para os isolados de fungos possíveis antagonistas, dois discos de 1,0 cm de diâmetro de colônias de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium foram transferidos para cada extremidade de placas contendo meio de BDA. Após 24 e 48 horas (para Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium respectivamente), foi feita a transferência de discos de 1,0 cm de diâmetro dos prováveis antagonistas, para o centro da placa. As culturas foram incubadas por cinco dias à 28 °C, quando foi observada a inibição e os isolados com capacidade antagônica preservados.

3.9.2. Avaliação da eficiência como antagonistas dos isolados selecionados

Após a seleção dos isolados de microrganismos que se comportaram como antagonistas, foram feitos testes afim de comparar a eficiência dos mesmos.

3.9.2.1. Bactérias e actinomiceto

3.9.2.1.1. Testes de incorporação e de difusão

Para o centro de placas contendo meio preparado segundo o item 3.8.1, foi transferido um disco de 1,0 cm de diâmetro com micélio de Rhizoctonia

solani e Cylindrocladium scoparium.

Para teste de difusão, em placas contendo BDA foram marcados dois pontos a dois cm da extremidade. Em um desses pontos foi colocado um disco de 1,0 cm de diâmetro com micélio de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium e no outro foi feito uma estria com os antagonistas.

As culturas foram incubadas por 5 e 10 dias (para Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium respectivamente). Após este período foi determinado o diâmetro da colônia do fungo e a percentagem de inibição de seu crescimento através da fórmula : % de inibição =

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

Cada tratamento mais a testemunha foi repetido quatro vezes.

3.9.3. Fungos

3.9.3.1. Teste de interação de hifas e hiperparasitismo

Em placas de Petri contendo BDA foram marcados dois pontos distanciados 2,0 cm da extremidade, sendo em um deles colocado discos de 1,0 cm de diâmetro de Rhizoctonia solani ou Cylindrocladium scoparium e no outro, disco de 1,0 cm de diâmetro do antagonista. A incubação seguiu o procedimento descrito no item anterior.

Para observação de hiperparasitismo, seguiu-se o mesmo procedimento, sendo colocadas no centro da placa, laminulas esterilizadas. Após 4,5,6 e 7 dias as laminulas foram retiradas coradas com bromolactofenol e observadas em microscópio ótico. Cada tratamento foi repetido quatro vezes.

3.9.3.2. Produção de substâncias inibidoras

Em placas de Petri contendo meio de Malte (ágar 15,0 g; extrato de malte 20,0 g; dextrose 20,0 g; peptona 1,0 g; água destilada 1000 ml) foram sobrepostos discos de 9,0 cm de diâmetro de papel celofane esterelizados. No centro do papel celofane foram colocados discos de 1,0 cm diâmetro de colônia dos antagonistas. Após 72 horas o papel celofane foi retirado, e para o centro das placas foram transferidos discos de 1,0 cm de diâmetro de Rhizoctonia solani ou Cylindrocladium scoparium. As culturas foram incubadas em condições ambiente (temperatura variando de 26^o -28^o C) durante 6 dias após este período foi determinado o diâmetro da colônia dos patógenos e a percentagem de inibição dos mesmos determinada segundo o item 3.9.2.1.1.

3.9.4. Influência dos antagônicos na incidência de tombamento de pré-emergência

Afim de verificar a influência dos antagonicos no tombamento de pré-emergência foram feitos testes segundo a metodologia proposta por THIROMALACHAR (1983). Para o centro de placas de Petri contendo 15 ml meio de BDA, foram transferidos discos de 1,0 cm de diâmetro de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium. Quando a placa estava coberta com crescimento fúngico o micélio foi coberto com solo peneirado (preparado segundo o item 3.10.4), e sementes do hospedeiro, cada tratamento incluindo a testemunha sem tratamento e sem o patógeno foi repetida quatro vezes.

3.9.4.1. Bactérias e actinomiceto

Foram adicionados as placas 10 ml de inóculo preparado segundo o item 3.8.1. sem adição de ágar. As placas foram incubadas por 8 dias em condições ambientes. Após esse período foi determinado o número de plantas germinadas e a influencia dos antagonicos na incidência da doença foi feita baseada na emergência de plântulas sem tratamento e sem o patógeno.

3.9.4.2. Fungos

Foram adicionadas as placas uma suspensão de contendo 5×10^5 esporos de cada antagonista. A incubação e a avaliação foi feita segundo o item anterior.

3.9.4.3. Fungicida

Dez ml de uma solução 0,035 % de benomil foi adicionada a cada placa cuja preparação, incubação e avaliação foi feita segundo o item 3.9.3.1..

3.9.5. Tolerância e sensibilidade de isolados de Trichoderma spp Penicillium variable e Penicillium verruculosum à fungicidas

Afim de verificar o comportamento dos isolados antagônicos de fungos quanto, a tolerância e sensibilidade a fungicidas foram feitos testes usando-se os produtos: Captan 75 % nas concentrações 1,0; 10; 50 e 100 ppm, Benomil 50 % , Iprodione 50 % e Procymidone 50 % nas concentrações 1,0; 2,5; 5,0 e 10 ppm.

Discos de micélio com 1,0 cm de diâmetro foram retirados da margem da colônia de cada isolado (inóculo preparado segundo o item 3.8.3.) e transferidos para placas de Petri contendo meio de BDA suplementado com fungicida.

O meio de cultura foi preparado dissolvendo-se o produto em água destilada esterilizada (solução estoque). A partir dessa solução foram feitas diluições em série transferindo-se uma alíquota de 1,0 ml de cada suspensão para 100 ml de meio de BDA fundente ($\pm 45^{\circ}$ C) de maneira a obter-se as concentrações 1,0; 2,5; 5,0;

10,0; 50,0 e 100 ppm. As placas foram incubadas durante cinco dias em condições ambientes. Após esse período foi determinado o crescimento da colônia e a percentagem de redução do seu crescimento, e, foi feita a contagem de esporos. Cada tratamento incluindo a testemunha foi repetido quatro vezes.

3.10. EXPERIMENTO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO

3.10.1. Preparo de inóculo de bactérias e actinomiceto

O inóculo foi preparado segundo metodologia descrita no item 3.8.1 para teste de incorporação sem adição de ágar.

3.10.2. Fungos

Os isolados foram cultivados em meio de torta-de-filtro Oliver. O inóculo foi preparado em frascos de 500 ml contendo três quartos do volume ocupado por torta-de-filtro e 20 ml de melaço diluído em água na proporção 1:3. Os frascos contendo o meio foram autoclavados a 120 °C por uma hora durante dois dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última autoclavagem cada frasco foi inoculado. A inoculação foi feita com adição de cinco discos de 1,0 cm de diâmetro retirados da margem de colônias dos fungos com cinco dias de

crescimento.

3.10.3. Inóculo de *Rhizoctonia solani* e *Cylindrocladium scoparium*

Preparado segundo o item 3.8.4.

3.10.4. PREPARO DO SOLO

O solo, terra r6xa estruturada s6rie -Luiz de Queiroz coletado no munic6pio de Piracicaba, S6o Paulo, foi preparado com um quarto de esterco animal (curral), adubo qu6mico, bagacilho de cana e areia lavada de rio. A mistura foi autoclavada por duas horas 6 120 ° C.

Tabela 3. An6lise qu6mica da amostra da mistura do solo terra roxa estruturada s6rie Luiz de Queiroz, com um quarto de esterco animal, adubo qu6mico, bagacilho de cana e areia lavada de rio.1/ Piracicaba, SP 1987.

		-3	+	2+	2+	+	3
	C %	PO4	K	Ca	Mg	H	Al
pH							
	em miliequivalente /100 g de terra						
6,0	1,21	43,01	0,46	1,91	1,06	0,97	

1/ As an6lises qu6micas foram realizadas pelo Departamento de Solos Geologia e Fertilizantes da ESALQ / USP .

3.10.5. Experimento

O objetivo foi verificar o efeito dos isolados antagonicos sobre a incidência de tombamento de pós-emergência. Os experimentos foram feitos em vasos com capacidade para 2 kg de solo, preparado segundo o item 3.10.4. Foi usado o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições incluindo a testemunha.

3.10.5.1. Bactérias e actinomiceto antagonistas

A inoculação foi feita na hora do plantio sendo colocado 100 ml de inóculo preparado segundo o item 3.10.1. Os patógenos foram inoculados 20 dias após o plantio e constou de disco de 1,0 cm de diâmetro com crescimento micelial tomadaa das margens das colônias e transferidos para pontos equidistantes, nos vasos a 2,0 cm de profundidade segundo metodologia proposta por STEPHENS et alii (1981). Foram utilizados 3 discos com crescimento micelial por vaso.

A avaliação foi feita baseada no critério de percentagem de sobrevivência do hospedeiro, efetuando-se avaliações aos 14, 21 e 35 dias após a inoculação.

3.10.5.2. Fungos antagonistas

A inoculação foi feita na ocasião do plantio. De cada vaso foi retirado 1/3 de solo e receberam 200 ml de torta de filtro colonizada pelos antagonistas (preparado segundo o item 3.10.2.). Cada vaso foi regado com 100 ml de melão 2 %, e logo após completou-se o volume do vaso com o solo restante. A inoculação com os patógenos e a avaliação seguiu os mesmos procedimentos do item anterior.

3.10.5.3. Fungicida

Após inoculação com os patógenos foram feitas pulverizações aos 7, 14 e 21 dias com benomil 0,035 %. A inoculação com o patógeno e a avaliação seguiu o mesmo procedimento do item 3.10.5.1.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e seleção de microrganismos antagonistas

Os resultados referentes ao número de microrganismos isolados nas diferentes amostras de solo encontram-se na tabela 4.

TABELA 4. População de microrganismos isolados expressa em número de colônias por grama de solo. Piracicaba-SP, 1986.1/

Solo (local)	Fungos			Actinomiceto			Bactéria		
	Diluição			Diluição			Diluição		
	-2 10	-3 10	-4 10	-2 10	-3 10	-4 10	-3 10	-4 10	-5 10
M.Alegre	207	46	34	135	61	63	203	27	42
ESALQ	138	61	16	109	135	18	156	93	18
S.Rosa	306	89	19	209	78	28	104	54	20
Estrada	175	89	14	70	60	43	130	40	31

1/. Média de duas repetições

Através da metodologia empregada foi possível diferenciar entre os isolados, àqueles com capacidade para inibir o crescimento micelial dos fungos Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium. Os resultados encontram-se na tabela 5. Para o fungo Rhizoctonia solani comportaram-se com antagonistas os isolados de bactéria: SR.5, EST.4 e EQ.16 identificados como Bacillus spp) e o isolado EQ.8 não identificado. Um único isolado de actinomiceto (do gênero Streptomyces sp) MA.6 mostrou-se antagônico ao patógeno. Para o fungo Cylindrocladium scoparium exceto o isolado EQ.8 todos os outros anteriormente citados comportaram-se como antagonistas.

TABELA 5. Composição da população de microrganismos antagônicos Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium. Piracicaba-SP, 1986.

Solo	<u>Rhizoctonia solani</u>			<u>Cylindrocladium scoparium</u>		
	Fungo	Actino- miceto	Bactéria	Fungo	Actino- miceto	Bactéria
M.Alegre	2	1	-	2	1	-
ESALQ	3	-	2	3	-	1
S.Rosa	3	-	1	1	-	1
Estrada	2	-	1	2	-	1

Entre os fungos, os isolados EST.3, EST.4, EQ.2, MA.7 (I. pseudokoningii); EQ.7, EQ.8, SR.7 (I. aureoviride); MA.4 (I. harzianum); SR.1 (P. verruculosum) e SR.2 (P. variabile) foram antagonistas à

Rhizoctonia solani. Para Cylindrocladium scoparium, exceto os isolados SR.1 e SR.2 todos os outros comportaram-se como antagonistas.

4.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS ISOLADOS SELECIONADOS COMO ANTAGONISTAS

4.2.1. Bactérias e actinomiceto

4.2.1.1. Teste de difusão

A tabela 6 mostra os valores significativos e a percentagem média de inibição dos fungos Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium. As figuras 1, 2 e 3 apresentam as fotografias do experimento.

TABELA 6. Efeito antagônico de isolados de bactérias e actinomiceto à Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium em meio de BDA (teste de difusão). Piracicaba-SP, 1986.1/

Isolados	<u>R. solani</u>		<u>C. scoparium</u>	
	Crescimento da colônia (cm)	Redução do crescimento (%)	Crescimento da colônia (cm)	Redução do crescimento (%)
SR.5 (<u>Bacillus</u> sp)	2,35	73,90 c	1,79	76,10 e
EQ.16 (<u>Bacillus</u> sp)	2,80	68,90 c	1,99	73,50 d
EST.4 (<u>Bacillus</u> sp)	2,86	68,20 c	2,14	71,50 c
MA.6 (<u>Streptomyces</u> sp)	3,10	65,60 c	4,94	34,10 b
EQ.8 (não identificado)	4,25	52,80 b	-	-
Testemunha	9,00	0,00 a	7,50	0,00 a

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fig. 1. Efeito antagonístico de isolados de bactérias e actinomicetos à *Rhizoctonia solani* em meio de BDA (teste de difusão)

EQ.8 Isolado não identificado

EQ.16 *Bacillus* sp

EST.4 *Bacillus* sp

SR.5 *Bacillus* sp

MA.6 *Streptomyces* sp

Fig.2 Efeito antagônico de isolados de bactérias à *Cylindrocladium scoparium*

SR.5 *Bacillus* sp
EQ.16 *Bacillus* sp

Fig.3 Efeito antagônico de isolado de Bactéria e actinomiceto a Cy lindrocladium scoparium

EST.4 Bacillus sp

MA.6 Streptomyces sp

Foram detectadas diferenças significativas entre as médias dos tratamentos através do teste F ao nível de 1 % de probabilidade (análises de variância tabela 1 do apêndice).

Para Rhizoctonia solani não foram detectadas diferenças significativas entre os isolados SR.5, EQ.16, EST.4 e MA.6 pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Aqueles isolados se mostraram superiores ao isolado EQ.8. Quanto a Cylindrocladium scoparium foram detectadas diferenças significativas entre todos os isolados testados, tendo o isolado SR.5 se mostrado superior aos demais, enquanto que o isolado MA.6 foi o menos eficiente.

4.2.1.2. Teste de incorporação

Os resultados deste experimento constam da tabela 7 e figuras 4 e 5.

Através da análise de variância (tabela 2 do apêndice) foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste F ao nível de 1 % de probabilidade.

Para Rhizoctonia solani o isolado MA.6 se mostrou superior aos demais, enquanto que o isolado EQ.8 foi o menos eficiente . Todos os isolados diferiram entre si estatisticamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para o fungo Cylindrocladium scoparium o isolado MA.6 mostrou-se o mais eficiente, tendo inibido completamente o crescimento micelial do mesmo. Os isolados EST.4 e EQ.16 não diferiram entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

TABELA 7. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium por isolados de bactéria e actinomiceto (teste de incorporação). Piracicaba-SP, 1986.1/

Isolados	<u>R. solani</u>		<u>C. scoparium</u>	
	Cresci- mento da colônia (cm)	Inibição do cres- cimento (%)	Cresci- mento da colônia (cm)	Inibição do cres- cimento (%)
MA.6 (<u>Streptomyces</u> sp)	2,32	74,20 f	0,00	100,00 d
SR.5 (<u>Bacillus</u> sp)	4,98	44,70 e	1,89	58,00 c
EST.4 (<u>Bacillus</u> sp)	5,70	36,70 d	2,20	51,10 b
EQ.16 (<u>Bacillus</u> sp)	7,06	21,60 c	2,29	49,10 b
EQ.8 (não identificado)	8,23	8,60 b	-	-
Testemunha	5,00	0,00 a	4,50	0,00 a

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fig.4 Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* por isolados de bactérias e actinomiceto (teste de incorporação).

Fig.5 Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Cylindrocladium scoparium* por isolados de bactéria e actinomiceto (teste de incorporação)

4.2.2. Fungos

4.2.2.1. Interação de hifas e hiperparasitismo

Nas tabelas 8 e 9, e, figuras 6 e 7 encontram-se os valores médios representativos e a percentagem média de inibição dos fungos Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium.

As análises de variância (tabela 3 do apêndice) detectaram pelo menos um contraste significativo entre as médias dos tratamentos ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste F.

TABELA 8. Efeito antagônico de diferentes isolados de fungos à Rhizoctonia solani testado em meio de BDA. Piracicaba-SP, 1986.1/

Isolados	Crescimento da colônia de <u>R. solani</u> (cm)	Crescimento da colônia do antagonico (cm)	Redução do crescimento (%)	
MA.4 (I. <u>harzianum</u>)	0,86	9,00	90,04	d
SR.7 (I. <u>aureoviride</u>)	0,93	9,00	89,70	cd
EST.3 (I. <u>pseudokoningii</u>)	1,50	9,00	83,30	bcd
EQ.7 (I. <u>aureoviride</u>)	1,62	9,00	82,00	bcd
EQ.2 (I. <u>pseudokoningii</u>)	1,67	9,00	81,40	bcd
EQ.8 (I. <u>aureoviride</u>)	1,80	9,00	80,00	bc
EST.4 (I. <u>pseudokoningii</u>)	2,05	9,00	77,20	bc
MA.7 (I. <u>pseudokoningii</u>)	2,32	9,00	74,20	bc
SR.2 (P. <u>variabile</u>)	4,27	9,00	52,50	b
SR.1 (P. <u>verruculosum</u>)	4,57	9,00	49,20	b
Testemunha	9,00	0,00	0,00	a

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foram detectadas diferenças significativas entre os isolados testados. Os isolados SR.1 e SR.2 foram os menos eficientes para inibir o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*. Quanto a *Cylindrocladium scoparium* os isolados MA.7 e EQ.7 mostraram-se os mais eficientes, e, o isolado EST.3 o menos eficiente para inibir o crescimento micelial do fitopatógeno.

TABELA 9. Efeito antagônico de diferentes isolados de fungos à *Cylindrocladium scoparium* testado em meio de BDA. Piracicaba-SP, 1986.1/

Isolados	Crescimento da colônia de <i>C. scoparium</i> (cm)	Crescimento da colônia do antagônico (cm)	Redução do crescimento (%)	
MA.7 (<i>I. pseudokoningii</i>)	2,76	8,50	63,20	d
EQ.7 (<i>I. aureoviride</i>)	2,81	7,00	62,50	d
MA.4 (<i>I. harzianum</i>)	3,00	8,00	60,00	d
EST.4 (<i>I. pseudokoningii</i>)	3,01	7,00	59,90	d
SR.7 (<i>I. aureoviride</i>)	3,03	8,20	59,60	d
EQ.2 (<i>I. pseudokoningii</i>)	3,11	8,00	58,50	cd
EQ.8 (<i>I. aureoviride</i>)	3,22	7,60	57,10	c
EST.3 (<i>I. pseudokoningii</i>)	3,64	8,50	51,50	b
Testemunha	7,50	0,00	0,00	a

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na figura 8 encontra-se a fotografia dos tipos de micoparasitismo observados. Foi observado, enrolamento formação de apressórios e penetração das células

Fig.6 Percentagem de redução do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* por diferentes isolados de fungos, em meio de BDA.

Fig.7 Percentagem de redução do crescimento micelial de Cylindrocladium scoparium por diferentes isolados de fungos em meio de BDA.

Fig.8 Tipos de interações observadas entre as hifas dos antagonísticos e as hifas de Rhizoctonia solani.

hospedeiras, porém, o parasitismo de contato foi o mais frequente. Como resultado do micoparasitismo foi claramente observado um número muito grande de hifas dos dois fitopatógenos, vacuoladas e mortas.

Os isolados SR.1 e SR.2 induziram a formação de uma pequena zona de inibição, não tendo sido observada uma invasão como ocorreu com os outros isolados, no entanto também foram observadas interações entre as hifas daqueles isolados e as hifas de Rhizoctonia solani.

4.2.2.2. Produção "in vitro" de substâncias inibidoras pelos antagonistas

Os resultados do experimento encontra-se na tabela 10. A figura 9 mostra a fotografia dos resultados obtidos para o fungo Rhizoctonia solani, enquanto que as figuras 10 mostram os gráficos dos resultados obtidos para o fungo Cylindrocladium scoparium.

As análises de variância (tabela 4 do apêndice) detectaram pelo menos um contraste significativo entre as médias dos tratamentos, pelo teste F ao nível de 1 % e probabilidade.

Os isolados MA.7, EST.4, EQ.2 e EQ.2 todos de Trichoderma pseudokoningii produziram substâncias que inibiram violentamente o crescimento micelial de Rhizoctonia solani. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas entre o crescimento micelial do

controle e dos outros isolados antagonistas. O isolado MA.4 não apresentou efeito inibitório nenhum, sobre Rhizoctonia solani.

Para Cylindrocladium scoparium foram detectadas diferenças significativas entre os isolados, porém, não foi observada percentagem de inibição superior a 31,5 %.

TABELA 10. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium por substâncias inibidoras produzidas por diferentes isolados de fungos em meio de malte (teste de membrana de diálise). Piracicaba-SP, 1986.1/

Isolados	R. solani			C. scoparium		
	Diâ- metro da co- lônia (cm)	Inibi- ção do cres- cimento (%)		Diâ- metro da co- lônia (cm)	Inibi- ção do cres- cimento (%)	
EST.3 (I. pseudokoningii)	2,72	68,80	b	3,59	20,20	b
EST.4 (I. pseudokoningii)	3,80	57,80	b	3,08	31,50	d
EQ.2 (I. pseudokoningii)	3,05	66,10	b	3,27	27,30	cd
EQ.7 (I. aureoviride)	8,85	1,70	a	3,27	27,30	cd
EQ.8 (I. aureoviride)	8,57	4,80	a	3,27	27,30	cd
MA.4 (I. harzianum)	9,00	0,00	a	3,40	24,40	bc
MA.7 (I. pseudokoningii)	2,57	71,45	b	3,48	22,70	bc
SR.7 (I. aureoviride)	8,75	2,80	a	3,27	27,30	cd
SR.1 (P. verruculosum)	8,35	7,20	a	-	-	
SR.2 (P. variabile)	8,13	9,70	a	-	-	
Testemunha	9,00	0,00	a	4,50	0,00	a

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fig.9 Efeito de substâncias inibidoras produzidas por diferentes isolados de fungos antagônicos, no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, em meio de malte.

Fig.10 Efeito de substâncias inibidoras produzidas por diferentes isolados de fungos antagônicos no crescimento micelial de *Cylindrocladium scoparium*, em meio de malte

4.3. Influência dos microrganismos antagônicos e benomil sobre o tombamento de pré-emergência em condições de laboratório

As análises de variância (tabela 5 do apêndice) dos resultados obtidos detectaram pelo menos um contraste significativo entre as médias dos tratamentos ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os resultados do experimento encontram-se na tabela 11 e figuras 11 a 14. Foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Para Rhizoctonia solani a maior percentagem de emergência foi observada no tratamento com o isolado SR.5. Neste tratamento foi observado 65 % de emergência de plântulas promovendo um aumento de 55 % em relação ao controle sem tratamento. O tratamento com SR.5 superou o controle químico que teve emergência de 48,50 %, 38,50 % de aumento em relação ao controle. A menor percentagem de emergência de plântulas foi observada no tratamento com o isolado de bactéria EQ.8, onde foi observado 24,17 % de emergência de plântulas, não diferindo estatisticamente do controle.

Em relação a Cylindrocladium scoparium o isolado de bactéria SR.5, foi o mais eficiente, tendo sido observado 100 % de emergência de plântulas

promovendo um aumento de 45 % em relação ao controle. Os tratamentos EST.3 e EQ.7 (fungo), EST.4, EQ.16 e SR.5 (bactéria) superaram o benomil.

TABELA 11. Efeito de isolados de microrganismos e do fungicida Benomil no ataque de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium, em pré-emergência. Teste realizado em laboratório com dados expressos em percentagem de emergência de plântulas. Piracicaba-SP, 1987.1/

Tratamentos		<u>R. solani</u>	<u>C. scoparium</u>
		% de emergência	% de emergência
EST.3	(<u>T. pseudokoningii</u>)	43,34 cdef	88,75 cd
EST.4	(<u>T. pseudokoningii</u>)	46,67 cdef	75,00 cd
EQ.2	(<u>T. pseudokoningii</u>)	56,67 fg	72,50 b
EQ.7	(<u>T. aureoviride</u>)	50,00 efg	91,25 cd
EQ.8	(<u>T. aureoviride</u>)	46,67 cdef	80,00 bc
MA.4	(<u>T. harzianum</u>)	35,00 bcd	81,25 bc
MA.7	(<u>T. pseudokoningii</u>)	56,67 fg	71,25 b
SR.7	(<u>T. aureoviride</u>)	43,34 cdef	70,00 b
SR.1	(<u>P. verruculosum</u>)	33,33 bc	-
SR.2	(<u>P. variabile</u>)	38,33 bcde	-
EST.4	(<u>Bacillus</u> sp)	51,92 efg	88,75 cd
EQ.16	(<u>Bacillus</u> sp)	53,33 fg	98,75 d
EQ.8	(não identificado)	24,17 ab	-
SR.5	(<u>Bacillus</u> sp)	65,00 g	100,00 d
MA.6	(<u>Streptomyces</u> sp)	55,00 fg	75,00 b
Benomil		48,50 def	71,25 b
Testemunha		10,00 a	55,00 a

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fig.11 Efeito de isolados antagônicos de bactérias, actinomiceto e do fungicida benomil no ataque de *Rhizoctonia solani* em pré-emergência, sob condições de laboratório.

Fig.12 Efeito de isolados antagônicos de fungos e do fungicida benomil no ataque de *Rhizoctonia solani* em pré-emergência, sob condições de laboratório.

Fig.13 Efeito de isolados antagônicos de bactérias, actinomiceto e do fungicida benomil no ataque de Cylindrocyladium scoparium em pré-emergência, sob condições de laboratório.

Fig.14 Efeito de isolados antagônicos de fungos e do fungicida benomil no ataque de *Cylindrocyladium scoparium* em pré-emergência, sob condições de laboratório.

4.4. Influência dos microrganismos antagônicos e benomil sobre o tombamento de pós-emergência em de casa-de-vegetação

As análises de variância (tabela 6 do apêndice) dos resultados obtidos detectaram pelo menos um contraste significativo entre as médias dos tratamentos ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste F.

Os resultados obtidos (tabela 12 e figuras de 15 a 18) sobre a sobrevivência de plantas com Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium mostraram diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Para Rhizoctonia solani a maior percentagem de sobrevivência de plantas foi obtida com o tratamento MA.4 (Trichoderma harzianum). Neste tratamento foi observado 50,63 % de plantas sobreviventes promovendo um aumento de 59,29 % em relação ao controle. O tratamento com MA.4 superou o tratamento com benomil que teve 69,34 % de sobrevivência , 21,29 % de aumento em relação ao controle. A menor percentagem de sobrevivência foi observada no tratamento com o isolado de fungo EST.4 (Trichoderma pseudokoningii) onde foi observado 47,49 % de sobrevivência, 16,15 % de aumento em relação ao controle.

Para o fungo Cylindrocladium scoparium os isolados de bactéria EST.4 e EQ.16 e o isolado

de actinomiceto se destacaram, tendo sido observado 97,13, 99,80 e 99,69 % de plantas sobreviventes respectivamente. Os isolados de fungo EST.4 (*Trichoderma pseudokoningii*) e EQ.8 (*Trichoderma aureoviride*) apesar de não diferirem da testemunha, foi obtido percentagem plantas sobreviventes inferior a mesma. Para o tratamento com benomil foi obtido 67,29 % de plantas sobreviventes, 25,16 % de aumento em relação ao controle.

TABELA 12. Efeito de isolados de microrganismos antagônicos e do fungicida Benomil no ataque de *Rhizoctonia solani* e *Cylindrocladium scoparium*, em pós-emergência. Teste realizado em casa de vegetação com dados expressos em percentagem de plantas sobreviventes. Piracicaba-SP, 1987.1/

Tratamentos	<u>R. solani</u>	<u>C. scoparium</u>
	% de sobrevivência	% de sobrevivência
EST.3 (<i>T. pseudokoningii</i>)	49,66 b	90,22 e
EST.4 (<i>T. pseudokoningii</i>)	47,49 b	31,26 a
EQ.2 (<i>T. pseudokoningii</i>)	54,30 b	45,77 b
EQ.7 (<i>T. aureoviride</i>)	78,18 e	69,68 d
EQ.8 (<i>T. aureoviride</i>)	69,89 d	41,15 ab
MA.4 (<i>T. harzianum</i>)	90,63 f	49,62 bc
MA.7 (<i>T. pseudokoningii</i>)	70,00 d	51,22 bcd
SR.7 (<i>T. aureoviride</i>)	68,24 d	58,50 cd
SR.1 (<i>P. verruculosum</i>)	62,66 c	-
SR.2 (<i>P. variabile</i>)	52,00 b	-
EST.4 (<i>Bacillus</i> sp)	78,39 e	97,13 e
EQ.16 (<i>Bacillus</i> sp)	79,50 e	99,80 f
EQ.8 (não identificado)	56,65 b	-
SR.5 (<i>Bacillus</i> sp)	69,07 d	88,45 e
MA.6 (<i>Streptomyces</i> sp)	73,34 de	99,69 f
Benomil	69,34 d	67,29 d
Testemunha	61,34 a	42,13 ab

1/ Médias de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fig.15 Efeito de isolados antagônicos de bactérias, actinomiceto e do fungicida benomil no ataque de *Rhizoctonia solani* em pós-emergência, sob condições de casa-de-vegetação.

Fig.16 Efeito de isolados antagônicos de fungos e do fungicida benomil no ataque de *Rhizoctonia solani* em pós-emergência, sob condições de casa-de-vegetação.

Fig.17 Efeito de isolados antagônicos de bactérias, actinomiceto e do fungicida benomil no ataque de *Cylindrocladium scoparium* em pós-emergência, sob condições de casa-de-vegetação.

Fig.18 Efeito de isolados antagônicos de fungos e do fungicida benomil no ataque de *Cylindrocladium scoparium* em pós-emergência, sob condições de casa-de-vegetação.

4.5. Sensibilidade dos isolados de fungos à fungicidas

4.5.1. Ação dos fungicidas sobre o crescimento micelial dos isolados

As análises de variância (tabelas 7 e 8 do apêndice) dos resultados obtidos para os fungicidas captan, iprodione e procymidone, detectaram pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos, ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste F.

O fungicida benomil inibiu totalmente o crescimento de todos os isolados em todas as concentrações testadas.

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

Para iprodione (tabela 13 , figura 19) a partir de 5,0 ppm foram observadas reduções acima de 70 % para todos os isolados. Os isolados EQ.7, EQ.8, SR.7 e MA.4 foram os mais tolerantes, apesar de não ter sido observada redução abaixo de 58 %.

TABELA 13. Percentagem de redução do crescimento micelial dos isolados de fungos, em meio de BDA contendo diferentes concentrações do fungicida Iprodione. Piracicaba-SP, 1987.1/

Isolados	% de redução do crescimento					
	Concentrações					
	0,00	1,00	2,50	5,00	10,00	
EST.3 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	97,10 b FG	97,50 b D	98,80 bc D	100,00 c E	
EST.4 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	96,30 b F	100,00 c E	100,00 c D	100,00 c E	
EQ.2 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	98,40 b G	99,60 b E	100,00 b D	100,00 b E	
EQ.7 (I. aureoviride)	0,00 a A	65,00 b C	76,30 c B	81,70 d B	82,90 d B	
EQ.8 (I. aureoviride)	0,00 a A	62,50 b B	82,90 c C	83,40 c C	86,30 d C	
MA.4 (I. harzianum)	0,00 a A	68,30 b D	77,10 c B	78,80 c A	88,80 d D	
MA.7 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	97,10 b FG	100,00 c E	100,00 c D	100,00 c E	
SR.7 (I. aureoviride)	0,00 a A	58,00 b A	68,80 c A	79,60 d A	81,30 c A	
SR.1 (P. verruculosum)	0,00 a A	93,80 b E	97,40 c D	100,00 d D	100,00 d E	
SR.2 (P. variabile)	0,00 a A	92,20 b E	96,30 c D	100,00 d D	100,00 d E	
1/ Médias de quatro repetições						

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Captan (tabela 14 , figuras 20) foi o menos prejudicial aos isolados testados tendo sido observada redução que variou de 0,00 a 97,50 %. Os isolados SR.1 e SR.2 foram os mais sensíveis a esse fungicida para todas as concentrações testadas, já para os isolados MA.4 e EQ.7 não foi observada redução no crescimento para nenhuma das doses testadas.

Para o fungicida procymidone (tabela 15, figura 21) o isolado SR.7 foi o mais tolerante, enquanto que os isolados SR.1 e SR.2 foram os mais sensíveis para todas as concentrações testadas.

4.5.2. Ação dos fungicidas procymidone e captan sobre a esporulação dos isolados

Através das análises de variância (tabela 9 do apêndice) foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste F ao nível de 5 % de probabilidade. Foram observadas interações significativas entre as concentrações testadas e os isolados, indicando que houve dependência entre os dois fatores.

O fungicida captan (tabela 16) na concentração 1,0 ppm foi suficiente para inibir em 84 % a esporulação do isolado MA.4, que foi o mais tolerante a esse fungicida. Os isolados SR.7, SR.1 e SR.2 foram os mais

afetados com inibição de 98,18, 98,00 e 96,00 respectivamente, para a menor concentração testada.

Para procymidone (tabela 17) o isolado EST.3 foi o mais tolerante, com 89,51 % de inibição na concentração de 1,0 ppm. Os isolados MA7, EST.4 e SR.1, foram os mais afetados com redução de 99,4, 99,3 e 99,00 % respectivamente. Para os dois fungicidas testados, a concentração de 1,0 ppm foi suficiente para inibir a esporulação em 80 %.

TABELA 4. Percentagem de redução do crescimento micelial de isolados de fungo, em meio de BDA contendo diferentes concentrações do fungicida Captan.

Piracicaba-SP, 1987.1/

% de redução do crescimento

Isolados

Concentrações

	0,00	1,00	10,00	50,00	100,00
EST.3 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	70,00 b D	80,90 c D
EST.4 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	0,63 a A	12,90 b D	61,30 c C	82,10 d DE
EQ.2 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	14,00 b B	51,70 d D	70,00 d D	84,70 e E
EQ.7 (I. aureoviride)	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	1,25 a A	16,30 b B
EQ.8 (I. aureoviride)	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A
MA.4 (I. harzianum)	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A
MA.7 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	0,00 a A	55,83 b D	69,90 c D	72,90 d C
SR.7 (I. aureoviride)	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	12,50 b B	15,90 b B
SR.1 (P. verruculosum)	0,00 a A	62,50 b C	71,70 c E	96,30 d E	97,50 d F
SR.2 (P. variabile)	0,00 a A	81,13 b D	87,50 c F	93,80 d E	97,20 e F

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 15. Percentagem de redução do crescimento micelial de isolados de fungos, em meio de BDA contendo diferentes concentrações de Procymidone.

Piracicaba-SP, 1987.1/

Isolados	% de redução do crescimento				
	Concentrações				
	0,00	1,00	2,00	5,00	10,00
EST.3 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	77,20 b F	81,00 c F	82,20 e F	82,20 e E
EST.4 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	74,60 b E	75,00 be D	75,90 e D	79,70 d D
EQ.2 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	82,70 b G	84,30 c G	85,20 e G	88,60 d F
EQ.7 (I. aureoviride)	0,00 a A	44,30 b C	49,40 c E	49,80 e C	50,60 e C
EQ.8 (I. aureoviride)	0,00 a A	49,80 b D	49,80 b C	50,60 b C	50,60 b C
MA.4 (I. harzianum)	0,00 a A	40,50 b B	40,50 b B	43,10 e B	46,40 c B
MA.7 (I. pseudokoningii)	0,00 a A	76,30 b F	78,10 c E	78,10 e E	81,40 d E
SR.7 (I. aureoviride)	0,00 a A	36,30 b A	38,00 c A	38,70 e A	44,30 d A
SR.1 (P. verruculosum)	0,00 a A	97,30 b H	97,30 b H	98,60 c H	100,00 d G
SR.2 (P. variable)	0,00 a A	97,20 b H	97,20 b H	98,60 c H	100,00 d G

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Fig.19 Efeito de diferentes concentrações do fungicida iprodione no crescimento micelial de isolados antagonísticos em meio de BDA.

Fig.20 Efeito de diferentes concentrações do fungicida captan no crescimento micelial de isolados antagonísticos em meio de BDA.

Fig.21 Efeito de diferentes concentrações do fungicida procymidone no crescimento micelial de isolados antagônicos em meio de BDA.

TABELA 16. Percentagem de redução da esporulação de isolados de fungos, em meio de BDA contendo diferentes concentrações de Captan. Piracicaba-SP, 1987.1/

6

Esporos produzidos / ml 10

Isolados

Concentrações

	0,00	1,00	10,00	50,00	100,00
EST.3 (I. pseudokoningii)	820,00 d D	30,00 e C	18,00 b C	16,00 b E	2,00 a ABC
EST.4 (I. pseudokoningii)	1300,00 e H	150,00 d H	33,00 c F	8,00 b C	0,20 a AB
EQ.2 (I. pseudokoningii)	340,00 e A	35,00 d D	27,00 c E	17,00 b E	3,50 a CD
EQ.7 (I. aureoviride)	990,00 e F	72,00 d E	59,00 c H	56,00 b G	38,00 a G
EQ.8 (I. aureoviride)	950,00 d E	75,00 e F	38,00 b G	3,20 a B	2,80 a BC
MA.4 (I. harzianum)	1800,00 e F	280,00 d I	180,00 c J	120,00 b H	8,00 a E
MA.7 (I. pseudokoningii)	540,00 e C	88,00 d G	76,00 c I	40,00 b F	12,00 a F
SR.7 (I. aureoviride)	1100,00 d G	20,00 c B	15,00 b B	13,00 b D	5,50 a DE
SR.1 (P. verruculosum)	1100,00 d G	22,00 c B	21,00 c D	5,50 b BC	1,20 a ABC
SR.2 (P. variabile)	380,00 e B	15,00 b A	0,63 a A	0,13 a A	0,03 a A

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 17. Percentagem de redução da esporulação de isolados de fungos, em meio de BDA contendo diferentes concentrações de Procymidone. Piracicaba-SP, 1987.1/

6

Esporos produzidos / ml 10

Isolados

Concentrações

0,00 1,00 2,50 5,00 10,00

EST.3 (I. pseudokoningii)	820,00 e D	86,00 d H	33,00 c G	25,00 b E	10,00 a C
EST.4 (I. pseudokoningii)	1300,00 d H	8,60 c BC	2,80 b B	0,87 b B	0,65 a AB
EQ.2 (I. pseudokoningii)	340,00 c A	10,00 b C	8,40 b C	0,88 a A	0,50 a AB
EQ.7 (I. aureoviride)	990,00 e F	31,00 d E	12,00 c D	9,50 b D	1,10 a AB
EQ.8 (I. aureoviride)	950,00 e E	76,00 d G	54,00 c H	7,40 b C	1,10 a AB
MA.4 (I. harzianum)	1800,00 e I	28,00 d D	12,00 c D	4,50 b B	2,20 a B
MA.7 (I. pseudokoningii)	540,00 e C	3,20 b A	0,74 a AB	0,40 a A	0,05 a A
SR.7 (I. aureoviride)	1100,00 d G	60,00 c F	21,00 b F	1,90 a A	0,75 a AB
SR.1 (P. verruculosum)	1100,00 d G	28,00 c D	18,00 b E	0,50 a A	0,11 a AB
SR.2 (P. variabile)	380,00 c A	7,00 b B	0,30 a A	0,22 a A	0,18 a AB

1/ Média de quatro repetições

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

5. DISCUSSÃO

5.1. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

Várias espécies de fungos, bactérias e actinomicetos, que ocorrem naturalmente no solo, quando testadas in vitro e in vivo, protegem plantas do ataque de microrganismos fitopatogênicos. Microrganismos do solo podem influenciar o desenvolvimento e a sobrevivência do patógeno. LOCKWOOD (1985) inclui nessa relação, o antagonismo microbiano, conceituado como interações danosas de uma população contra outra, podendo também ser incluída aquelas que têm efeitos positivos sobre as outras.

Os mecanismos de antagonismo no controle biológico de doenças de plantas por microrganismos são considerados os mais frequentes, podendo ocorrer através de antibiose, competição ou parasitismo.

Para seleção vários microrganismos isolados da rizosfera de eucalipto, foram testados, para

permitir a detecção de antagonistas, grau de antagonismo e se possível modo de antagonismo. Dentro dos grupos de microrganismos testados, três isolados de bactéria do gênero Bacillus e um não identificado; um isolado de actinomiceto do gênero Streptomyces; oito isolados de fungos de de três espécies do gênero Trichoderma e dois isolados de duas espécies do gênero Penicillium se mostraram antagonicos a Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium.

Do total de isolados originais do solo testados, cerca de 10 isolados de fungos; 4 de bactérias e 1 de actinomiceto mostraram atividade inibitória aos patógenos em meio de cultura.

5.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS ISOLADOS SELECIONADOS COMO ANTAGONISTAS

5.2.1. Bactérias e actinomiceto

A utilização de bactérias e actinomicetos no controle de fitopatógenos é bastante promissora, pois esses microrganismos são onipresentes e abundantes no solo. Além disso apresentam ampla distribuição através da superfície da biomassa do solo, com bom crescimento, além de serem eficientes produtores de substâncias antibióticas (SAGER, 1983; SINGER & MEHROTRA, 1980). São vários os relatos de produção de antibióticos

por Bacillus sp e Streptomyces sp (ASSANTE & NEAL, 1964; BABAD et alii, 1952; BASTOS & FIGUEREDO, 1976; BETTIOL et alii, 1988; GUPTA & TANDON, 1977; LOKWOOD, 1969; NANDI & SNEN, 1953; STESSSEL et alii, 1953).

Pelos resultados obtidos no teste de difusão observou-se uma superioridade na inibição do fungo Rhizoctonia solani pelos isolados de Bacillus sp (SR.5, EQ.16, EST.4) e de Streptomyces sp (MA.6) em relação ao isolado EQ.8. Para esse patógeno foi observado a formação de zonas de inibição. Esses resultados sugerem que existe uma certa quantidade do produto inibitório que foi suficiente para deter o crescimento do fungo.

Para o fungo Cylindrocladium scoparium não foi observada a formação de zonas de inibição pelos isolados de Bacillus sp, porém foi verificado um avanço desses antagonistas sobre o patógeno, sugerindo que parasitismo poderia ser o mecanismo envolvido para suprimir o crescimento desse fungo. Convém ressaltar no entanto, que não foi utilizada técnica que permitisse a detecção de parasitismo por bactérias.

Em um teste de difusão, a velocidade de difusão de um suposto produto microbiano não indica um aumento considerável da ação inibitória dos organismos, e sim que apenas se registrou o efeito qualitativo da mesma. Isto pode ser explicável se for considerado que a capacidade de um determinado produto microbiano se difundir pode estar

limitado a natureza do meio de cultura, ou ainda por alguma atividade neutralizante dos organismos antagonizados (Slagg & Fellows, 1947 *7, citados por OLSEN & BAKER, 1968).

Do mesmo modo, a inibição tardia pode ser explicada pela produção de algum neutralizante pelos patógenos, e que é responsável por zonas definidas de lise na cultura.

OLSEN & BAKER (1968) BROADBENT et alii (1971) GOMEZ-NAVA (1975) obtiveram resultados semelhantes onde isolados de Bacillus e Streptomyces foram bastante efetivos no controle de Rhizoctonia solani em meio de BDA. A ou as substâncias inibitórias produzidas pelos microrganismos difundiram rapidamente através do ágar. Esses resultados sugerem que as bactérias e actinomicetos são ativamente antagonistas a Rhizoctonia solani por produção de toxinas, enzimas ou ambas, que interferem no crescimento micelial do patógeno.

No teste de incorporação foi observada uma superioridade do isolado de Streptomyces (MA.6) para inibir os dois patógenos, tendo sido verificado supressão total de Cylindrocladium scoparium. Esse resultado pode ser devido as características desse método, onde os efeitos antagônicos se manifestam com mais rapidez,

*7. SLAGG, C.M. & FELLOWS, H. Effects of certain soil fungi and their products on Onphiobolus graminis. J. AGR.RES. 75: 279- 93, 1947.

pois os fungos entram em contato imediato com os produtos microbianos incorporados ao meio. A influência de fatores químicos e físicos que retardam o contato entre os patógenos e o produto microbiano é eliminado neste método.

As diferenças na ordenação de níveis de antagonismo observado entre os métodos, indicam diferenças definidas no grau de resistência, determinados não pelo método em si, mas, pela natureza dos elementos antagônicos envolvidos. Cada patógeno apresenta resposta ou reação particular, devido tanto a mecanismos de ataque que se supõem essencialmente diferentes nos antagonistas e em seus produtos metabólicos como os de defesa dos patógenos (GOMEZ-NAVA, 1975).

5.2.2. Fungos

5.2.2.1. Interação de Hifas e Hiperparasitismo

Os resultados obtidos, mostraram que, para o fungo Rhizoctonia solani os isolados de Trichoderma harzianum (MA.4) e de Trichoderma aureoviride (SR.7) foram os mais efetivos, enquanto que para Cylindrocladium scoparium os isolados de Trichoderma pseudokoningii (MA.7) e de Trichoderma aureoviride (EQ.7) se destacaram. Esses dados concordam com observações feitas por WEINDLING (1934) e BELL et alii (1982) que ocorrem diferenças entre as espécies de Trichoderma quanto a sua

ação antagônica em relação a outros fungos, e, essas diferenças podem ocorrer mesmo entre isolados da mesma espécie.

As espécies de Penicillium testadas, foram antagônicas apenas ao fitopatógeno Rhizoctonia solani. BOOSALIS (1956) obteve resultados semelhante, onde entre 28 espécies de fungo de 16 gêneros, apenas Rhizoctonia solani foi sensível a Penicillium vermiculatum.

Os resultados das observações de hiperparasitismo, coincide com o trabalho de vários autores (BOOSALIS, 1956; ELAD et alli, 1983 ; WEINDLING, 1934) onde foram observadas várias alterações morfológicas como enrolamento, haustório, desorganização da parede celular do hospedeiro e penetração celular causando vacuolação e morte da mesma.

Recentes estudos têm mostrado que ocorrem fenômenos a nível molecular como, material fibrilar extracelular depositados no local de interação das hifas, acúmulo de organelas parasitas nas células do hospedeiro, e a produção de uma bainha matriz que "guia" a penetração do parasita (ELAD et alii, 1983).

O envolvimento do micoparasitismo como mecanismo de biocontrole, levanta duas questões adicionais, como a necessidade do contato físico para a destruição do hospedeiro e, até que ponto as enzimas e outros componentes celulares são importantes no

micoparasitismo (LEWIS & PAPAVIZAS, 1985).

A capacidade de Trichoderma spp produzir β (1-3) glucanase foi verificada por vários autores (CHET & BAKER, 1980; CHET et alii, 1979; ELAD et alii, 1982; HADAR et alii, 1982). Essa capacidade para produzir enzimas que degradam parede celular é comum entre os fungos saprofiticos, CHESTER & BULL (1963) relatam que mais de 120 fungos do solo examinados produziram β (1-3) glucanase.

Em micoparasitismo, os hospedeiros sofrem "pré.tratamento" por produtos metabólicos do parasita, incluindo enzimas, antes da desorganização e morte das células. Porém, a evidência de metabólitos tóxicos é circunstancial. Trabalhos utilizando métodos mais sofisticados são necessários para determinar a importância de metabólitos em micoparasitismo.

5.2.2.2. Antibiose

Dos dados obtidos foi verificado que quatro isolados de Trichoderma pseudokoningii (EST.3, EST.4, EQ.2 e MA.7) produziram substancias antibióticas não voláteis, capazes de inibir o crescimento micelial de Rhizoctonia solani em até 71,45 %, enquanto que, para Cylindrocladium scoparium foi detectada, ação dessas substâncias por todos os isolados de Trichoderma spp apesar

de não ter sido muito expressiva.

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, 1956 *8 citado por PAPAIVIZAS, 1985) porém, não é evidência direta que os antibióticos sejam produzidos no solo em quantidade suficiente para induzir na área, resultados efetivos de controle biológico de doença (PAPAIVIZAS, 1985).

Muitos isolados de Trichoderma spp produzem antibióticos não voláteis, ativos contra uma certa faixa de fungos. A habilidade para produzir antibióticos varia tanto entre isolados de várias espécies, como entre isolados da mesma espécie, assim como a suscetibilidade de diferentes fungos aos mesmos. DENIS & WEBSTER (1969a) observou que dois entre nove isolados de Trichoderma harzianum, um isolado de Trichoderma aureoviride e quatro de Trichoderma pseudokoningii produziram antibióticos não voláteis difusivos que causaram apreciável redução no crescimento micelial de Rhizoctonia solani.

A produção de antibióticos polipeptídicos tem sido atribuída a isolados de Trichoderma spp. Trabalhos têm relatado a produção de suzukacilin,

*8. 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.

alameticina e dermadine em culturas filtradas desses fungos. Suzukacilin e alameticina, contêm glutamina, ou ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, valina, e leucina. A alameticina contém ainda 2-metil alanina (ácido α amino isobutírico). Isoleucina, aloisoleucina e uma substância nihidrina positiva são presentes em suzukacilin. A aloisoleucina é um derivado da isoleucina formado durante a hidrólise do polipeptídeo. Ambas são ativas contra fungos e bactérias.

Apesar das características de bom produtor de antibiótico do gênero Penicillium serem bastante relatadas (BOOSALIS, 1956; DUTTA, 1981; LIU & VAUGHAN, 1965; OLIVEIRA et alii, 1984; SIVAN, 1987), não foi observado efeito significativo das duas espécies testadas em relação a Rhizoctonia solani.

5.2.3. Influência dos microrganismos antagônicos no tombamento de pré e pós-emergência

Dos resultados obtidos em pré e pós emergência não foi observada uma ordem constante do efeito exercido pelos antagonistas em relação aos dois tipos de tombamento induzidos pelos patógenos testados.

Para Rhizoctonia solani verificou-se que os isolados de Bacillus sp (SR.5) e de Trichoderma harzianum (MA.4) foram mais efetivos em pré e pós-emergência

respectivamente. Enquanto que os isolados de Bacillus spp (SR.5 e EQ.16) destacaram-se na inibição de Cylindroccladium scoparium. Deve ser salientado no entanto, que para este patógeno foi observada uma superioridade dos isolados de Bacillus spp e Streptomyces sp, sendo este efeito observado in vitro e positivamente confirmado nos teste de pré e pós-emergência.

Como já foi ressaltado, o controle biológico induzido pode resultar de quaisquer um dos mecanismos: parasitismo, competição por nutrientes ou antibiose.

Os mecanismos citados são efetivos para qualquer um dos grupos de microrganismos: fungos, bactérias e actinomicetos, porém, para os dois últimos a produção de antibióticos é mais frequente. Vários são os relatos de controle de fitopatógenos por Bacillus spp e Streptomyces em que a antibiose foi o principal mecanismo envolvido (BAKER et alii, 1983, 1985; BASTOS & FIGUEREDO, 1976; BETTIOL, 1938; CHANG & KOMMEDHAL, 1968; HALL et alii, 1986; LEBEN, 1964; MACKEEN et alii, 1986; OLD, 1965; OUF et alii, 1981a,b,c)

Yin et alii 1957, 1965 *9,10 citados por COOK & BAKER (1983) na República Popular da China, verificaram o controle de Rhizoctonia solani em algodão, por isolados de Streptomyces spp que produziram in vitro grandes quantidades de antibióticos. Eben & Spencer, 1978 *11

citados por COOK & BAKER (1983) verificaram o controle de Phomopsis sclerotioedes por isolados de Streptomyces griseus.

Entre os fungos, o gênero Penicillium apresenta grande habilidade na produção de antibióticos. DUTTA (1981) sugere que a produção de substâncias antibióticas por Penicillium crysogenum inibiu o crescimento normal de Verticillium albo-atrum no solo. O fungo Gliocladium virens também tem sido descrito como um potente produtor de antibiótico contra outros fungos, e segundo WEBSTER & LOMAS (1964) pode estar envolvido muitas vezes com a produção de antibióticos atribuída a Trichoderma spp.

Pelos resultados obtidos in vitro convém relatar que isolados das duas espécies de Penicillium usadas nesse trabalho não produziram substâncias antibióticas capazes de interferir no crescimento de Rhizoctonia solani.

-
- *9. YIN, S. Y.; CHANG, J. K.; XUN, P. C. Studies in the mechanism of antagonistic fertilizer "5406" IV. The distribution of the antagonist in soli its influence on the rhizosphere. Acta Microbial. Sin. 11: 259-88, 1965
 - *10. YIN, S. Y.; KENG, D. C.; YANG, K. Y.; CHEU, D. A further study on the control of Verticillium wilt of cotton. Acta. Phytopathol. Sin. 3: 55-61, 1957
 - *11. EBBEN, M. H. & SPENCER, D. M. The use of antagonistic organisms for the control of black root rot of cucumber, Phomopsis sclerotioides. Ann. Appl. Biol. 70: 119-21, 1978.

A ação fungistática de Trichoderma spp, foi primeiramente relatada por ALLEN & HAENSELER, (1935) e posteriormente por DENIS & WEBSTER (1971a,b). Entretanto, não são encontrados na literatura outros trabalhos citando a antibiose como um mecanismo efetivo de controle de fitopatógenos como Rhizoctonia solani e Pythium, por isolados daquele gênero. Contudo, no presente trabalho foi verificada a produção efetiva de antibióticos não voláteis por isolados de Trichoderma pseudokoningii.

Competição por nutrientes no substrato pode ter ocorrido nos exudatos de sementes (pré-emergência) ou exudatos de raiz (pós-emergência). A concentração de exudatos afetam o êxito da infecção pelo patógeno, a remoção de exudatos, deixando-se as sementes de molho reduzem a incidência da doença (SHORT & LACY, 1976), ao passo que a correção com carboidratos aumentam a incidência (HADAR et alii, 1983; KEELING, 1979). Fatores ambientais que aumentam a quantidade desses exudatos, tais como, os níveis de oxigênio, temperatura e umidade do solo, também aumentam a incidência da doença.

Utkheid & Rohe, 1980 *12 citados por COOK & BAKER (1983) sugerem que Bacillus subtilis metabolizam estimulantes de crescimento produzidos por

*12. WTKHEID, R. S. & RAHE, J. E. Biological control of annium white rot. Soil Biol. Biocem. 12: 101-4, 1980.

raízes e cebola e com isso previne a germinação de esclerócios de Sclerotium cepivorum. Lapwood & Adams, 1970 *13 citados por COOK & BAKER (1983) relatam o controle de sarna de batata causado por Streptomyces scabies como resultado do domínio do corte infeccioso por bactérias que excluem o patógeno por competição de espaço, nutrientes e oxigênio.

BATEMAN & LUMSDEN (1964); LIFSHITIZ & HANCOCK (1981) SCHROTH & COOK (1963) WEINHOLD et alii (1964) observaram que diferenças em variedades com relação a suscetibilidade à Pythium spp e Rhizoctonia solani foram diretamente relacionadas com diferenças no aumento de exudação de sementes. Para esses patógenos a remoção de exudatos por um antagonista pode reduzir o potencial de inóculo e assim a incidência da doença, principalmente em pré-emergência. Por outro lado, esse mecanismo não foi importante para Fusarium oxysporum cucumerinum onde a presença de um isolado de Trichoderma spp ou a adição de asparagina não afetaram negativa ou positivamente a germinação de clamidosporos (LIFSHITIZ, 1986).

O mecanismo de micoparasitismo no

*13. LAPWOOD, D. N. & HERING, A. Soil moisture and infection of young potato tubers by Streptomyces scabies (comm. scab). Potato Res. 13: 296-304, 1970.

presente trabalho foi observado in vitro e em testes de pré-emergência. Os antagonistas atacaram o micélio dos dois patógenos. Segundo CHESTER & BULL (1963) fungos saprófitas são capazes de produzir enzimas liticas que estão envolvidas no fenômeno de micoparasitismo. Tem sido relatado por vários autores a produção de enzimas β (1-3) glucanase e celulase por isolados de Trichoderma spp. Foi observado que o isolado de Trichoderma harzianum (MA.4) se destacou in vitro, tratamento com esse isolado em casa-de-vegetação resultou na maior percentagem de plantas sobreviventes em relação ao tombamento induzido por Rhizoctonia solani. HADAR et alii (1979) sugere que micoparasitismo foi o principal mecanismo envolvido no controle de Rhizoctonia solani por Trichoderma sp. Outra indicação do envolvimento do micoparasitismo no controle de fitopatógenos foi dada por ELAD et alii (1982) que mostraram que a habilidade de isolados de Trichoderma harzianum em controlar Rhizoctonia solani, Sclerotium rofsii e Pythium aphanidermatum foi positivamente correlacionada com a produção de enzimas hidrolíticas no solo.

LEWIS & PAPAVIZAS (1985) relataram uma das primeiras demonstrações de interação entre o patógeno e hifas do antagonista em condições naturais. Nesse trabalho os autores observaram controle de tombamento causado por Rhizoctonia solani por isolados de Trichoderma

viride, Trichoderma harzianum, Trichoderma hamatum e Gliocladium virens. Cerca de 50 a 80 % das hifas do patógeno se encontravam parasitadas pelos antagonistas.

Segundo ROBBBS (1986) os êxitos com hiperparasitismo usando-se bactérias tem sido limitados. Certos Bacillus spp têm sido apontados pela sua ação lítica à parede de esporos em diversos estádios de agentes de ferrugens (Blakermann & Brodie, 1976 *3, citados por ROBBBS, 1986).

Lise de células também foi sugerido como mecanismo de controle biológico de Rhizoctonia solani por bactérias (MITCHELL & HURWITZ, 1965) isso foi observado quando quitina foi adicionada ao solo CAMPBEL (1983) e CAMPBEL & EPHGRAVE (1983) demonstraram que lise hidrolítica induzida por Bacillus sp no solo foi o mecanismo envolvido no controle de Gaeumanomyces graminis. SNEH et alii (1984) verificaram que isolados de Bacillus sp não inibiram a germinação de clamidosporos de Fusarium spp mas reduziram significativamente a incidência da doença. Esses isolados não produziram detectáveis enzimas líticas, zonas de inibição in vitro, ou inibiram a germinação de clamidosporos no solo sugerindo que outros mecanismos além de competição por F^{3+} , lise ou antibiose pode ocorrer em vários sistemas. Os resultados observados no teste de difusão, sugerem que o parasitismo pode ser o mecanismo envolvido no controle de Cylindrocladium scoparium por

isolados de Bacillus spp, no presente trabalho.

5.3. Tolerância e sensibilidade de isolados de Trichoderma spp, Penicillium variabile e Penicillium verruculosum à fungicidas "in vitro"

O uso de técnicas integradas, podem ser usadas na agricultura sem afetar a produção e a qualidade do produto e, ainda minimizar os danos ambientais. O potencial de isolados de fungos, como antagonistas, tem sido longamente estudado, entretanto, trabalhos com respeito ao desenvolvimento de novos biotipos resistentes ou tolerantes a fungicidas para seu uso em sistemas de manejo de doenças tem sido reduzido.

Tratamentos combinados (químico - biológico) para controlar doenças têm apresentado bons sucessos. STRASNOW et alii (1985) relatam controle de tombamento de feijão induzido por Rhizoctonia solani usando Trichoderma harzianum e brometo de metila. O uso de Trichoderma harzianum combinado com o fungicida iprodione reduziu a podridão branca de cebola causada por Sclerotinia cepivorum (ABD-EL-MOITY, 1982). KRAFT & PAPAVIZAS (1983) mostraram que sementes de ervilha tratadas com metalaxyl e Trichoderma harzianum controlaram Pythium ultimum e Fusarium solani. HENIS et alii (1977), LIFSHTIZ et alii (1984) usando benodanil e um isolado de Trichoderma harzianum

obtiveram ação supressora de tombamento causado por Rhizoctonia solani.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram um comportamento variável dos isolados dos fungos antagonistas em relação aos fungicidas testados, tendo sido observada 100 % de inibição em todas as concentrações (benomil), até 0 % para todas as concentrações como foi verificada para os isolados EQ.8 e MA.4 para captan.

O aparecimento de isolados resistentes e tolerantes pode ser obtido por prolongada e repetida exposição a fungicidas. Tolerância em muitos casos pode ser devido à adaptação genética, e pode ser mantida se conservando isolados tolerantes em meio contendo o fungicida apropriado. A mutação gênica, quebra cromossômica e recombinação mitótica pode ser incluída no aparecimento de resistência de isolados antagonistas, nesse caso o caráter é mais estável.

A tolerância de um antagonista não deve se restringir ao seu crescimento ou esporulação, mas principalmente, suas características de produção de metabólitos fungitóxicos e de hiperparasitas devem ser preservadas.

A maioria dos relatos com indução de tolerância ou indução de novos biotipos de fungos antagonistas são do gênero Trichoderma. ALLEN et alii

(1980), PAPAIVIZAS (1981), ABD-EL-MOITY (1982), STRASHNOW et alii (1985), CHANG et alii (1986) observaram que Trichoderma spp são tolerantes a brometo de metila, captan, iprodione, etheridiazole, metalaxil, PCNB e thiram, mas não são tolerantes a benzimidazois. PAPAIVIZAS et alii (1982) obtiveram biotipos de Trichoderma viride e Trichoderma harzianum tolerantes a altas concentrações de benomil + thiabendazole e metil tiofanato. FRAVEL et alii (1985) observaram que dois isolados de Talaromyces flavus foram tolerantes a captan, thiabendazol e captan methiran.

Deve ser salientado no entanto, que resultados obtidos em laboratórios não são necessariamente repetidos em condições naturais. O comportamento de antagônicos são variáveis, WENSLEY & CHANG (1970) observaram que Trichoderma viride foi inibido por 1 µg de benomil em meio de cultura, porém, se desenvolveu em 5 µg do produto em solo.

6. CONCLUSÕES

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

- a. Os isolados de Bacillus spp SR.5, EQ.16, EST.4, e de Streptomyces sp MA.6 no teste de difusão inibiram significativamente o crescimento micelial de Rhizoctonia solani e Cylindrocladium scoparium. No teste de incorporação os dois patógenos foram efetivamente inibidos pelos isolados de Bacillus spp e pelo isolado de Streptomyces. Porém o isolado de Streptomyces (MA.6) se destacou, tendo suprimido totalmente o crescimento de Cylindrocladium scoparium.
- b. Todos isolados de fungo testados parasitaram hifas dos dois patógenos e, inibiram o crescimento dos mesmos. Os isolados de Trichoderma pseudokoningii (EST.3, EST.4, EQ.2 e MA.7) produziram substâncias antibióticas não voláteis capazes de inibir o crescimento micelial

de Rhizoctonia solani. Para o patógeno Cylindrocladium scoparium não foram observadas diferenças objetivas entre os diversos isolados na produção de substâncias antibióticas, apesar das mesmas terem apresentado alguma ação contra o patógeno.

- c. No teste de pré-emergência o isolado de Bacillus sp, SR.5 proporcionou o melhor controle para os dois patógenos, sendo obtido 100 % de emergência de plântulas para Cylindrocladium scoparium. Nos testes de pós-emergência o isolado de Trichoderma harzianum (MA.4) foi o que melhor controlou a doença causada por Rhizoctonia solani. Enquanto que os isolados de Bacillus spp (EST.4 e EQ.16) e de Streptomyces sp (MA.6) foram os melhores para controlar a doença causada por Cylindrocladium scoparium.
- d. Os isolados de fungo testados foram sensíveis aos fungicidas benomil, para todas as concentrações testadas. Para iprodione, a partir de 1,0 ppm foi observada inibição acima de 55 %. Captan se constituiu no fungicida que menos interferiu no crescimento dos isolados, com inibição variando de 0 a 97 %. A inibição induzida pelo fungicida procymidone variou de 37,30 a 100 %.
- e. Todos os fungicidas em todas as concentrações testadas inibiram a esporulação dos isolados, acima de 80 %.
- f. Os isolados de Trichoderma aureoviride EQ.7, EQ.8 e

SR.7, e de Trichoderma harzianum (MA.4) foram os mais tolerantes aos fungicidas captan, procymidone e iprodione.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL MOITY, T.H., PAPAIVIZAS, G.C.; SHATLA, M.N. Induction of new isolates of Trichoderma harzianum tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. Phytopathol., St.Paul, 72: 396-400, 1982.
- ADAMS, P.B. & AYERS, W.A. Biological control of Sclerotinia lettuce drop in field by Sporidesmium sclerotivorum. Phytopathol., St Paul, 72: 485-8, 1982.
- ALFENAS, C. Fungos do gênero Cylindrocladium como patógenos florestais, no Brasil. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 11: 275-7, 1986.
- ALLEN, M.C. & HAENSELER, C.M. Antagonistic action of Trichoderma on Rhizoctonia solani and other soil fungi. Phytopathol., St. Paul, 25: 244-52, 1935.
- ALLEN, R.N.; PEGG, K.G.; FORSBERG, L.I.; FIRTH, D.J. Fungal control in pineapple and avocado of diseases caused by Phytophthora cinnamomi. Austral. J. Exp. Agric. Anim. Husb., Melbourne, 20: 119-24, 1980.
- ALMEIDA, D.C. & BOLKAN, H.A. Ocorrência e distribuição do gênero Cylindrocladium no Distrito Federal. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 6: 223-8, 1978.
- ANWAR, A.A. Factors affecting the survival of Helminthosporium sativum and Fusarium line in soil. Phytopathol., St. Paul, 39: 1005-19, 1949.

- ASSANTE, G.S. & NEAL, A.L. Characterization of fungistatic substance produced by a Bacillus antagonistic to Ceratocystis ulmi. Phytopathol., St Paul, 54: 819-22, 1964.
- AXELROOD, P. & SCHROTH, M.N. Competitive interactions between antibiotic produced and sensitive Erwinia strains during potato tuber soft rot development. Pytopathol., St. Paul, 75: 1281, 1985.
- BABAD, J.; PINSKY, A.; TURNER-GRAFE, R.; SHARON, N. An antifungal polypeptide produced by Bacillus subtilis. Nature, Londres, 170: 618-9, 1952.
- BACKMAN, P.A. & RODRIGUES-KABANA, R. System for the growth and delivery of biological control agents to the soil. Phytopathol., St. Paul, 65: 819-21, 1975.
- BAKER, C. J.; STAVELY, J. R.; MOCK, N. Biocontrol of beans rust by Bacillus subtilis under field conditions. Plant Disease, St. Paul, 69: 770-2, 1985.
- BASTOS, C. N. & FIGUEREDO, J. M. Inibição In vitro de Colletotrichum gloeosporioides Penz., agente causal da antracnose do cajueiro, por uma substância produzida por Bacillus sp. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Brasília, 9: 15, 1975.
- BATEMAN, D. F. & LUMSDEN, R. D. Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages susceptibility to an isolate of Rhizoctonia solani. Phytopathol., St. Paul, 55: 734-8, 1965.
- BELL, D. K. & SORBERS, E. K. Apeg pod and root necrosis of peanuts caused by a species of Calonectria. Phytopathol., St. Paul, 56: 136-9, 1966.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of trichoderma species against six fungal plant pathogens. Phytopathol., St. Paul, 72: 379-82, 1982.
- BETTIOL, W.; AUER, C. G.; CAMARGO, L. E. A.; KIMATI, H. Controle da mancha foliar de Eucaliptus grandis e E. urophylla causada por Cylindrocladium scoparium com Bacillus sp Summa Phytopathologica, Campinas (no prelo).
- BOLLEN, G.L. Resistance to benomil and chemically related compounds in strains of Penicillium species. Neth. J.

Pl. Path., Wageningen, 77: 187-93, 1971.

BOOSALIS, M.G. Effect of soil temperature and green-manure amendment of unsterelized soil on parasitism of Rhizoctonia solani by Penicillium vermiculatum and Trichoderma sp. Phytopathol., St. Paul, 46: 473-7, 1956.

BROADBENT, P.; BAKER, K.; WATERWORTH, Y. Bacteria and actinomycetes antagonistics to fungal root pathogens in Australian soils. Aust. J. Biol. Sci., Melbourne, 24: 925-44, 1971.

BUXTON, E.W. & RICHARDS, M. G. Pathogenic strains of Fusarium oxysporum Fr. distinguished by their differential tolerance to inhibition by various actinomycetes. J. Gen. Microbiol., Londres, 13: 99-102, 1955.

CAMPBELL, R. Ultraestructural studies of Gaeumannomyces graminis in the waterfilms on wheat roots and effect of cay on the interaction between this fungus and antagonistic bacteria. Can. J. Microbiol., Ottawa, 29: 39-45, 1983.

CAMPBELL, R. & EPPHGRAVE, J. M. Effects of bentonite clay on the growth of Gaeumannomyces graminis var. tritici and on its interaction with antagonistic bacteria. J. Gen. Microbiol., Londres, 129: 771-7, 1984.

CASSIOLATO, A. M. R.; MELO, I. S.; CONUS, G. A. Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos por Streptomyces sp. In: REUNIAO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2., Piracicaba, 1987. Anais, Fundação Cargill, 1987. p.67.

CHANG, I. & KOMMEDHAL, T. Biological control of seedlings blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. Phytopathol., St. Paul. 58: 1395-401, 1968.

CHANG, V.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.

CHESTERS, C. G. C. & BULL, A. T. The enzymatic degradation of laminarin. I. The distribution of laminarase among microorganisms. Biochem. J., 86: 1963.

CHET, I. Cell interactions between Trichoderma spp and

- Rhizoctonia solani or Sclerotium rolfsii.
Phytoparasitica, Bel Dagan, 10: 122, 1982.
- CHET, I. & BAKER, R. Induction of supresseviness to Rhizoctonia solani in soil. Phytopathol., St. Paul, 70: 994-8, 1980.
- CHET, I.; ELAD, Y.; KALFON, A.; HADAR, I.; KATAN, J. Integrated control of soilborne and bulborne pathogens in pathogens iris. Phytoparasitica, Bel Dagan, 10: 229-36, 1982.
- CHET, I.; HADAR, Y.; ELAD, Y.; KATAN, J.; HENIS, Y. Biological control of soilborne plant pathogen by Trichoderma harzianum. In: SHIPPERS, B. & GAMS, W., ed. Soilborne plant pathogens. London, Academic Press, 1979. p. 585-91.
- COOK, J. R. & BAKER, K. F. The nature and pratice of biological control of plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983. 538p.
- DEACON, J. W. Studies on Pythium oligandrum an aggressive parasite of other fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., Londres, 66: 383-91, 1976.
- DEACON, J. W. & HENRI, C. M. Micoparasitism by Pythium oligandrum and Pythium acanthicum. Soil. Biol. Biochem., Elmsford, 10: 409-15, 1978.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma. I. Production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol, Soc., Londres, 57: 25-39, 1971a.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc., Londres, 57: 41-8, 1971b.
- DRECHESLER, C. Several species of Pythium peculiar in their sexual development. Phytopathol., St. Paul, 36: 781-864, 1946.
- DUTTA, B. K. Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent perspective for the control of Verticillium wilt. Plant and Soil, The Hague, 63: 781-864, 1981.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of Rhizoctonia solani in straswberry fields by

Trichoderma harzianum. Plant and Soil, The Hague, 60: 245-54, 1981.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. A selective medium for improving quantitative isolation of Trichoderma spp. from soil. Phytoparasitica, Bel Dagan, 9: 59-67, 1981.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by Trichoderma harzianum. Can. J. Microbiol., Ottawa, 28: 719-25, 1982.

ELAD, Y.; CHET, I.; BOYLE, P.; HENIS, Y. Parasitism of Trichoderma spp. on Rhizoctonia solani and Sclerotinia rofsii screening electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathol., St Paul, 73: 85-8, 1983.

FAULL, J. L. & CAMPBELL, R. Ultrastructure interaction between the take-all fungus and antagonistic bacteria. Can. J. Bot., Ottawa, 57: 1800-8, 1979.

FERREIRA, F.A. Principais doenças do eucalipto no estado de Minas Gerais. Viçosa, EPAMIG, 1985. 12P. (Boletim técnico, 23).

FOSCO MUCCI, E. S. & SHIMURA YOKOMIZO, N. K. Aspectos fitossanitários e de controle de doenças florestais. São Paulo,, Instituto Florestal, 1979. 23p. (Boletim técnico, 32).

FRAVEL, D. R.; MAROIS, J. J.; DUNN, M. T.; PAPAVIDAS, G. C. Compatibility of Talaromyces flavus, with potato seed piece fungicides. Soil. Biol. Biochem., Elmsford, 17: 163-6, 1985.

GARIBALDI, A. The use of suppressive soils as substrate for ornamental and flowering plants. Acta Horticulture, The Hague, 150: 103-11, 1983.

GOMEZ-NAVA, M.S. Combate del damping-off en similleros florestales. Bosques y fauna, México, 10: 62-8, s.d..

GOMEZ-NAVA, M. S.; SALINAS-QUINARD, R.; HERRERA-CAMPI, J. A. Antagonism bacteriano frente a Rhizoctonia solani Kunh y otras especies del genero. Mexico, Secretaria de Agricultura e Ganaderia. Subsecretaria Florestal y de la Fauna. Instituto de investigaciones Florestales, 1975. 49p. (Boletim técnico, 44).

GUPTA, R.C. & TANDON, R. N. Growth inhibition of fungi by volatiles from Streptomyces. Trans. Br. Mycol. Soc.,

Londres, 68: 438-9, 1977.

- HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of Rhizoctonia solani damping-off with wheat-bran culture of Trichoderma harzianum. Phytopathol., St. Paul, 69: 64-8, 1979.
- HADAR, Y.; HARMAN, G. E.; TAYLOR, A. G.; NORTON, J. M. Effects of pregermination of pea and cucumbers and seed treatment with Enterobacter cloacae on rots caused by Pythium spp. Phytopathol., St. Paul, 73: 1322-5, 1983.
- HALL, T.J.; SCHREIBER, L. R.; LEBEN, C. Effects of xylem-colonizing Bacillus spp. on Verticillium wilt in maples. Plant Disease, St. Paul, 70: 521-4, 1980.
- HARMAN, G.E.; CHET, I.; BAKER, R. Trichoderma hamatum effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by Pythium spp. or Rhizoctonia solani. Phytopathol., St. Paul, 70: 1167-72, 1980.
- HENIS, Y.; GHAFARR, A.; BAKER, R. Integrated control of Rhizoctonia solani Damping-off of radish effect of successive plantings, PCNB and Trichoderma harzianum on pathogen and disease. Phytopathol. St. Paul, 68: 900-7, 1976.
- HOMECHIN, M. Potencial e emprego de isolados brasileiros de Trichoderma harzianum, Rifai, para controle de patógenos de soja [Glicine max (L.) Merrill]. Piracicaba, 1987. 186 p. (Doutorado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).
- HOMECHIN, M. Produção e liberação de substâncias inibidoras de crescimento de patógenos, por Trichoderma harzianum. In: REUNIAO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., Piracicaba, 1986. Anais Campinas, Fundação Cargill, 1986. p. 68.
- HOWELL, C. R. Effect of Gliocladium virens on Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, and damping off cotton seedlings. Phytopathol., St. Paul, 72: 496-8, 1982.
- HSU, S.C. & LOCKWOOD, J. L. Mechanisms of inhibition of fungi in agar by Streptomyces. J. Gen. Microbiol., Londres, 57: 149-58, 1969.
- JAGER, G. & VELVIS, H. Biological control of Rhizoctonia solani on potatoes by antagonists. 4. Inoculation of

seed tubers with Verticillium biguttatum and other antagonists in field experiments. *Neth. J. Pl. Path.*, Wageningen, 91: 49-63, 1985.

KAO, C. W. & KO, W. H. Nature of suppression of Pythium splendens in a pasture soil in south Kohala, Hawaii. *Phytopathol.*, St. Paul, 73: 1284-9, 1983.

KEELING, B. L. Soybean seed rot and the relation of seed exudate to host susceptibility. *Phytopathol.*, St. Paul, 64: 1445-7, 1974.

KELLEY, W. D. Evaluation of Trichoderma harzianum impregnated clay granules as a biocontrol for Phytophthora cinnamomi causing damping-off pine seedlings. *Phytopathol.*, St. Paul, 66: 1023-7, 1976.

KERR, A. & HTAY, K. Biological control of crown gall through bacteriocin production. *Physiol. Plant Pathol.*, New York, 4: 37-44, 1974.

KRAFT, J. M. & PAPAIVIZAS, G. C. Use of host resistance Trichoderma and fungicides to control soilborne diseases and increase seed yields of peas. *Plant Disease*, St. Paul, 67: 1234-7, 1983.

KRUGNER, T. L. Doenças do eucalipto- Eucaliptus spp. In: GALLI, F. *Manual de Fitopatologia*. São Paulo, 1980. v.2., p 275-96.

KUNDU, P.K. & NANDI, B. Control of Rhizoctonia disease of cauliflower by competitive inhibition of the pathogen using organic amendments in soil. *Plant and Soil*, The Hague, 83: 357-62, 1985.

KUSTER, E. & WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of Streptomyces. *Nature*, Londres, 202: 928-9, 1964.

KUTER, G. A. & HOITINK, H. Use of combinations of microbial antagonists to suppress Rhizoctonia and Pythium damping-off in compost-amended container media. *Phytopathol.*, St. Paul, 75: 1344, 1985.

LEBEN, C. Influence of bacteria isolated from healthy cucumber leaves on two leaf diseases of cucumber. *Phytopathol.*, St. Paul, 54: 405-8, 1964.

LEWIS, J. A. & PAPAIVIZAS, G. C. Effect of micelial preparation of Trichoderma and Gliocladium on

- populations of Rhizoctonia solani and the incidence of damping-off. *Phytopathol.*, St. Paul, 75: 627, 1985 (a).
- LEWIS, J. A. & PAPAIVIZAS, G. C. Micoparasitism of Rhizoctonia solani by Trichoderma and Gliocladium in natural soil. *Phytopathol.*, St. Paul, 75: 627, 1985 (b).
- LEWIS, J. A. & PAPAIVIZAS, G. C. A new approach to stimulate population proliferation of [Trichoderma species and other potential fungi introduced into natural soils. *Phytopathol.*, St. Paul, 74: 1240-4, 1984a.
- LEWIS, J. A. & PAPAIVIZAS, G. C. Proliferation of Trichoderma from alginate pellets in natural soil and reduction of Rhizoctonia inoculum. *Phytopathol.*, St. Paul, 74: 836, 1984b.
- LIFSHITZ, R. & HANCOCK, J. C. An enrichment method to estimate potential seedling disease caused by low densities of Pythium ultimum inoculo in soils. *Plant Disease*, St. Paul, 65: 828-9, 1981.
- LIFSHITZ, R.; SNEH, B.; BAKER, R. Soil suppressiveness to a plant pathogenic Pythium species. *Phytopathol.*, St. Paul, 74: 1054-61, 1984.
- LIFSHITZ, R.; WINDHAM, M. T.; BAKER, R. Mechanism of control biological of preemergence damping-off pea seed treatment with Trichoderma spp. *Phytopathol.*, St. Paul, 76: 720-5, 1986.
- LIU, S. Y. & BAKER, R. Mechanism of biological control in infection in table beet seedlings by antagonistic microorganisms. *Phytopathol.*, St. Paul, 55: 986-9, 1965.
- LIU, S. & VAUGHAN, E. K. Control of Pythium infection in table beet seedlings by antagonistic microorganisms. *Phytopathol.*, St. Paul, 55: 986-9, 1965.
- LOCKWOOD, J. L. Soilborne plant pathogens: Concepts and connections. *Phytopathol.*, St. Paul, 76: 20-7, 1986.
- MACKEEN, C. D.; RELLEY, C. C.; PUSEY, P. L. production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to Monilinia fructicola from Bacillus subtilis. *Phytopathol.*, St. Paul, 76: 1336-9, 1986.

- MACLAREN, D. L.; HUANG, H.C.; RIMMER, S. R. Talaromyces flavus, an effective mycoparasite of Sclerotinia sclerotium. Phytopathol., St. Paul, 75: 1328, 1985.
- MARTIN, F. N. & HANCOCK, J. G. Relationship between soil salinity and population of Pythium ultimum in the San Joaquin Valley of California. Phytopathol., St. Paul, 71: 893, 1981.
- MARTIN, F. N. & HANCOCK, J. G. The effects of Cl- and Pythium oligandrum on the ecology of Pythium ultimum. Phytopathol., St. Paul, 72: 996, 1982.
- MARTIN, F. N. & HANCOCK, J. C. Factors affecting the colonization of crops residues by Pythium ultimum. Phytopathol., St. Paul, 73: 960, 1983.
- MARTIN, J. P. Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Science, Baltimore, 134: 1528-9, 1950.
- MARTIN, S. B.; ABAWI, G. C.; HOCH, H. C. Influence of the antagonist Laetisaria arvalis on infection of table beets by Phoma betae. Phytopathol., St. Paul, 74: 1092-6, 1984.
- MARTIN, S. B.; HOCH, H. C.; ABAWI, G. C. Population dynamics of Laetisaria arvalis and low-temperature in Pythium spp. infested and pasteurized beet soils. Phytopathol., St. Paul, 73: 1445-9, 1983.
- MELO, I. S. Interação entre Rhizoctonia solani e Trichoderma spp; relação entre antagonismo e controle de damping-off em beringela. In: REUNIAO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., Piracicaba, 1986. Anais. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p.63.
- MELO, I. S. & COSTA, C. P. Trichoderma pseudokoningii sua interação com hifas de Rhizoctonia solani. In: REUNIAO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., Piracicaba, 1986. p.62.
- MEREDITH, C. H. Soil actinomycetes applied to banana plants in the field. Phytopathol., St. Paul, 34: 983-7, 1944.
- MESHARAM, S. V. Suppressive effect of Azotobacter chroococcum on Rhizoctonia solani infestation of potatoes. Neth. J. Pl. Pathol., Wageningen, 90: 127-32, 1984.

- MEW, T. W. & ROSALES, A. M. Bacterization of rice plants for sheath blight control. *Phytopathol.*, St. Paul, 74: 836, 1984.
- MIHUTA, L. J. & ROWE, R. C. *Trichoderma* spp as biological control agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in Ohio muck soils. *Phytopathol.*, St. Paul, 74: 836, 1984.
- MITCHELL, R. & HURTWITZ, E. Suppression of *Pythium debaryanum* by lithic rhizosphere bacteria. *Phytopathol.*, St. Paul, 55: 156-8, 1965.
- MOORE, L. W. & WARREN, G. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. Review of *Phytopathol.*, 17: 163-79, 1979.
- NANDI, P. & SNEH, G. P. An antifungal substance from a strain of *Bacillus subtilis*. *Nature*, Londres, 172: 871-2, 1953.
- O'BRIEN, J. G.; BLANCHETTE, R. A.; SUTHERLAND, J. B. Assessment of *Streptomyces* spp from elms for biological control of "Dutch Elm disease". *Plant Disease*, St Paul, 68: 104-6, 1984.
- ODIGIE, E. & IKOTUN, T. In vitro and in vivo inhibition of growth *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. by antagonistic microorganisms. *Fitopatologia Brasileira*, Brasilia, 7: 157-67, 1982.
- ODVODY, G. N.; BOOSALIS, M. G. KERR, E. D. Biological control of *Rhizoctonia solani* with a soil-inhabiting basidiomycete. *Phytopathol.* St. Paul, 70: 655-8, 1980.
- OLD, M.K. Fungistatic effects of soil bacteria on root-rotting fungi with particular reference to *Helminthosporium sativum*. *Phytopathol.* St. Paul, 55: 901-5, 1965.
- OLIVEIRA, V. L.; BELLEI, M. M.; BORGES, A. C. Control of white rot of garlic by antagonistic fungi under controlled environmental. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 30: 884-9, 1984.
- OLSEN, C. M. & BAKER, K. F. Selective heat treatment of soil and its effect on the inhibition of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Phytopathol.*, St. Paul, 58: 79-87, 1968.

- OUF, M. F.; MAHMOUDS, A. Z.; ABDEL-NASSER, M.; EL-ADAWY, A.
Interaction between rhizosphere microflora and Fusarium
inducing wilt of tomato Zbl. Bakt. II. Abt., 136: 205-7,
1981a.
- OUF, M. F.; MAHMOUDS, A. Z.; ABDEL-NASSER, M.; EL-ADAWI,
A. Interaction between rhizosphere microflora and
Fusarium wilt of tomato. Zbl. Bakt. II. Abt., 136: 225-
7, 1981b.
- OUF, M. F.; MAHAMUODS, A. Z.; ABDEL-NASSER, M.; EL-ADAWI, A.
Effect of inoculation with antagonistic microorganisms on
severity of Fusarium wilt on tomato and watermelon.
Zbl. Bakt. II. Abt., 136: 341-3, 1981c.
- PAPAVIZAS, G. C. Survival of Trichoderma harzianum in soil
and in pea and bean rhizosphere. Phytopathol., St.
Paul, 71: 121-5, 1981.
- PAPAVIZAS, G. C. Survival of Trichoderma harzianum in soil
and in pea and bean rhizospheres Phytopathol., St
Paul, 72: 121-2, 1982.
- PAPAVIZAS, G. C. Trichoderma and Gliocladium: biology,
ecology, and potential for biocontrol. Ann. Rev.
Phytopathol., Palo Alto, 23: 23-54, 1985.
- PARMETER-JUNIOR, J. R.; SHERWOOD, R.T.; PLAT, W. D.
Anastomosis grouping among isolates of Thanatephorus
cucumeris. Phytopathol. St. Paul, 59: 1270-8, 1969.
- PARMETER-JUNIOR, J. R. & WHITNEY, H.S. Taxonomy and
nomenclature of the imperfect state. In: Rhizoctonia
solani, biology and pathology. Berkeley, University
of California, 1970. p.7-19.
- PHILLIPS, D. V.; LEBEN, C.; ALLISON, C.C. A mechanism for
the reduction of Fusarium wilt by a Cephalosporium
species. Phytopathol. St. Paul, 57: 916-9, 1967.
- PUSEY, P. L. & WILSON, C. L. Postharvest biological control
of stone fruit brown rot by Bacillus subtilis. Plant
Disease, St. Paul, 69: 753-756, 1984.
- RAM REDDY, M. Damping-off in conifer nurseries in Indian.
Indian J., New Delli, 95: 475-9, 1969.
- RANDHAWA, P. S. & SCHAAD, N. W. Bacterial antagonistic to
bacterial and fungal pathogen. Phytopathol., St. Paul,
74: 863-4, 1984.

- REIS, M. S. & CHAVES, G. M. Estudo da etiologia e controle químico de tombamento de mudas de eucalipto (Eucaliptus) incitado pelo fungo Cylindrocladium scoparium Morgan. Ciência e Cultura, São Paulo, 17: 203-4, 1965.
- RICHARDSON, L. T. The persistence of thiram in soil and relationship to microbial balance and damping-off control. Can. J. Botany., Ottawa, 32: 335-46, 1954.
- ROBBS, C. F. Potencialidades de bactérias no biocontrole de doenças de plantas. In: REUNIAO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., Piracicaba, 1986. Anais. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p.17-23.
- ROBERTS, W. P.; TATE, M. E.; KERR, A. Agrocin 84 is a 6-n-phosphoramidate of an adenine nucleotide analogue. Nature, Londres, 27: 379-81, 1977.
- ROVIRA, A. D. & CAMPBELL, R. A. Scanning electron microscopy study of interactions between micro-organisms and Gaeumannomyces graminis (Syn. Ophiobolus graminis) on wheat roots. Microbiol. Ecol., New York, 2: 177-85, 1975.
- SAKSENA, H. K. & VAARTAJA, O. Taxonomy, morphology and pathogenicity of Rhizoctonia species from forest nurseries. Can. J. Bot., Ottawa, 39: 627-47, 1961.
- SCHREIBER, L. R. & HOCH, W. K. Effects of benomil and thiabendazol on growth of several plant species. J. Am. Soc. Hortc. Sci., Geneva, 100: 309-13, 1975.
- SCHROTH, M. N. & COOK, J. Seed exudation and its influence on pre-emergence damping-off of bean. Phytopathol., St. Paul, 54: 670-3, 1964.
- SHERWOOD, R. T. Morphology and physiology in four anastomosis groups of Thanatephorus cucumeris. Phytopathol., St. Paul, 59: 1924-9, 1969.
- SHORT, G. E. & LACY, M. L. Factors affecting pea seed and seedling rot in soil. Phytopathol., St. Paul, 66: 188-92, 1986.
- SINGH, P. J. & MEHROTRA, R. S. Biological control of Rhizoctonia bataticola on gram by coating seed with Bacillus and Streptomyces spp and their influence on plant growth. Plant and soil, The Hague, 56: 475-83, 1980.
- SIVAN, A. & CHET, I. Biological control of Pythium by

- Trichoderma. Phytoparasitica, Bel Dagan, 10: 18, 1982.
- SIVAN, A.; ELAD, Y.; CHET, I. Biological control effects of a new isolate of Trichoderma harzianum on Pythium aphanidermatum. Phytopathol, St. Paul, 74: 498-501, 1984.
- SIVAN, A.; UCKO, O.; CHET, I. Biological control of Fusarium crown rot root of tomato by Trichoderma harzianum under field conditions. Plant Disease, St. Paul, 71: 587-92, 1987.
- SIVASITHAMPARAM, K. & PARKER, C. A. Effects of certain isolates of bacteria and actinomycetes on Gaeumannomyces graminis var. tritici and take-all of wheat. Aust. J. Bot., Melbourne, 26: 773-82, 1978.
- SMITH, G. E. Inhibition of Fusarium oxysporum lycopersici by species of Micromonospora isolated from tomato. Phytopathol., St. Paul, 47: 429-32, 1957.
- SNEH, B.; DUPLER, M.; ELAD, Y.; BAKER, R. Chlamydospore germination of Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum as affected by fluorescent and litic bacteria from a Fusarium-suppressive soil. Phytopathol., St. Paul, 74: 115-24, 1984.
- SNEH, B.; HUMBLE, S. J.; LOCKWOOD, J. L. Parasitism of oospores of Phytophthora megaspermae var. soiae, P. cactorum, Pythium sp and Aphanomyces euteiches in soil by oomycetes, chytridiomycetes, hyphomycetes, actinomycetes and bacteria. Phytopathol., St. Paul, 67: 622-8, 1977.
- SOBERS, E. K. Calonectria floridana sp. nov. the perfect stage of Cylindrocladium floridanum. Phytopathol., St. Paul, 59: 364-66, 1969.
- SOBERS, E. K. & SEYMOUR, C. P. Cylindrocladium floridanum spn. associated with decline of peach trees in Florida. Phytopathol., St. Paul, 57: 389-93, 1967.
- STENPHENS, C. T.; POWELL, C. C.; SCHMITTHENERR, A. F. A method of evaluating post emergence damping-off pathogens of breedings plants. Phytopathol., St. Paul, 71: 1225-8, 1981.
- STESSEL, G. J.; LEBEN, C.; KEITT, G. W. Partial purification and properties of the antifungal antibiotic toximycin. Phytopathol., St. Paul, 43: 23-6, 1953.

- STRASHNOW, Y.; ELAD, Y.; SIVAN, A.; CHET, I. Integrated control of Rhizoctonia by methyl bromide and Trichoderma harzianum. Plant Pathol. 34: 146-51, 1985.
- SHUTERLAND, J. B. & CRAWFORD, D. L. Actinomycetes in discolored wood of living silver maple. Can. J. Bot., Ottawa, 59: 1-7, 1981.
- THAYSEN, A. C. & BUTLIN, K. R. Inhibition of the development of Fusarium oxysporum cubense by a growth substance produced by Meredith's actinomycetes. Nature, Londres, 156: 781-2, 1945.
- THIES, W. F. & PATTON, R. F. An isolation of Cylindrocladium scoparium in soil by direct isolation. Phytopathol., St. Paul, 69: 599-601, 1979.
- THIRUMALACHAR, M. J. Thecnic for screenig chemicals and biocontrol agents root disease inciting fungi. Phytopathol., St. Paul, 73: 962, 1983.
- TSCHUDI, S. & KERN, H. Specific lysis of the mycelium of Gaeumannomyces graminea by enzymes of Streptomyces lavendulae. In: SCHIPPERS, B. & GAMS, W. Soilborne Plant Pathogens, Londres, Academic Press, 1979 .p611-15.
- TU, J. C. & VAARTAJA, O. The efect the hyperparasite (Gliocladium virens) on Rhizoctonia solani and on Rhizoctonia root rot of white beans. Can. J. Bot., Ottawa, 59: 22-7, 1981.
- TVEITT, M. Control of a seed-borne disease by Chaetomium cochlioides Pall, under natural conditions. Nature, Londres, 172: 39, 1953.
- TVEITT, M. & WOOD, R. K. S. The control of Fusarium blight in oat seedlings with antagonistics species of Chaetomium. Ann. Appli. Biol., Cambridge, 43: 538-52, 1955.
- VAARTAJA, O. Damping-off pathogens in south Australian nurseries. Phytopathol., St. Paul, 57: 765-8, 1967.
- VAARTAJA, O.; CRAM, W. H.; MORGAN, G. A. Damping-off etiology especially in forest nurseries. Phytopathol., St. Paul, 51: 35-42, 1961.
- VAN DEN BOOGERT, P. H. J. F. & JAGER, G. Biological control of Rhizoctonia solani on potatoes by antagonists. 3. Inoculation of seed potatoes with biferent fungi.

- Neth. J. Pl. Path., Wageningen, 90: 117-26, 1984.
- VELVIS, H. & JAGER, G. Biological control of Rhizoctonia solani on potatoes by antagonists; 1. preliminary experiments with Verticillium, a sclerotium inhabiting fungus. Neth. J. Pl. Path., Wageningen, 89: 113-23, 1983.
- VENKATASUBBAIA, P. & SAFEULLA, K. M. Aspergillus niger for biological control of Rhizoctonia solani on coffee seedlings. Tropical Pest Management, Londres, 30: 401-6, 1984.
- VESELY, D. Use of Pythium oligandrum to protect disease sugar beet. In: SCHIPPERS, B. & GAMS, W. Soilborne Plant Pathogens, Londres, Academic Press, 1979.
- WEBSTER, J. & LOMAS, N. Does Trichoderma viride produce gliotoxin and viridin? Trans. Br. Mycol. Soc., Londres, 47: 535-40, 1964.
- WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of Trichoderma lignorum on Rhizoctonia solani and other fungi. Phytopathol., St. Paul, 24: 1153-79, 1934.
- WEINDLING, R. Experimental consideration of the mold toxins of Gliocladium and Trichoderma. Phytopathol., St. Paul, 31: 991-1003, 1941.
- WEINDLING, R. & FAWCETT, T. Experiments in the control of rhizoctonia damping-off of citrus seedlings. Hilgardia, Berkeley, 10: 1-6, 1936.
- WEINHOLD, A. R.; BOWMAN, T.; DODMAN, R. L. Virulence of Rhizoctonia solani as affected by nutrition of the pathogen. Phytopathol., St. Paul, 59: 1601-5, 1969.
- WELLS, H. D.; BELL, D. K.; JAWROSKI, C. A. Efficacy of Trichoderma harzianum as a biocontrol for Sclerotium rolfsii. Phytopathol., 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. Can. J. Microbiol., Ottawa, 615-20, 1970.
- WIJETUNGA, C. & STACK, R. W. Survival curves to evaluate biological control of Rhizoctonia solani by Trichoderma harzianum. Phytopathol., St. Paul, 74: 862, 1984.

ZOGG, H. & JAGGI, W. Studies on the biological soil disinfection; VII Contribution to take wall decline Gaeumannomyces graminis inhibited be means of laboratory trials on some of its possible mechanism. Phytopathol. Z., Berlin, 81: 160-9, 1974.

8. APÊNDICE

Tabela 1. Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação do efeito antagonico de isolados de bactérias e actinomicete a *Rhizoctonia solani* e *Cylindroccladium scoparium* em meio de BDA (teste de difusão) Piracicaba - SP. 1986 1/

Causa de variação	<i>Cylindroccladium scoparium</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>	
	GI	Q.M.	GI	Q.M.
Isolados	4	2455.4279**	5	1834,6886**
Resíduo	15	09,5397	18	26,5027
Total	19		23	
Coeficiente de variação %	A 1,84		B 11,27	

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

1/ Dados transformados em arcsen $\sqrt{\%}$.

Tabela 2. Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Cylindrocaldium scoparium* por isolados de bactérias e actinomicete (teste de incorporação) Piracicaba - SP, 1986.1/

Causa de variação	<i>Cylindrocaldium scoparium</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>	
	GI	Q.M.	GI	Q.M.
Isolados	4	3567,4723**	5	1586,6835**
Resíduo	15	21,1835	18	6,7329
Total	19		23	
Coeficiente de variação %	A 2,59		B 8,38	

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

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

Tabela 3. Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficiente de variação do efeito antagonístico de isolados de *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma aureoviride*, *Penicillium variabile* e *Penicillium verruculosum* à *Rhizoctonia solani* e *Cylindrocladium scoparium*, em meio de BDA. Piracicaba-SP, 1986.1/

Causa de variação	<i>Cylindrocladium scoparium</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>	
	GI	Q.M.	GI	Q.M.
Isolados	9	1011,3227**	10	1583,3028**
Resíduo	27	1,1539	33	16,0679
Total	35		43	
Coeficiente de variação % A	2,39		8	7,12

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

1/ Dados transformados em arcsen $\sqrt{\%}$.

Tabela 4. Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação da percentagem de reutção do crescimento micelial de *Bizocetonia solani* e *Cylindrocyladium scoparium* por substâncias inibidoras produzida por diferentes isolados de *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma harziarum*, *Trichoderma aureoviride*, *Penicillium variabile*, e *Penicillium verruculosum*, em meio de malte (teste de membrana de diálise) Piracicaba-SP, 1986. 1/

Causa de variação	<i>Cylindrocyladium scoparium</i>		<i>Bizocetonia solani</i>	
	GI	Q.M.	GI	Q.M.
Isolados	8	359,80000**	9	2263,1467**
Resíduo	27	7,5035	33	34,1570
Total	35		43	
Coefficiente de variação %	A 6,35		B 23,05	

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

1/ Dados transformados em arcsen $\sqrt{\%}$.

Tabela 5. Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação do efeito dos isolados antagonísticos de fungos, bactérias e actinomicetes e do fungicida benomil no ataque de *Rhizoctonia solani* e *Cylindrocyladium scoparium* em pré-mergência. Teste realizado em laboratório. Piracicaba-SP, 1987.1/

Causa de variação	<i>Cylindrocyladium scoparium</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>	
	GI	O.M.	GI	O.M.
Tratamentos	13	488,4530**	16	389,5812**
Resíduo	42	27,1456	51	32,8960
Total	55		67	
Coeficiente de variação %	A 7,96		B 13,77	

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

1/ Dados transformados em arcsen $\sqrt{\%}$.

Tabela 6. Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação do efeito de isolados de fungos, bactérias e actinomicete e do fungicida benomil, no ataque de *Rhizoctonia solani* e *Cylindrocladium scoparium* em pós-emergência. Teste realizado em casa-de-vegetação. Piracicaba-SP, 1987.1/

Causa de variação	<i>Cylindrocladium scoparium</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>	
	GI	Q.M.	GI	Q.M.
Tratamentos	13	1389,4834**	16	331,0854**
Resíduo	42	19,9257	51	1,8705
Total	55		67	
Coeficiente de variação %	A 13,87		B 3,80	

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

1/ Dados transformados em arcsen $\sqrt{\%}$.

Tabela 7. Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação da percentagem de inibição do crescimento micelial de isolados de *Ichthyodectma pseudokoningii*, *Ichthyodectma auceoyticide*, *Ichthyodectma barzianum*, *Penicillium variabile* e *Penicillium verruculosum*, em meio de BDA, contendo diferentes concentrações de captan, iprodione e procymidone.

Causa de variação	Captan		Iprodione		Procymidone	
	GI	O.M.	GI	O.M.	GI	O.M.
Tratamentos	49	3322,1315**	49	3861,3788**	49	2841,5329**
Isolados (I)	9	8320,3568**	9	1831,1885**	9	3404,6886**
Doses (D)	4	12966,1645**	4	42008,8645**	4	25201,1817**
Interação (IxD)	36	1001,0159**	36	130,3169**	36	216,3385**
Resíduo	150	1,0167	150	0,5156	150	0,1906
Total	199		199		199	
Coeficiente de variação %	A 3,80		B 1,19		C 0,92	

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

1/Dados transformados em $\arcsen \sqrt{\%}$.

Tabela 8. Valores e significâncias dos quadrados médios e coeficientes de variação da influência de diferentes concentrações dos fungicidas captan e procymidone na esporulação de isolados de Irichoderma pseudokoningii, Irichoderma harzianum, Irichoderma aureoviride, Penicillium variable e Penicillium verruculosum em meio de BDA. Piracicaba-SP, 1987.17

Causa de variação	Captan		Procymidone	
	GL	Q.M.	GL	Q.M.
Tratamentos	49	354,1230**	49	388,6624**
Isolados (I)	9	151,3760**	9	73,2475**
Doses (D)	4	3708,3091**	4	4299,6860**
Interação (IxD)	36	32,1225**	36	32,9575**
Resíduo	150	0,622	150	0,3997
Total	199		199	

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

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