

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

ASSOCIAÇÃO DE *Trichoderma* sp. E FUNGICIDAS NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

**Juliana Dalmagro Pandolfo
Bióloga – ULBRA**

**Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade**

**Porto Alegre (RS) Brasil
Abril de 2007**

FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO

AGRADECIMENTOS

À professora Aida Teresinha Santos Matsumura, pela orientação, sobretudo, pelo incentivo e amizade fundamentais durante todo o curso, além das sugestões que contribuíram na concretização dessa dissertação.

Ao professor Miguel Dalmo de Menezes Porto, por toda ajuda e pela disponibilidade.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade da UFRGS, pela disponibilidade e ensinamentos que auxiliaram durante a realização desta pesquisa.

Aos amigos do de laboratório Isabel Padula Paz, Márcia Eloísa da Silva, Marcus Almança e Rita Madail Santin pela amizade e assistência na condução deste trabalho.

À secretária do Programa de Pós-Graduação, Marisa Carvalho Bello, pela atenção dispensada em todo o período

Aos meus pais, Julio César Pandolfo e Maria Elizabete Pandolfo, pelo apoio e incentivo indispensáveis e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu tio Sérgio Dalmagro por toda ajuda indispensável para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado Felipe Koch Machado, por todo amor, apoio e compreensão.

Às minhas amigas Alice Fogaça Monteiro e Andréa Fogaça Monteiro, pelo apoio, pelas conversas e risadas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

ASSOCIAÇÃO DE *Trichoderma* sp. E FUNGICIDAS NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.¹

Autor: Juliana Dalmagro Pandolfo
Orientador: Dr^a. Aida Teresinha Santos Matsumura
Co-Orientador: Dr. Miguel Dalmo de Menezes Porto

RESUMO

Avaliou-se, por testes *in vitro*, a fungitoxicidade dos produtos Cabrio Top, Captan SC, Comet, Derosal 500, Derosal Plus, Frownicide 200 SC, Nativo, Opera, Stratego e Vitavax-Thiram 200 SC em isolados de *Trichoderma* sp. (T1R, T2R, T4R, T6R, T7R, TSV e PCT). Os fungicidas foram adicionados em meio de cultura BDA e em discos de papel filtro na dosagem recomendada pelo fabricante, metade e dobro desta dose. Os tratamentos foram mantidos a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 horas. Após sete dias de incubação foi medido o diâmetro da colônia dos fungos na presença dos fungicidas e o halo de inibição formado em torno do disco de papel filtro. Os fungicidas Cabrio Top, Captan SC, Comet, Stratego e Vitavax-Thiram 200 SC não se mostraram tóxicos aos isolados. O isolado T4R foi o menos sensível aos fungicidas e os isolado T6R e PCT foram os mais sensíveis. Avaliou-se também, a fungitoxicidade *in vitro* destes mesmos defensivos agrícolas a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, agente causal da murcha do feijoeiro e o potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* sp. ao fitopatógeno. Os fungicidas, Derosal 500, Derosal Plus, Nativo, Opera e Vitavax-Thiram 200 SC foram efetivos no controle de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro*. Experimentos *in vitro*, testando o potencial antagônico dos isolados T4R, TSV e PCT de *Trichoderma* sp. ao fitopatógeno mostraram que os isolados são efetivos no controle de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* quando inoculados 48 horas antes e simultaneamente com o fitopatógeno. Em experimento de casa de vegetação, sementes de feijão foram tratadas com os fungicidas Vitavax-Thiram 200 SC e Derosal Plus, com os isolados T4R, TSV e PCT e com o fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Somente o isolado TSV foi efetivo no controle do fitopatógeno. Todos os isolados de *Trichoderma* sp. foram recuperados de raízes de plantas cujas sementes foram tratadas com fungicidas.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (67 p). Fevereiro, 2007

ASSOCIATION OF *Trichoderma* sp. AND FUNGICIDES IN THE CONTROL OF
Fusarium oxysporum f.sp. *phaseoli*

Author : Juliana Dalmagro Pandolfo
Advisor : Dra. Aida Teresinha Santos Matsumura
Co-Advisor : Dr. Miguel Dalmo de Menezes Porto

ABSTRACT

The fungitoxicity of the products Cabrio Top, Captan SC, Comet, Derosal 500, Derosal Plus, Frownicide 200 SC, Nativo, Opera, Stratego and Vitavax-Thiram200 SC was evaluated through *in vitro* tests in strains of *Trichoderma* sp. (T1R, T2R, T4R, T6R, T7R, TSV and PCT). The fungicides were added in a PDA culture medium and on discs of filter paper following manufactures recommended dosages, half and the double of this dose. The treatments were maintained at $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ and at a photophase of 14 hours. After 7 days of incubation the diameter of the fungus colony in the presence of fungicides and the halo of inhibition formed around the disc of paper filter were measured. The fungicides Cabrio Top, Captan SC, Comet, Stratego and Vitavax-Thiram 200 SC were not toxic towards the isolates. The isolate T4R was less sensitive towards the fungicide while the isolates T6R and PCT were the most sensitive ones. The fungitoxicity *in vitro* of these same agricultural defensives towards *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (the casual agent of Fusarium Wilt and the antagonistic potential of the isolates of *Trichoderma* sp. towards the pathogen) was evaluated. The fungicides Derosal 500, Derosal Plus, Nativo, Opera and Vitavax-Thiram 200 SC were effective in the control of *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro*. Experiments *in vitro*, testing the antagonistic potential of the isolates T4R, TSV and PCT of *Trichoderma* sp. towards the pathogen have shown that the isolates are effective in the control of *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* when inoculated before 48 hour period and simultaneously with the pathogen. In experiment in greenhouse bean seeds were treated with the fungicides Derosal Plus and Vitavax-Thiram200 SC with the isolates T4R, TSV and PCT and with the pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Only the isolated TSV was effective in the control of the pathogen. All isolated of *Trichoderma* sp. Tested they had been recouped of roots of plants whose seeds had been with fungicides.

¹Master of Science in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (67p.). February, 2007.

SUMÁRIO

	Páginas
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	
1 Revisão Bibliográfica.....	4
1.1 A cultura: Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	4
1.2 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	5
1.3 O fungo <i>Trichoderma</i> sp.....	6
1.4 Controle químico.....	12
1.5 Controle biológico.....	15
1.6 Manejo integrado.....	16
CAPÍTULO II	
2 Compatibilidade de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. com diferentes fungicidas.....	19
2.1 Introdução.....	19
2.2 Materiais e Métodos.....	20
2.2.1 Experimentos em laboratório.....	20
2.2.1.1 Obtenção dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp.....	23
2.2.1.2 Interferência <i>in vitro</i> de fungicidas no crescimento dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp.....	24
2.3 Resultados e Discussão.....	26
2.3.1 Interferência <i>in vitro</i> de fungicidas no crescimento de isolados de <i>Trichoderma</i> sp.....	26
CAPÍTULO III	
3 Efeito de fungicidas sobre o desenvolvimento de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> e interação destes com <i>Trichoderma</i> sp.....	37
3.1 Introdução.....	37
3.2 Materiais e Métodos.....	38
3.2.1 Testes em laboratório.....	41
3.2.1.1 Obtenção de isolados de <i>Trichoderma</i> sp.....	41
3.2.1.2 Obtenção e multiplicação do inóculo de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	42
3.2.1.3 Avaliação do potencial antagônico de <i>Trichoderma</i> sp. a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em meio BDA.....	42
3.2.1.4 Interferência <i>in vitro</i> de fungicidas no crescimento de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	43

	Páginas
3.2.2 Testes em casa de vegetação.....	44
3.2.2.1 Produção do inóculo de <i>Trichoderma</i> sp.....	45
3.2.2.2 Produção do inóculo de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	45
3.2.2.3 Esterilização do substrato.....	46
3.2.2.4 Montagem do experimento.....	46
3.3 Resultados e Discussão.....	49
3.3.1 Avaliação do potencial antagônico de <i>Trichoderma</i> sp. a <i>F.</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> em meio BDA.....	49
3.3.2 Interferência in vitro de fungicidas no crescimento de <i>F.</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	50
3.3.3 Experimentos em casa de vegetação.....	55
4 CONCLUSÕES	59
5 SUGESTÕES	61
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO II

	Páginas
1. Doses recomendadas dos fungicidas utilizados.....	24
2. Diâmetro (cm) de colônias dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. em meio de cultura contendo fungicidas.....	27
3. Halo de inibição (cm) de colônias de <i>Trichoderma</i> sp. em meio de cultura contendo discos de papel filtro impregnados com fungicida	33

CAPÍTULO III

1. Doses recomendadas dos fungicidas utilizados.....	44
2. Médias originais do crescimento de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> inoculados 48h antes, simultaneamente e 48h após a inoculação de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. em meio de cultura.....	50
3. Diâmetro (cm) do crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> em meio de cultura contendo diferentes fungicidas.....	52
4. Halos de inibição do crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> em meio de cultura contendo discos de papel filtro impregnados com diferentes fungicidas.....	53
5. Influência dos tratamentos realizados no experimento em casa de vegetação sobre as plantas de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	55

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO II

	Páginas
1. Experimento <i>in vitro</i> . Placa de Petri contendo meio de cultura BDA; de um lado da placa se encontra um disco de papel filtro de 0,6 cm de diâmetro, embebido com solução fungicida (A). Do lado oposto está um disco de 0,6 cm de diâmetro contendo colônia do fungo <i>Trichoderma</i> sp.(B).....	25
2. Desenvolvimento <i>in vitro</i> do isolado TSV na presença da dose recomenda, meia dose e dobro da dose do fungicida Vitavax-Thiram 200 SC em maio de cultura BDA.....	29
3. Desenvolvimento <i>in vitro</i> do isolado PCT na presença da dose recomenda, meia dose e dobro da dose do fungicida Derosal 500 em meio de cultura BDA.....	30
4. Micélio dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. na presença da dose recomendada do fungicida Frowncide 500 SC em BDA (1). Isolados PCT, T1R e T2R em: Testemunha (A), dose recomendada de Frowncide 500 SC (B), meia dose de Frowncide 500 SC (C), dobro da dose de Frowncide 500 SC (D).....	31
5. Isolados T4R, T6R, T7R e TSV em: Testemunha (A), dose recomendada de Frowncide 500 SC (B), meia dose de Frowncide 500 SC (C), dobro da dose de Frowncide 500 SC (D).....	32

CAPÍTULO III

	Páginas
1. Inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> em arroz após 14 dias de incubação.....	46
2. Experimento montado em casa de vegetação. Copos plásticos contendo mistura de areia e vermiculita. Cada tratamento teve quatro repetições.....	48
3. <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> na presença de três doses do fungicida Derosal Plus, depois de sete dias de incubação.....	51

4. Plantas cujas sementes foram tratadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> e com o isolado PCT.....	56
5. Isolado de <i>Trichoderma</i> sp. T4R em <i>Trichoderma seletive médium</i> , recuperados de raízes de plantas que tiveram suas sementes tratadas com Derosal Plus (300 mL / 100 kg de sementes) e com o presente isolado.....	57

INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) desempenha um importante papel na alimentação humana, constituindo a principal fonte de proteína vegetal. O Brasil situa-se entre os principais produtores mundiais de feijão, sendo superado apenas pela Índia, que devido à sua maior área cultivada, ocupa o primeiro lugar.

O feijoeiro comum é cultivado durante todo o ano, o que faz com que inúmeros fatores tornem-se limitantes para a sua produção. Dentre os mais importantes fatores da queda de produtividade no feijoeiro encontram-se as doenças, que podem provocar perdas de até 100%, diminuindo as qualidades fisiológicas, nutricionais e sanitárias do produto colhido, afetando o preço de sua comercialização.

A murcha ou amarelecimento de fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder tem sido relatada em vários países e, no Brasil o primeiro relato foi realizado por Cardoso et al. (1966) na região de Laranjal Paulista, SP. Atualmente, a murcha de fusarium encontra-se disseminada em todas as regiões produtoras de feijão do país. Este fungo é um habitante do solo, vive saprofiticamente na matéria orgânica e em restos culturais infectados, podendo sobreviver ainda, por vários anos, na forma de clamidósporos. Sua disseminação se dá através de implementos agrícolas, água de irrigação, animais, sementes contaminadas, etc...

O controle da murcha de fusarium pode ser feito, através de práticas culturais, resistência genética das plantas e uso de fungicidas. O controle químico deve ser utilizado

preferencialmente no tratamento de sementes a fim de proteger a plântula no seu estágio inicial. Porém, o controle de doenças, atualmente, está sendo direcionado para medidas que causem o menor impacto possível, tanto do ponto de vista do meio ambiente, quanto à contaminação do ser humano. As medidas devem analisar o agroecossistema como sendo dinâmico e, portanto, todas as interferências levam para alguma consequência. Então o manejo integrado de doenças, e não a utilização de medidas isoladas mostra-se como a forma mais pertinente.

Em programas de manejo integrado deve-se considerar o controle microbiano como um importante fator de redução da densidade populacional de agentes patogênicos. A utilização de produtos químicos quando associados fungos antagonistas pode aumentar a eficiência no controle e também reduzir a quantidade de defensivos agrícolas.

Atualmente, diversas substâncias são empregadas no controle de doenças, sendo os fungicidas um grupo numeroso e destacado. Entretanto, as consequências de sua utilização não são unicamente positivas, pois, muitos desses compostos químicos são nocivos ao meio ambiente.

O controle integrado, com a utilização de produtos fitossanitários seletivos em conjunto com fungos que agem como agentes de controle biológico, pode ser uma estratégia mais segura e eficiente. Porém, alguns produtos fitossanitários podem afetar o crescimento vegetativo, a viabilidade e a conidiogênese dos fungos antagonistas, ou até alterar sua composição genética.

A maioria dos relatos sobre o uso de antagonistas para o controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos apresenta o *Trichoderma* sp. como um dos mais promissores entre os agentes de biocontrole. No entanto, poucos trabalhos têm sido realizados a propósito da seleção de biótipos compatíveis com fungicidas, em agentes de biocontrole, para seu uso no manejo integrado de doenças.

A seleção de biótipos de *Trichoderma* sp. compatíveis com fungicidas para serem utilizados em combinação é uma opção para se obter uma estratégia de controle efetivo que envolve pesquisas biológicas e químicas no controle integrado de um ou mais fitopatógenos. Esporos e micélios de isolados resistentes podem ser usados em conjunto com fungicidas para tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo.

A hipótese desta pesquisa é a de que existem diferentes graus de tolerância fungicidas em isolados de *Trichoderma* sp. e que este apresenta potencial de controle a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Atualmente no Brasil, ainda são escassos os trabalhos visando a seleção de isolados de *Trichoderma* sp. compatíveis com defensivos agrícolas e seu uso no manejo integrado de doenças. Com isto, a presente pesquisa teve por objetivos: (i) a avaliação *in vitro* do desenvolvimento de isolados de *Trichoderma* sp. na presença de fungicidas; (ii) verificação do antagonismo dos isolados de *Trichoderma* sp contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli in vitro*; (iii) avaliação *in vivo*, do potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* sp. a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, na presença e na ausência dos fungicidas.

CAPÍTULO I

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A cultura: Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada no gênero *Phaseolus* que pertence a ordem Fabales e família Fabaceae. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais do gênero *Phaseolus*. Entretanto, a produção brasileira de feijão tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno, devido à redução da área plantada, da ordem de 35%, nos últimos 17 anos. Cerca de 60% da produção brasileira é proveniente de agricultura de mão de obra familiar (Magalhães, 2005).

O feijão exerce um importante papel na alimentação da população brasileira. As sementes dessa leguminosa constituem-se na principal fonte de proteína de origem vegetal, principalmente para população de baixa renda, fornecendo ainda ferro, carboidratos e fibras (Lima et al., 2003).

O feijoeiro comum é uma planta exigente em nutrientes, muito sensível a fatores climáticos extremos como alta ou baixa umidade do solo, alta ou baixa temperatura do ar, além de ser conhecido como planta muito suscetível à doenças e pragas. A própria arquitetura da planta é deficiente e tem, por exemplo, um sistema radicular limitado. Pesquisas realizadas nos últimos anos, em especial sobre manejo da cultura e melhoramento, projetaram o feijão como uma cultura economicamente viável, cultivada em extensas áreas na época seca, em especial quando se aplica alta tecnologia como cultivares melhoradas,

preparo adequado do solo, controle efetivo de ervas daninhas, doenças e pragas e técnicas avançadas de irrigação (Portes, 1996).

A ocorrência de determinados patógenos nas sementes, mesmo em taxas relativamente baixas, pode gerar grandes perdas na produção, como é o caso de *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli*, agente etiológico da murcha ou amarelecimento de fusarium em feijoeiro (Costa et al., 2003).

1.2 *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli*

Fusarium oxysporum f. sp *phaseoli* é um fungo que pertence ao Filo Ascomycota e a ordem Hypocreales. O micélio é incolor no início, mas com idade torna-se colorido, amarelo pálido, cor-de-rosa pálido, ou um tanto púrpura. O fungo produz três tipos de esporos assexuados. Os microconídios, os quais têm uma ou duas células, são os esporos mais freqüentes e abundantes produzidos sob todas as circunstâncias, mesmo dentro de plantas infectadas. Os macroconídios são os esporos típicos de *Fusarium* sp., têm de três a cinco células e possuem extremidades gradualmente curvadas. Os clamidósporos possuem uma ou duas células, são esporos redondos produzidos no meio ou na ponta de um micélio mais velho ou em um macroconídio. Os três tipos de esporos são produzidos nas culturas do fungo e provavelmente no solo, embora somente os clamidósporos possam sobreviver no solo por um longo tempo (Agrios, 2004). O fungo *Fusarium oxysporum* f.sp *phaseoli* é um habitante do solo e vive saprofiticamente sobre a matéria orgânica e restos culturais (Tuset-Barrachina, 1973; Kimati, 1980).

O patógeno é favorecido por temperaturas amenas (em torno de 20°C) *in vivo*, porém apresenta seu ótimo crescimento *in vitro* em torno de 28°C (Kimati, 1980).

A murcha de fusarium do feijoeiro foi relatada pela primeira vez na Califórnia em 1928. No Brasil, os primeiros a relatarem a doença foram Cardoso et al. (1966) no

município de Laranjal Paulista - SP. Constatada primeiramente em feijão e, posteriormente, em feijão vagem, a doença tem se mostrado bastante importante, principalmente neste último tipo, sendo possivelmente uma das causas determinantes das mudanças periódicas das áreas de cultivo (Kimati, 1980).

A penetração *Fusarium oxysporum* f.sp *phaseoli* ocorre geralmente próxima aos ápices radiculares, além de ferimentos e aberturas naturais radiculares do feijoeiro (Bianchini et al., 1983). A infecção pode ocorrer em qualquer época do ciclo da planta, principalmente quando jovem (Tesut-Barrachina, 1973). Sua incidência ocorre em reboleiras (Mohan et al., 1983), podendo levar a planta à morte (Costa et al., 1982).

O patógeno coloniza o sistema vascular da planta, causando amarelecimento e murcha das folhas. Com o avanço da doença, as folhas secam e caem. Os sintomas iniciam-se pelas folhas inferiores progredindo para as superiores (Bianchini et al., 1997). Plantas severamente afetadas e cultivadas em locais úmidos apresentam uma massa cotonosa branca ou rosada externamente ao caule, composta de micélios e conídios do fungo. Devido a colonização pelo fungo nota-se na região do xilema, coloração marrom-escuro, estendendo-se no caule principal, ramos laterais e pecíolos das folhas (Cardoso et al., 1966; Costa et al., 1982)

O fungo é disseminado de um campo para outro principalmente através dos esporos aderidos a superfície das sementes. A disseminação pode ser feita também por vento e água de irrigação, que transportam partículas de solo infestado e conídios produzidos sobre a planta morta (Bianchini et al., 1997).

1.3 O fungo *Trichoderma* sp.

O fungo *Trichoderma* sp. corresponde a fase anamórfica do gênero *Hypocrea* sp. que pertence ao filo Ascomycota (Agrios, 1997). As espécies de *Trichoderma* geralmente

são encontradas como componentes da microbiota em quase todos os tipos de solos, especialmente os orgânicos, incluindo a camada de húmus das florestas, solos agrícolas e pomares, podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (Roiger et al., 1991).

Este fungo tem como características morfológicas o micélio, inicialmente de coloração branca e de crescimento rápido. Com o desenvolvimento, torna-se cotonoso e compacto com tufo verde escuro. A coloração da colônia é devida, geralmente, à coloração e a quantidade de conídios. Os conídios são unicelulares, de forma subglobosa, ovóide, elipsóide ou elíptico-cilíndrica, com textura lisa ou rugosa e coloração hialina para verde-amarelado até verde-escuro, sendo a última mais comum. Sua posição é uma forma de esfera, no ápice das fiálides. As fiálides têm forma de cantil com o centro dilatado e o ápice afilado, solitários ou em grupos, hialinos, formando um ângulo com os conidióforos. Os conidióforos são muito ramificados, solitários ou em tufo compacto, geralmente em formato cônico ou piramidal. Normalmente mostram-se eretos, formando um ângulo reto com a hifa vegetativa. As áreas conidiais apresentam-se em forma de faixas concêntricas de coloração verde (Melo, 1991).

Trichoderma sp. é um micoparasita necrotrófico eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos. Sucesso maior com o uso de *Trichoderma* tem sido documentado para patógenos de solo, como: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp. e *Pythium* sp. No entanto, diversos trabalhos têm documentado o parasitismo de *Trichoderma* sp. a uma vasta gama de fungos fitopatogênicos (*Armillaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Verticillium* sp., *Venturia* sp., *Endothia* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizopus* sp., *Diaporthe* sp., *Fusicladium* sp., *Botrytis* sp., *Poria monticola*, *Stereum purpureum*) (Melo, 1998).

Estudos indicam que a forma de ação do fungo como agente de controle biológico está baseada na competição por nutrientes, produção de metabólitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas da parede celular, quitinases, proteases e glucanases, bem como micoparasitismo (Papavizas, 1985; Melo, 1991).

As várias espécies de *Trichoderma* têm capacidade de produção de uma quantidade de enzimas líticas, como por exemplo, celulasas, hemicelulasas, glucanases, tanto extra quanto intracelularmente, conferindo-lhes uma excelente capacidade de degradação de celulose e, conseqüentemente, a degradação de paredes celulares de fungos, tornando-o um potencial competidor. Em solos com grande presença de compostos à base de celulose há um favorecimento ao aumento da densidade populacional de *Trichoderma* sp. (Melo, 1991; Melo, 1996; Melo, 1998).

No micoparasitismo, o hospedeiro, no caso o patógeno, pode ser mantido vivo, micoparásita biotrófico, ou ser morto, micoparásita necrotrófico. Esta interação pode ser dividida em quatro fases: localização, reconhecimento, contato e penetração. A localização provavelmente deve-se aos estímulos químicos liberados pelo patógeno, que são detectados pelo antagonista. A partir disso, há um reconhecimento do patógeno pelo antagonista, seguido pelo contato através de enrolamento da hifa do antagonista em torno da hifa do patógeno. Posteriormente ocorre a penetração, pela formação de apressórios e pela ação de enzimas que degradam a parede celular (Melo, 1996).

Outro mecanismo de ação de *Trichoderma* sp. é a capacidade de certos isolados promoverem o crescimento de plantas e aumentarem a germinação e emergência de sementes (Melo, 1998). A promoção de crescimento pode ser induzida de diversas formas por fungos e bactérias: por produção de hormônios vegetais, por produção de vitaminas ou conversão de materiais a uma forma útil para a planta, por absorção e translocação de minerais e por controle de patógenos. A aplicação de *Trichoderma* sp. tem levado a

aumentos significativos na porcentagem e na precocidade de germinação, no peso seco e na altura de plantas (Melo, 1996).

Sivan e Chet (1993) usaram *Trichoderma harzianum* em combinação com solo esterilizado e reduziram as taxas de fumigação com brometo de metila além de obter um controle significativo em murcha de tomate em plântulas colonizadas com o antagonista em casa de vegetação e transplantadas para o campo.

O trabalho realizado por Reis et al. (1995) teve objetivo de selecionar isolados de *Trichoderma* sp. para o controle de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Os pesquisadores avaliaram o potencial de 41 isolados de *Trichoderma* sp., aplicados na forma de pó biológico em solo natural, para o controle da murcha do feijoeiro. Como resultado três isolados de *Trichoderma* sp. (TN-31, TN63, TN-10) apresentaram redução de até 55% da severidade da doença, mostrando-se mais eficientes do que o benomyl no tratamento de sementes. Os isolados TN-28, TN-59 E TN-15 apresentaram maior nível de antagonismo pelo teste de pareamento. Após a realização dos experimentos, procedeu-se a identificação dos isolados mais promissores para o biocontrole, sendo TN-63 identificado como *T. viride* e TN-31 como *T. aureoviride*.

Nemec et al. (1996) avaliaram alguns agentes de biocontrole, entre eles, *Trichoderma harzianum*, para o controle de *Fusarium oxysporum* em vegetais. No final da pesquisa eles concluíram que todos os agentes de biocontrole reduziram a murcha causada por *F. oxysporum* em tomateiro e que *T. harzianum* foi o agente de biocontrole mais efetivos, reduzindo 12% da severidade da doença.

Carver et al. (1996) isolaram *T. aureoviride* como endofítico em cravos sadios e testaram seu potencial antagonista contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* em estufas de crescimento para o cultivo de cravos (*Dianthus caryophyllus*) no sudoeste da Inglaterra. Geralmente elevadas temperaturas, como as do interior de estufas de crescimento, reduzem a

capacidade antagonista dos microrganismos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Porém, o fungo *Trichoderma aureoviride* tem seu máximo potencial de antagonismo alcançado a 28°C, o que o torna um excelente microrganismo para ser utilizado no controle biológico em plantas cultivadas em estufas e casas de vegetação. *T. aureoviride* também demonstrou tolerância aos pesticidas utilizados na produção comercial de cravos. Indicando, assim, que é um microrganismo que pode ser usado em programas de manejo integrado.

No trabalho realizado por Larkin & Fravel (1998) isolados de *Trichoderma* sp. foram coletados de raízes e da rizosfera de plantas de tomate. O objetivo da pesquisa foi testar a eficácia do antagonista no controle de murcha de *Fusarium*. Plântulas de tomate foram tratadas com o agente de biocontrole em casa de vegetação e transferidas para o campo onde o solo estava infestado com o fitopatógeno. Um produto comercial à base de *Trichoderma* sp. (RootShield) também foi testado. O isolado de *T. hamatum* foi o mais efetivo no controle da doença, com redução de 30 a 65%. O produto comercial foi efetivo somente quando incorporado com taxa de 0,2% ou mais.

Thavengalu et al. (2004) isolaram *Trichoderma* sp. da rizosfera de bananeira de diferentes áreas de Tamil Nadu, Índia, e avaliaram *in vitro* seu potencial antagonista contra *Fusarium oxysporum*, patógeno da banana. O isolado Th-10 de *T. harzianum* foi o mais eficiente na inibição do crescimento micelial de *Fusarium in vitro*. Dois experimentos de campo foram realizados. A aplicação de Th-10 formulado como pó seco controlou efetivamente o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* com uma eficácia comparada a do fungicida carbendazim.

No trabalho realizado por Wang et al. (2005), isolados de *Trichoderma* sp. e fungicidas foram testados no controle de *Fusarium* spp. em plântulas de equináceas (*Echinacea* spp.). Vinte isolados de *Trichoderma* sp. demonstraram atividade antagonista para *Fusarium* sp. em meio de cultura, com taxas de inibição de 44 a 65%. Alguns isolados

reduziram significativamente a incidência e a severidade da doença em plântulas em experimentos de casa de vegetação. Dois isolados de *Trichoderma* sp. T1 e T13 foram aplicados sozinhos e em combinação com uma baixa concentração do princípio ativo fludioxonil em avaliações em casa de vegetação. Os resultados sugeriram que fludioxonil e *Trichoderma* sp. podem ser utilizados em combinação para um controle de manejo integrado da doença em equináceas.

Outros trabalhos também foram realizados como, por exemplo, o de Kredics et al. (2001) que investigou os efeitos de dez metais pesados, em experimentos *in vitro*, na atividade das enzimas β -glucosidase, celobihidrolase, β -xilosidade e endoxilanase produzidas por seis isolados de *Trichoderma* sp., além de selecionar e caracterizar isolados mutantes resistentes aos metais. Em uma concentração de 1mmol, somente o mercúrio mostrou efeitos inibitórios na atividade enzimática dos isolados, *in vitro*. Os outros metais não afetaram a atividade enzimática. Um total de 177 mutantes resistentes a metais foram isolados e testados por resistência cruzada a outros metais pesados. Alguns desses mutantes apresentaram atividade antagonista a *Fusarium* sp. em meio de cultura contendo os respectivos metais. *Trichoderma* sp. é um agente de biocontrole efetivo contra fitopatógenos mesmo na presença de metais pesados. Os mutantes resistentes a metais podem ser ideais para o uso em conjunto com pesticidas que contêm metais pesados em sua formulação, como parte de um sistema de proteção integrada.

Alguns fatores ambientais podem afetar a ação antagonística de *Trichoderma* sp. sobre os patógenos, dentre eles a disponibilidade de água (umidade) e nutrientes, o pH, a temperatura e textura do solo. A importância da umidade do solo na atividade antagônica do *Trichoderma* sp. é variável, conforme a espécie em questão. De modo geral, em condições de solo bastante seco e extremamente úmido esta atividade é reduzida, tendo como

condições mais adequadas solos ligeiramente úmidos a úmidos (Liu & Baker, 1980; Melo 1996).

Os níveis de pH também influenciam o parasitismo de *Trichoderma* sp. Em geral este fungo é favorecido por valores mais baixos, ou seja, pH ácido (Chet & Baker, 1980; Papavizas, 1985). Chet & Baker (1981) verificaram incremento da supressividade às doenças do solo com pH de 5,1, quando comparado com pH em torno de 8,0, isso conseqüência de um favorecimento do desenvolvimento de *Trichoderma* sp., além de outros fungos.

Outro fator que pode influenciar na atividade antagonista de *Trichoderma* sp. é a temperatura, no entanto, há diferenças entre as espécies. Harman et al. (1980) verificaram que *Trichoderma* sp. foi eficiente contra *Rhizoctonia solani* entre temperaturas de 17 a 30°C.

A rizosfera ou zona próxima das raízes das plantas no solo é uma área com atividades biológicas bastante ativas, com efeitos diretos importantes sobre as plantas como, por exemplo, sobre a nutrição das mesmas (Salgado et al., 1999). Na rizosfera encontram-se microrganismos que podem promover o crescimento vegetal, e proteger o sistema radicular da infecção por patógenos, estando incluído nesse grupo o fungo *Trichoderma* sp. Assim, o fungo *Trichoderma* sp., além de apresentar potencial como biocontrolador de patógenos, pode ter a capacidade de promover o crescimento vegetal e mostrar competência rizosférica (Melo, 1996).

1.4 Controle Químico

O controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir as altas produtividade e qualidade de produção, visadas pela agricultura moderna (Kimati, 1995). Os defensivos agrícolas fazem parte do conjunto de tecnologias associadas ao processo de modernização da agricultura, que ocorreu a partir da década de 60. Com o uso generalizado dos defensivos agrícolas nas mais

diferentes condições ambientais, muitos problemas começaram a ser percebidos e diagnosticados, tais como a ocorrência de resíduos em alimentos, a contaminação de solos e águas, o efeito em organismos não visados e a intoxicação de trabalhadores rurais. Com a crescente conscientização sobre o risco do uso desses produtos, houve significativos avanços nas legislações de registro e uso desses químicos em muitos países. Com isso, há uma tendência de se substituir os defensivos agrícolas mais problemáticos em termos ambientais e de saúde humana por produtos químicos mais específicos e que sejam mais seguros (Campagnola & Bettioli, 2003).

O controle químico de doenças de plantas é feito através de vários tipos de produtos, comumente denominados agroquímicos, incluindo fertilizantes e pesticidas. O grupo mais importante de pesticidas utilizados para o controle de doenças de plantas é o dos fungicidas (Kimati, 1995). O uso de fungicidas representa um dos principais métodos de controle de doenças de plantas. A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos os tornaram amplamente difundidos em diversas culturas. Porém, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida anteriormente eficaz, colocando em risco a eficiência do método (Ghini & Kimati, 2002). Os fungicidas constituem um grupo com propriedades químicas e biológicas muito variáveis, podendo envolver vários princípios de controle em função da natureza do produto, da época e metodologia de aplicação e do estágio de desenvolvimento epidemiológico da doença (Kimati, 1995).

O controle químico de doenças fúngicas visa tanto a erradicação ou diminuição do inóculo associado às sementes, mediante o tratamento das mesmas, como a proteção das plantas através de pulverizações foliares (Rava & Sartorato, 1996).

O tratamento de sementes, com o objetivo de controlar seus patógenos e dar proteção contra os do solo, é considerado como um dos métodos de baixo custo. É de fácil

aplicação, além de ser pouco poluente; causa menor impacto no ambiente, se comparado com pulverizações de parte aérea.

O tratamento de sementes traz como benefícios a manutenção ou melhoria da qualidade sanitária da semente, evita a disseminação ou introdução de patógenos como fonte de inóculo primário e pode proporcionar bom estande inicial na cultura do feijoeiro (Ito et al.,2003).

Batista et al. (2002) executaram testes de fungitoxicidade *in vitro* contra dois isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*, com o objetivo de selecionar fungicidas para o controle desta doença. Os fungicidas e as doses utilizadas foram: benomil (0,5 g i.a. L⁻¹); tiofanato metílico (1,4 g i.a. L⁻¹); procloraz (0,675 g i.a. L⁻¹) e carbendazim (0,5 g i.a. L⁻¹). Os fungicidas procloraz, benomil e carbendazim apresentaram níveis elevados de redução do crescimento micelial e esporulação dos isolados do fitopatógeno, enquanto tiofanato metílico não apresentou efeito satisfatório.

Reid et al. (2002) testaram o fungicidas benomil e fludioxonil em experimentos em casa de vegetação contra *F. oxysporum* f.sp. *asparagi*. Os resultados mostraram que o fungicida fludioxonil limitou a morte das plantas mesmo em níveis elevados de inóculo.

No trabalho realizado por Nel et al. (2007), fungicidas foram avaliados *in vitro* e *in vivo* quanto a sua eficácia contra o patógeno *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Os fungicidas procloraz e propiconazole, em concentrações de 1 e 5µg ml⁻¹, inibiram significativamente o crescimento micelial do patógeno. Já benomil mostrou redução de 80,6% na severidade da doença causada por *F. oxysporum* f.sp. *cubense*.

A partir do ano de 1950 passou-se a explorar a idéia de integração do controle químico com o biológico, com o objetivo de resolver-se o conflito entre o uso de inseticidas e a ação dos inimigos naturais (Conceição, 2000).

1.5 Controle Biológico

O controle biológico visa o controle de pragas e doenças com menor impacto ambiental e com menor risco para o homem, bem como a redução de custos em relação ao emprego de métodos químicos tradicionais (Moraes, 1992).

O controle biológico de fitopatógenos pode ser alcançado através de práticas de manejo para favorecer antagonistas nativos e também através da introdução de microrganismos selecionados. O sucesso do biocontrole, no entanto, depende da natureza das propriedades antagonistas e mecanismos de ação do hiperparasita (Melo, 1998).

No trabalho realizado por Moino & Alves (1999) foram feitos confrontos *in vitro*, entre o fungo *Trichoderma* sp. e os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Os isolados de *B. bassiana* (isolado 634) e *M. anisopliae* (isolado E-9) foram inoculados em meio BDA, com intervalos de 0, 48, 120 e 168 horas entre a inoculação de *Trichoderma* sp. e dos entomopatógenos. Foi avaliado o crescimento radial das colônias nos períodos de 48 e 120 horas após a inoculação de *Trichoderma* sp., sendo que este afetou o desenvolvimento dos entomopatógenos quando inoculado simultaneamente ou após 48 horas.

Lobo Jr. & Abreu (2000) avaliaram a inibição do crescimento micelial do isolado “S1” de *Sclerotinia sclerotiorum*, obtido de plantas de feijoeiro, por meio da produção de metabólitos voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma viride*, *T. aureoviride*, *T. koningii* e *T. pseudokoningii*. Os resultados mostraram que todos os isolados produziram metabólitos voláteis que inibiram o desenvolvimento do patógeno.

No trabalho de Rojo et al. (2007) foram avaliadas espécies de *Trichoderma* como potenciais agentes de biocontrole para reduzir a podridão causada por *Fusarium solani* em plantações de amendoim na Argentina. Foram selecionados dois isolados, um de *T. harzianum* e outro de *T. longibrachiatum* para experimentos de campo. Cada

tratamento consistiu de sementes tratadas com cada um dos isolados. Os resultados mostraram que *T. harzianum* foi mais efetivo que *T. longibrachiatum* em diminuir a severidade da doença e aumentar a frequência de plantas saudáveis.

Os mecanismos das interações entre microrganismos patogênicos e antagonistas podem ser divididos em antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação e indução de defesa do hospedeiro. Uma característica adequada para um antagonista é apresentar mais de um mecanismo, pois as chances de sucesso do controle biológico serão aumentadas (Bettiol & Ghini, 1995).

Um agente de biocontrole ideal seria aquele que colonizasse e fosse competitivo no microambiente; rizosfera, filosfera, rizoplano e espermosfera (Melo, 1998). Dentre os muitos agentes potenciais de biocontrole, o fungo *Trichoderma* sp. tem sido um dos mais estudados, dado as suas características peculiares de antagonismo em condições naturais, principalmente no solo (Melo, 1991).

1.6 Manejo integrado

Na agricultura moderna, qualquer medida de controle a ser adotada nunca deverá ser recomendada isoladamente, e sempre terão que ser levados em consideração os aspectos econômicos, ecológicos e sociológicos. O Manejo Integrado é, portanto um sistema de apoio à tomada de decisões para seleção e uso de táticas de controle de doenças, pragas e plantas daninhas, harmonicamente coordenadas em estratégias de manejo, baseados em análises de custo e benefício, que levam em consideração os interesses dos produtores, da sociedade e do meio ambiente (Zambolim, 2000).

O manejo integrado consiste na implementação de métodos de controle que utilizem, harmonicamente, os processos químicos, físicos, biológicos e os métodos

culturais, de forma planejada. Resulta em benefício da produtividade, proteção ambiental, segurança do consumidor e das pessoas envolvidas (Conceição, 2000).

Na prática, o manejo integrado envolve três ações principais (Geier, 1966): (i) determinar como o ciclo vital de um patógeno precisa ser modificado de modo a mantê-lo em níveis toleráveis, ou seja, abaixo do limiar de dano econômico; (ii) combinar o conhecimento biológico com a tecnologia disponível para alcançar a modificação necessária, ou seja, exercer a ecologia aplicada; (iii) desenvolver métodos de controle adaptados às tecnologias disponíveis e compatíveis com aspectos econômicos e ecológico-ambientais, ou seja, conseguir aceitação econômica e social (Bergamin Filho & Amorim, 1996).

A classe agrônômica tem apoiado o Método Integrado de Cultivo, em que são levados em conta todos os fatores que podem proporcionar à planta a capacidade máxima de produção, permitindo que esta aproveite eficazmente o seu potencial produtivo. O controle químico é, então, apenas uma das medidas da Agricultura Integrada. A prática do Manejo Integrado, em defesa fitossanitária, permite que sejam aplicados produtos e métodos de acordo com as necessidades sentidas por produtores e consumidores de alimentos (Conceição, 2000).

Pereira et al. (1996) avaliaram o efeito de vermicomposto, solarização, herbicida (EPTC), fungicida (procimidone), *Trichoderma harzianum* e *Bacillus turingensis* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. Os resultados obtidos mostraram que a solarização, isoladamente, constitui-se em excelente estratégia de controle, e que, mesmo na ausência de solarização, a incorporação de *T. harzianum* ao vermicomposto, após a aplicação de herbicida EPTC, propiciou ganhos significativos em nível de controle, independente da profundidade de incorporação dos escleródios de *S. sclerotiorum*. Concluíram que a utilização de *T. harzianum*, em presença de vermicomposto associado ao

herbicida EPTC, apresenta-se como estratégia promissora para o controle de *S. sclerotiorum*.

Silva et al. (1999) avaliaram a sensibilidade de isolados de *Trichoderma* sp. aos fungicidas benomil e iprodione. Os resultados mostraram que, os dois fungicidas, presentes em meio de cultura, exerceram efeito negativo sobre o crescimento micelial dos isolados de *T. harzianum* e *T. viride*.

May & Kimati (2000) verificaram que os ingredientes ativos metalaxyl, carboxin / thiram, chlorothalonil, captan, propamocarb e hymexazol não interferiram no desenvolvimento *in vitro* de cinco isolados de *Trichoderma* sp. sendo, então, produtos com potencial para serem recomendados em manejo integrado.

No trabalho realizado por Medeiros et al. (2006) foram avaliados os efeitos do composto sintético Tiazolidina-2,4-diona sobre o desenvolvimento *in vitro* de um isolado de *Trichoderma* sp. Nenhuma das concentrações utilizadas influenciou no desenvolvimento micelial de *Trichoderma* sp., demonstrando o potencial de utilização desta molécula como uma forma complementar de controle de *Monosporascus cannonballus*, junto com *Trichoderma* sp.

Para o desenvolvimento de uma tecnologia que possibilite a combinação de diferentes métodos de controle, é importante a realização de estudos sobre seus efeitos associados. No caso do controle biológico, é de fundamental importância a avaliação dos efeitos sobre o agente de biocontrole, dos diversos produtos químicos que são comumente utilizados na cultura. Esses estudos têm a finalidade de determinar a compatibilidade entre esses produtos e o agente de biocontrole e, se possível, estabelecer as concentrações adequadas para cada caso (Mello et al., 2003).

CAPÍTULO II

2 COMPATIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Trichoderma* sp. COM DIFERENTES FUNGICIDAS *in vitro*

2.1 Introdução

Existem, atualmente, no mercado inúmeras substâncias químicas empregadas no controle de pragas e doenças, sendo os fungicidas um grupo numeroso e destacado. Entretanto, as conseqüências da sua utilização não são unicamente positivas, muitos destes compostos químicos são tóxicos ao homem e animais e, também do ponto de vista ambiental, acarretam diminuição do potencial de controle biológico (Loureiro et al., 2002).

O manejo integrado, com a utilização de produtos fitossanitários seletivos em conjunto com fungos antagonistas, pode ser uma estratégia mais segura e eficiente. Entretanto alguns produtos fitossanitários podem afetar o crescimento vegetativo e a conidiogênese dos fungos antagonistas, ou até alterar sua composição genética (Alves et al., 1998).

A maioria dos relatos sobre o uso de antagonistas para o controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos apresenta o *Trichoderma* sp. como um dos mais promissores entre os agentes de biocontrole (Cassiolato et al., 1996). No entanto, poucos trabalhos têm sido realizados a propósito de avaliar compatibilidade entre fungicidas e agentes

de biocontrole, visando seu uso conjunto no manejo integrado de doenças (Cassiolato et al., 1996; Silva, 1997).

A seleção de biótipos estáveis para serem utilizados em combinação com fungicidas é uma opção para se obter um esquema de controle efetivo no manejo integrado de um ou mais fitopatógenos (Papavizas, 1985).

Assim, o objetivo deste trabalho foi testar a sensibilidade, *in vitro*, de isolados de *Trichoderma* sp. aos fungicidas.

2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.2.1 Experimentos em laboratório

Para os testes *in vitro* foram utilizados os seguintes fungicidas aplicados em plantas de feijão.

Nome comercial: Cabrio Top

Nome químico: methyl N-(2-{[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxymethyl}phenyl)

N-methoxy carbamate + Zinc ammoniate ethylenebis(dithiocarbamate)-
poly(ethylenethiuram disulfide)

Ingrediente ativo: pyraclostrobin + metiram

Classe: fungicida

Formulação: granulado dispersível

Concentração: (50g de pyraclostrobin + 550g de metiram) / kg

Classe toxicológica: III – medianamente tóxico

Dose recomendada: 1,5 kg / 200 a 300 L de água

Nome comercial: Captan SC
 Nome químico: N-(trichloromethylthio)
 Ingrediente ativo: captana
 Classe: fungicida
 Formulação: suspensão concentrada
 Concentração: 480g de captana / L
 Classe toxicológica: I – Extremamente tóxico
 Dose recomendada: 400 mL / 100L

Nome comercial: Comet
 Nome químico: methyl N-(2-{[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxymethyl} phenyl)
 N-methoxy carbamate
 Ingrediente ativo: pyraclostrobin
 Classe: fungicida
 Formulação: concentrado emulsionável
 Concentração: 250g de pyraclostrobin / L
 Classe toxicológica: II – altamente tóxico
 Dose recomendada: 0,3 L / 200 a 300 L

Nome químico: Derosal 500
 Nome químico: Methyl benzimidazol-2-ylcarbamate
 Ingrediente ativo: carbendazim
 Classe: fungicida
 Formulação: suspensão concentrada
 Concentração: 500g de carbendazim / L
 Classe toxicológica: III – medianamente tóxico
 Dose recomendada: 0,5L / 300 a 600 L

Nome comercial: Derosal Plus
 Nome químico: methyl benzimidazol-2-ylcarbamato + tetramethylthiuram disulfide
 Ingrediente ativo: carbendazim + thiram
 Classe: fungicida
 Formulação: suspensão concentrada para tratamento de sementes
 Concentração: (150g de carbendazim + 350g de tiram) / L
 Classe toxicológica: III – medianamente tóxico
 Dose recomendada: 300 mL / 100 kg de sementes

Nome comercial: Frowncide 500 SC
 Nome químico: 3-cloro-N-(-3-cloro-5-trifluorometil-2-piridil)-a,a,a-trifluoro-2,6-dinitro-
 p-toluidina
 Ingrediente ativo: fluazinam
 Classe: fungicida
 Formulação: suspensão concentrada
 Concentração: 500g de fluazinam / L
 Classe toxicológica: II – altamente tóxico
 Dose recomendada: 1,0 a 1,5 L / 1000 a 1500 L

Nome comercial: Nativo

Nome químico: methyl (E)-methoxyimino-{(E)- α -[1-(α,α,α -trifluoro-m-tolyl)ethylideneaminoxy]-o-tolyl}acetate + (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol

Ingrediente ativo: trifloxistrobina + tebuconazole

Classe: fungicida

Formulação: suspensão concentrada

Concentração: (100g de trifloxistrobina + 200g de tebuconazole) / L

Classe toxicológica: III – medianamente tóxico

Dose recomendada: 0,6 L / 300L

Nome comercial: Ópera

Nome químico: (2RS, 3SR)-1-[3-(2-chlorophenyl)-2,3-epoxy-2-(4-fluorophenyl) propyl]-1H-1,2,4-triazole + methyl N-(2-{[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxymethyl}phenyl) N-methoxy carbamate

Ingrediente ativo: epoxiconazole + pyraclostrobin

Classe: fungicida

Formulação: emulsão

Concentração: (50g de epoxiconazole + 133g de pyraclostrobin) / L

Classe toxicológica: II – altamente tóxico

Dose recomendada: 0,75L / 300L

Nome comercial: Stratego

Nome químico: Methyl (E)-methoxyimino-{(E)- α -[1-(α,α,α -trifluoro-m-tolyl)ethylideneaminoxy]-o-tolyl}acetate + (RS)-1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl]methyl-1H-1,2,4-triazole

Ingrediente ativo: trifloxistrobina + propiconazol

Classe: fungicida

Formulação: concentrado emulsionável

Concentração: (125g de trifloxistrobina + 125g de propiconazol) / L

Classe toxicológica: II – Altamente tóxico

Dose recomendada: 0,6 L / 200 a 300L

Nome comercial: Vitavax – Thiram 200 SC

Nome químico: 5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathi-ine-3-carboxanilin+ tetramethylthiuram disulfide

Ingrediente ativo: carboxina + tiram

Classe: fungicida

Formulação: suspensão concentrada para tratamento de sementes

Concentração: (200g de carboxina + 200g de thiram) / L

Classe toxicológica: IV – Pouco tóxico

Dose recomendada: 250 a 300 mL / 100 kg de sementes

2.2.1.1 Obtenção dos isolados de *Trichoderma* sp.

Foram utilizados 7 isolados de *Trichoderma* sp. denominados T1R, T2R, T4R, T6R, T7R, TSV e PCT.

Os isolados de *Trichoderma* sp. foram obtidos a partir de amostras de solo coletadas de lavouras de feijão irrigado, localizadas na cidade de Cristalina, GO. Das amostras de solo, devidamente identificadas, foram retiradas alíquotas de 10 g e homogeneizadas com 90 mL de água destilada esterilizada. A partir desta suspensão, foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-3} . Da última diluição, foi inoculado 0,1 mL, em placa de Petri com BDA (batata 200 g, dextrose 20 g, ágar 15 g) acidificado com ácido lático (3 gotas / 100 mL) Foram utilizadas cinco placas por isolado de *Trichoderma* sp. O inóculo foi espalhado com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após 5 dias foi feita a repicagem para obtenção de culturas axênicas.

As amostras foram identificadas conforme o pivô e a fazenda em que foram coletadas e os isolados obtidos foram denominados conforme esta identificação (T: *Trichoderma* sp.; 1: pivô central nº1; R: identificação da fazenda). O isolado TSV foi obtido de uma área não cultivada e sem aplicação de produtos químicos (T: *Trichoderma* sp.; SV: selvagem). Foi utilizado também, um produto comercial formulado à base de isolados de *Trichoderma* sp. veiculados em arroz. Este foi denominado PCT (produto comercial *Trichoderma* sp.).

2.2.1.2 Interferência *in vitro* de fungicidas no crescimento de isolados de *Trichoderma* sp.

O efeito de fungicidas sobre os isolados de *Trichoderma* sp. (T1R; T2R; T4R; T6R; T7R; TSV e PCT) foi avaliado pelo crescimento dos isolados do antagonista na presença dos mesmos. Primeiramente, a adição dos produtos foi feita no meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acidificado com ácido láctico (3 gotas / 100mL), depois de autoclavado e ainda líquido (40°C), de modo que a concentração final do produto foi estabelecida considerando o volume de meio utilizado. Foram utilizados quatro tratamentos, sendo, três concentrações para cada fungicida (a dose recomendada pelo fabricante (Tabela 1), a metade e o dobro desta dose), mais a Testemunha, constituída apenas de BDA. Em seguida, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri e foram preparadas quatro placas por tratamento. A inoculação dos isolados de *Trichoderma* sp. foi feita com discos de colônias de 0,6 cm de diâmetro, no centro da placa. As placas foram incubadas em câmara de crescimento, com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 horas. A avaliação foi feita, após 7 dias, medindo-se o diâmetro das colônias. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias.

TABELA 1. Doses utilizadas para cada fungicida

Fungicida (nome comercial)	Dose utilizada no experimento
Cabrio Top	1,5 kg / 300 L de água*
Captan SC	400 mL / 100L
Comet	0,3 L / 300 L
Derosal 500	0,5L / 300 L
Derosal Plus	300 mL / 100 kg de sementes
Frowncide 500 SC	1,0 L / 1000 L
Nativo	0,6 L / 300L
Opera	0,75L / 300L
Stratego	0,6 L / 300L
Vitavax-Thiram 200 SC	300 mL / 100 kg de sementes

* Dose recomendada pelo fabricante

O segundo teste foi feito mergulhando-se discos de 0,6 cm de diâmetro de papel filtro em soluções de fungicida com água destilada estéril. As concentrações utilizadas foram as mesmas citadas no teste anterior. Os discos de papel filtro foram embebidos na solução e colocados em um lado das placas de Petri, do lado oposto foi colocado um disco de BDA contendo colônia dos isolados de *Trichoderma* sp. (Figura 1). Para cada tratamento foram feitas quatro repetições. A Testemunha consistiu somente nos isolados de *Trichoderma* sp. Os tratamentos foram mantidos em câmara de crescimento, com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 horas. No sétimo dia foi medido o halo de inibição formado em torno do disco de papel filtro. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias.

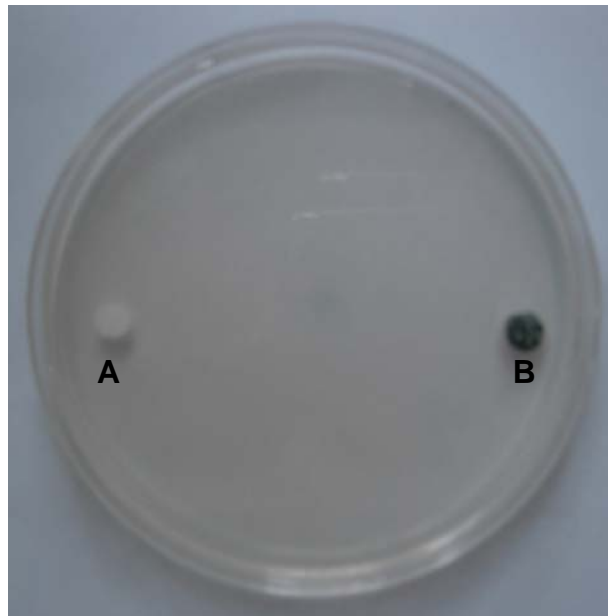


FIGURA 1. Experimento *in vitro*. Placa de Petri contendo meio de cultura BDA; de um lado da placa se encontra um disco de papel filtro de 0,6 cm de diâmetro, embebido com solução fungicida (A). Do lado oposto está um disco de 0,6 cm de diâmetro contendo colônia do fungo *Trichoderma* sp.(B).

2.3 Resultados e Discussão

O interesse em estudar a compatibilidade de isolados de *Trichoderma* sp. à fungicidas está na utilização deste antagonista no controle integrado de fitopatógenos. Isolados compatíveis podem ser usados em conjunto com fungicidas para tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo.

2.3.1 Interferência *in vitro* de fungicidas no crescimento de *Trichoderma* sp.

Estudos *in vitro* têm a vantagem de expor ao máximo o microrganismo à ação do produto químico, fato que não ocorre em condições de campo, onde vários fatores servem de obstáculo a essa exposição, assim, constatada a inocuidade de um produto em laboratório, espera-se que o mesmo seja seletivo no campo. Por outro lado, a alta toxicidade de um produto *in vitro* nem sempre indica a sua elevada toxicidade no campo, mas sim a possibilidade da ocorrência de danos dessa natureza (Moino Jr. & Alves, 1999).

Os resultados dos testes são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2: Diâmetro (cm) de colônias dos isolados de *Trichoderma* sp. em meio de cultura contendo fungicidas

Fungicidas/Doses	T1R	T2R	T4R	T6R	T7R	TSV	PCT	Testemunha
Cabrio Top								
5g / L	4,19 dC*	5,49 cB	8,50 aA	0,60 jD	4,54 bBC	7,39 aA	1,82 dD	8,50 A
2,5 g / L	5,99 bcC	7,44 bB	8,50 aA	0,60 jF	5,49 bD	8,50 aA	1,69 eE	8,50 A
10 g / L	3,12 eC	4,44 dB	7,60 aA	0,60 jE	3,14 cC	8,50 aA	0,98 dD	8,50 A
Captan SC								
4 mL / L	1,12 ghDE	1,42 ghC	1,14 gD	0,90 iEF	1,29 efCD	0,84 ghF	2,39 fgB	8,50 A
2 mL / L	1,42 gE	1,84 fgC	1,32 gE	1,24 hEF	1,59 deD	1,14 gF	3,62 deB	8,50 A
8 mL / L	0,92 ghDE	1,14 dC	0,94 ghDE	0,79 ijEF	0,99 efCD	0,72 gF	1,79 gB	8,50 A
Comet								
1 mL / L	5,12 cB	4,04 dB	8,14 aA	2,94 efC	4,79 bB	2,51 eC	0,60 hD	8,50 A
0,5 mL / L	5,38 cCD	6,54 bBC	8,50 aA	4,22 cD	5,11 bCD	7,47 bAB	0,60 hE	8,50 A
2 mL / L	2,09 fD	3,23 eC	4,24 cB	2,41 gD	2,30 cdD	2,24 efD	0,60 hE	8,50 A
Derosal 500								
0,83 mL / L	0,60 h	0,60 i	0,60 h	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
0,415 mL / L	0,60 h	0,60 i	0,60 h	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
1,66 mL / L	0,60 h	0,60 i	0,60 h	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
Derosal Plus								
3 mL / L	0,60 h	0,60 i	0,60 h	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
1,5 mL / L	0,60 h	0,60 i	0,60 h	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
6 mL / L	0,60 h	0,60 i	0,60 h	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
Frownicide 500 SC								
1,5 mL / L	3,34 eCD	2,41 fEF	5,59 bB	2,78 fgDE	5,12 bB	2,02 fF	4,88 cB	8,50 A
0,75 mL / L	3,69 deD	2,14 fE	5,94 bB	3,24 deD	5,29 bB	2,27 efE	4,49 cdC	8,50 A
3 mL / L	3,81 deC	2,12 fD	5,29 bB	3,39 dC	4,79 bB	2,17 efD	3,84 deC	8,50 A
Nativo								
2 mL / L	0,60 h	0,60 i	1,34 g	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
1 mL / L	0,60 h	0,60 i	2,09 f	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
4 mL / L	0,60 h	0,60 i	0,99 gh	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
Opera								
2,5 mL / L	0,60 h	0,60 i	3,34 de	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
1,25 mL / L	0,60 h	0,60 i	4,11 cd	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
5 mL / L	0,60 h	0,60 i	2,89 e	0,60 j	0,60 f	0,60 h	0,60 h	8,50 A
Stratego								
2 mL / L	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	2,44 gB	8,50 aA	2,24 efB	8,50 aA	8,50 A
1 mL / L	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	4,54 cB	8,50 aA	4,24 dC	8,50 aA	8,50 A
4 mL / L	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	2,42 gD	8,50 aA	2,54 eC	5,29 bcB	8,50 A
Vitavax-Thiram 200SC								
3 mL / L	6,64 bBC	6,69 bBC	8,50 aA	5,64 bC	7,24 aAB	6,01 cBC	6,36 bBC	8,50 A
1,5 mL / L	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 A
6 mL / L	0,92 ghC	1,08 hC	1,08 ghC	1,49 hBC	2,64 cB	2,12 efB	2,97 efB	8,50 A
Testemunha	8,50 a	8,50 a	8,50 a	8,50 a	8,50 a	8,50 a	8,50 a	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si (TUKEY 5%)

Observa-se, na Tabela 2 que os isolados T1R, T2R e T7R não apresentaram nenhuma alteração em seu desenvolvimento quando inoculados em meio de cultura adicionados com as diferentes doses do fungicida Stratego e na presença da meia dose do fungicida Vitavax-Thiram 200 SC. Os fungicidas Derosal 500, Derosal Plus, Nativo e Opera inibiram completamente o desenvolvimento destes isolados em quaisquer umas das doses testadas. Na presença dos fungicidas Cabrio Top, Captan SC, Comet e Frowncide 500 SC os isolados T1R, T2R e T7R apresentaram desenvolvimento, porém, diferiram estatisticamente da Testemunha.

O desenvolvimento do isolado T4R não diferiu estatisticamente da Testemunha quando inoculado em meio de cultura contendo quaisquer doses dos fungicidas Cabrio Top e Stratego e na dose recomendada e meia dose dos fungicidas Comet e Vitavax-Thiram 200 SC. Na presença dos fungicidas Captan SC, Frowncide 500 SC, Nativo e Opera o isolado se desenvolveu, porém, diferiu estatisticamente da Testemunha. Os fungicidas Derosal 500 e Derosal Plus inibiram completamente o desenvolvimento do isolado T4R.

O isolado T6R não diferiu estatisticamente da Testemunha somente na presença da meia dose do fungicida Vitavax-Thiram 200 SC. Na presença dos fungicidas Cabrio Top, Derosal 500, Derosal Plus, Nativo e Opera o isolado não apresentou qualquer desenvolvimento. O isolado apresentou desenvolvimento na presença dos fungicidas Captan SC, Comet, Frowncide 500 SC e Stratego, porém diferindo estatisticamente da Testemunha.

Na presença do fungicida Cabrio Top e na presença da metade da dose do fungicida Vitavax-Thiram 200 SC (Figura 2) o desenvolvimento do isolado TSV não diferiu estatisticamente da Testemunha. Não houve crescimento do isolado quando inoculado na presença dos fungicidas Derosal 500, Derosal Plus, Nativo e Opera. Com os fungicidas Captan

SC, Comet, Frowncide 500 SC e Stratego, TSV apresentou desenvolvimento, porém, diferiu estatisticamente da Testemunha.



FIGURA 2. Desenvolvimento *in vitro* do isolado TSV na presença da dose recomenda, meia dose e dobro da dose do fungicida Vitavax-Thiram 200 SC em maio de cultura BDA.

O produto comercial PCT não diferiu estatisticamente da Testemunha na presença da dose recomendada e meia dose do fungicida Stratego e na presença da meia dose Vitavax-Thiram 200 SC. O isolado não se desenvolveu na presença dos fungicidas Comet, Derosal 500 (Figura 3), Derosal Plus, Nativo e Opera. Na presença dos fungicidas Cabrio Top, Captan SC e Frowncide 500 SC o isolado PCT apresentou crescimento, porém diferiu estatisticamente da Testemunha.

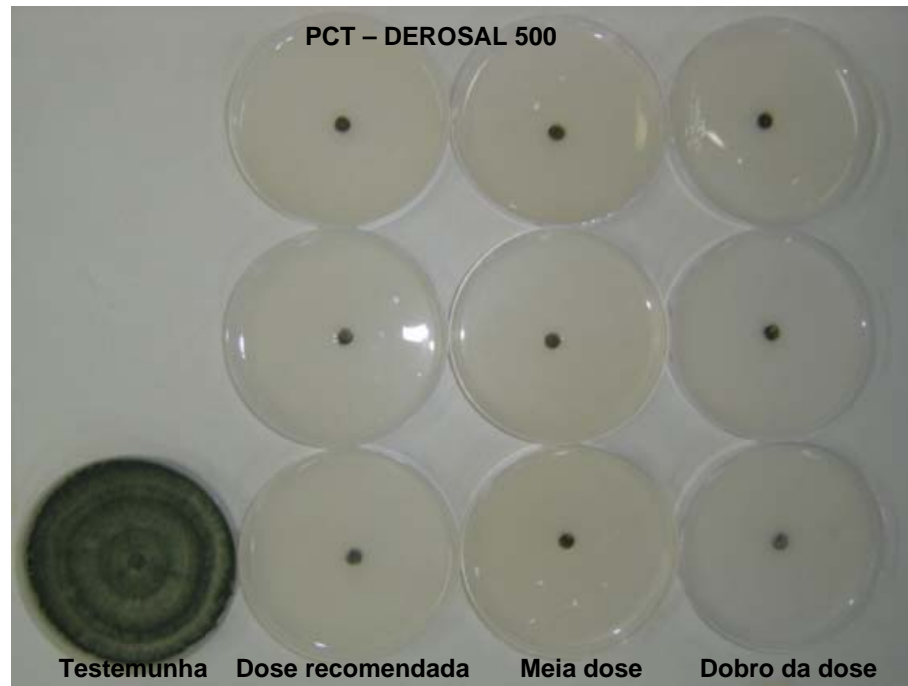


FIGURA 3. Desenvolvimento *in vitro* do isolado PCT na presença da dose recomenda, meia dose e dobro da dose do fungicida Derosal 500 em meio de cultura BDA.

Os fungicidas que Derosal 500, Derosal Plus, se mostraram tóxicos para todos os isolados testados, inibindo completamente seus desenvolvimentos. Ambos os produtos apresentam a substância carbendazim em suas formulações. Os fungicidas Nativo e Opera também foram tóxicos aos isolados com exceção do isolado T4R que apresentou desenvolvimento significativamente menor do que a Testemunha.

O grupo das estrobilurinas é desenvolvido a partir de compostos naturais produzidos por cogumelos, e atua na inibição da respiração mitocondrial de fungos, impedindo a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c (Barlett et al, 2002). Nota-se que os produtos Cabrio Top, Comet, Nativo, opera e Stratego, apesar de pertencerem ao grupo das estrobilurinas, revelaram diferenças significativas entre eles.

O fungicida Frowncide 500 SC, que tem como princípio ativo a substância fluazinam, não inibiu completamente o desenvolvimento dos isolados de *Trichoderma* sp., porém inibiu a esporulação do antagonista (Figuras 4 e 5). O trabalho realizado por May & Kimati (2000) mostra que o princípio ativo fluazinam, quando misturado ao meio de cultura BDA, interferiu no desenvolvimento de cinco isolados de *Trichoderma* sp., porém não menciona se esta substância teve alguma ação antiesporulante sobre os isolados.

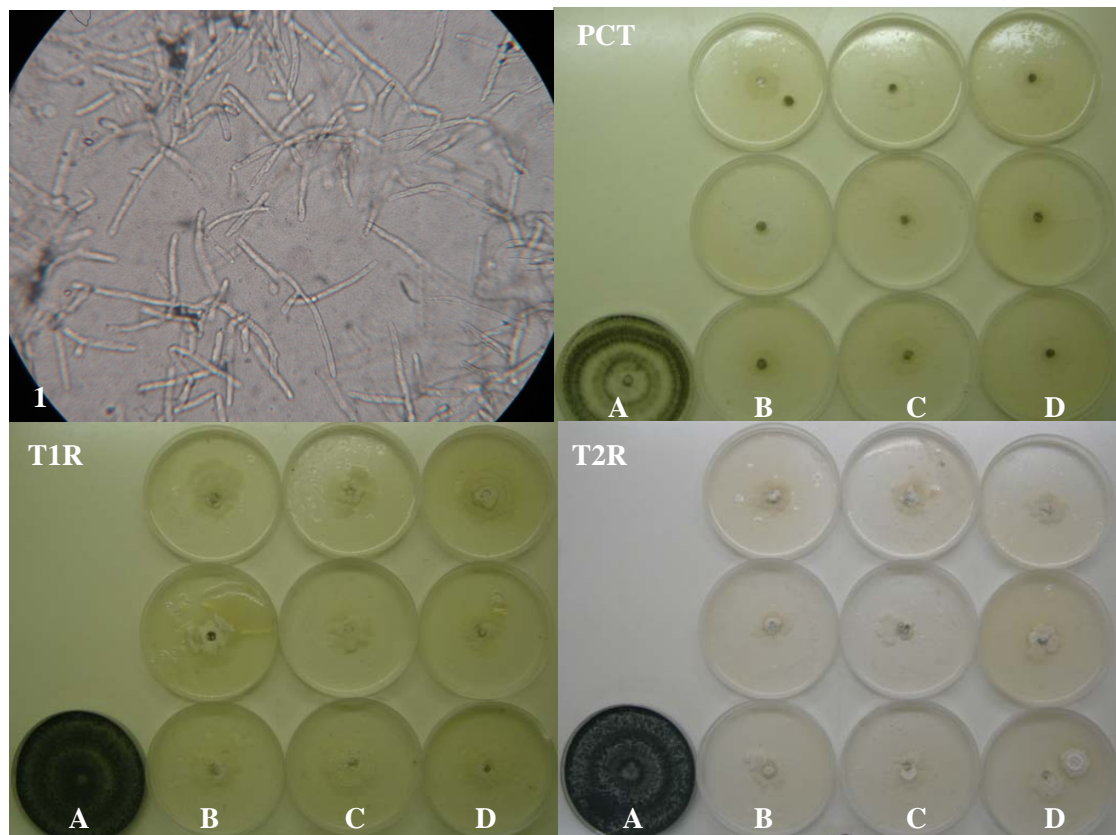


FIGURA 4. Micélio dos isolados de *Trichoderma* sp. na presença da dose recomendada do fungicida Frowncide 500 SC em BDA (1). Isolados PCT, T1R e T2R em: Testemunha (A), dose recomendada de Frowncide 500 SC (B), meia dose de Frowncide 500 SC (C), dobro da dose de Frowncide 500 SC (D).

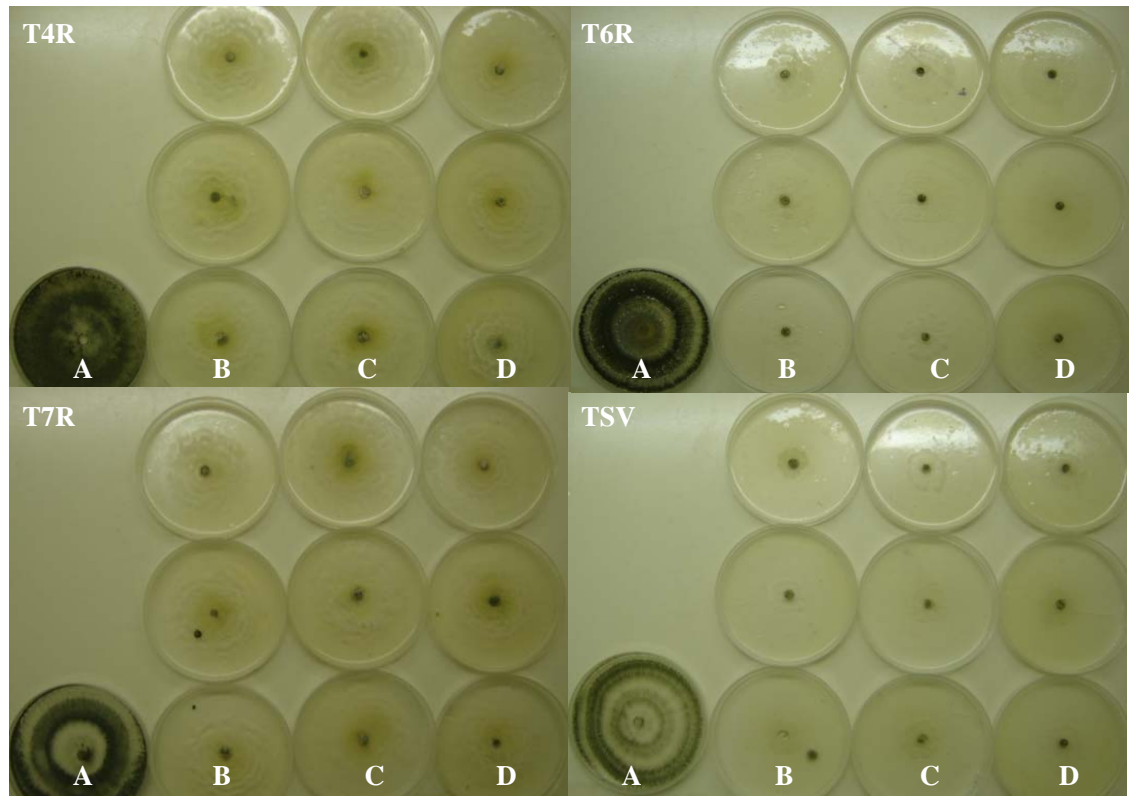


FIGURA 5. Isolados T4R, T6R, T7R e TSV em: Testemunha (A), dose recomendada de Frowncide 500 SC (B), meia dose de Frowncide 500 SC (C), dobro da dose de Frowncide 500 SC (D).

TABELA 3: Halo de inibição (cm) de colônias de *Trichoderma* sp. em meio de cultura contendo discos de papel filtro impregnados com fungicida

Fungicidas / Doses	T1R	T2R	T4R	T6R	T7R	TSV	PCT	Testemunha
Cabrio Top								
5g / L	0,25 fB*	0,02 fB	0,00 dB	0,01 f [*] B	0,00 fB	0,00 eB	0,93 defghA	0,00 B
2,5 g / L	0,00 fB	0,00 fB	0,00 dB	0,30 fB	0,00 fB	0,00 eB	0,92 defghA	0,00 B
10 g / L	0,17 fAB	0,62 abcdefAB	0,00 dB	1,80 abcdefA	0,35 defAB	0,82 bAB	0,95 defghAB	0,00 B
Captan SC								
4 mL / L	0,00 fB	0,00 fB	0,00 dB	1,44 abcdefA	0,09 efB	0,00 eB	0,00 hB	0,00 B
2 mL / L	0,00 fA	0,00 fA	0,00 dA	0,83 bcdefA	0,04 fA	0,00 eA	0,00 hA	0,00 A
8 mL / L	0,61 cdefAB	0,02 fB	0,48 bcdAB	2,02 abcdeA	0,20 efB	0,00 eB	0,00 hB	0,00 B
Comet								
1 mL / L	0,72 cdefAB	0,14 defB	0,00 dB	0,59 cdefB	0,09 efB	0,09 deB	1,26 abcdefA	0,00 B
0,5 mL / L	0,29 efBC	0,00 fC	0,00 dC	0,41 defB	0,12 efC	0,09 deBC	0,20 fghBC	0,00 C
2 mL / L	1,59 abcdA	0,32 cdefBC	0,00 dC	1,32 abcdefA	0,39 defBC	0,14 cdeC	1,21 abcdefA	0,00 C
Derosal 500								
0,83 mL / L	1,62 abcdAB	1,72 aAB	1,64 aAB	1,26 abcdefB	1,32 abcdAB	2,10 aA	2,33 abA	0,00 C
0,415 mL / L	0,97 bcdefABC	0,48 bcdefBC	0,00 dC	1,74 abcdefAB	0,51 cdefBC	2,12 aA	2,31 abcA	0,00 C
1,66 mL / L	2,02 abA	1,68 aBC	1,54 aBC	2,84 abA	2,22 aAB	2,32 aAB	2,58 aA	0,00 D
Derosal Plus								
3 mL / L	0,00 fC	0,78 abcdefB	0,00 dC	0,54 cdefBC	0,38 defBC	0,18 cdeC	1,94 abcdeA	0,00 C
1,5 mL / L	0,00 fB	0,00 fB	0,00 dB	0,14 fB	0,00 fB	0,04 deB	1,89 abcdeA	0,00 B
6 mL / L	0,95 bcdefAB	1,43 abcA	0,00 dB	0,97 abcdefAB	1,91 abA	0,72 bcAB	2,01 abcdA	0,00 B
Frownicide 500 SC								
1,5 mL / L	0,48 defAB	0,30 cdefAB	0,31 cdAB	1,07 abcdefA	0,38 defAB	0,39 bcdeAB	0,24 fghAB	0,00 B
0,75 mL / L	0,33 efA	0,00 fA	0,00 dA	0,70 bcdefA	0,02 fA	0,29 bcdeA	0,21 fghA	0,00 A
3 mL / L	1,99 abA	1,49 abAB	1,09 abAB	2,15 abcdeA	0,57 cdefAB	0,59 bcdAB	1,14 bcdeA	0,00 B
Nativo								
2 mL / L	2,11 abABC	0,91 abcdefCD	0,20 cdD	2,39 abcdAB	0,99 bcdeBCD	3,01 aA	0,99 cdefgBCD	0,00 D
1 mL / L	0,09 fC	0,09 efC	0,00 dC	2,54 abcA	0,00 fC	0,88 bB	0,76 efghB	0,00 C
4 mL / L	2,42 aAB	1,49 abBC	0,71 bcC	3,12 aA	1,52 abcBC	2,89 aA	2,17 abcdAB	0,00 D
Opera								
2,5 mL / L	1,34 abcdeBC	1,16 abcdBC	0,13 cdE	2,44 abcA	0,47 defDE	0,00 eE	1,88 abcdeAB	0,00 E
1,25 mL / L	0,72 cdefBCD	0,79 abcdefBCD	0,04 dE	2,54 abcA	0,29 efDE	0,02 eE	1,44 abcdeB	0,00 E
5 mL / L	1,79 abcB	1,34 abcB	0,23 cdC	2,59 abcA	1,00 bcdeB	0,39 bcdeC	2,29 abcA	0,00 C
Stratego								
2 mL / L	0,00 f	0,00 f	0,00 d	0,00 f	0,00 f	0,00 e	0,07 gh	
1 mL / L	0,00 f	0,00 f	0,00 d	0,00 f	0,00 f	0,00 e	0,00 h	
4 mL / L	0,00 f	0,00 f	0,00 d	0,00 f	0,00 f	0,00 e	0,00 h	
Vitavax-Thiram 200SC								
3 mL / L	0,00 fB	0,38 bcdefAB	0,00 dB	1,14 abcdefA	0,36 defAB	0,00 eB	1,47 abcdeA	0,00 B
1,5 mL / L	0,00 fB	0,00 fB	0,00 dB	0,80 bcdefB	0,39 defB	0,00 eB	1,19 bcdefA	0,00 B
6 mL / L	0,94 bcdefBC	0,52 abcdefBC	0,00 dC	2,75 abA	0,36 defBC	0,68 bcBC	2,04 abcdA	0,00 C
Testemunha	0,00 f	0,00 f	0,00 d	0,00 f	0,00f	0,00 e	0,00 h	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si (TUKEY 5%).

Na Tabela 3 os resultados mostram que o isolado T1R não diferiu estatisticamente da Testemunha quando inoculado na presença de quaisquer doses dos fungicidas Cabrio Top, Captan SC, Derosal Plus, Stratego e Vitavax-Thiram 200 SC, nas doses recomendadas dos fungicidas Comet e Frowncide 500 SC e nas meias doses dos fungicidas Derosal 500, Nativo e Opera.

O isolado T2R não diferiu estatisticamente da Testemunha na presença dos fungicidas Cabrio Top, Captan SC, Comet, Stratego e Vitavax-Thiram 200 SC, nas doses recomendadas e meia dose dos fungicidas Derosal plus, Frowncide 500 SC e Nativo e nas meias doses dos fungicidas Derosal 500 e Opera.

Nas doses dos fungicidas Cabrio Top, Captan SC, Comet, Derosal Plus, Opera, Stratego e Vitavax-Thiram 200 SC o desenvolvimento do isolado T4R não diferiu estatisticamente da Testemunha. Também não houve diferença estatística do isolado com a Testemunha na presença das doses recomendadas e meias doses dos fungicidas Frowncide 500 SC e Nativo e na metade da dose do fungicida Derosal 500.

O desenvolvimento do isolado T6R foi inibido pelas três doses dos fungicidas Nativo e Opera e pelo dobro das doses dos fungicidas Captan SC, Derosal 500, Frowncide 200 SC e Vitavax-Thiram 200 SC, apresentando um halo de inibição mais de 2 cm. Nas doses recomendadas e meias doses dos fungicidas Captan SC, Derosal 500, Frowncide 500 SC e Vitavax-Thiram 200 SC o desenvolvimento do isolado T6R não diferiu estatisticamente da Testemunha.

O isolado T7R não diferiu estatisticamente da Testemunha quando inoculado nas presenças de quaisquer das doses dos fungicidas Cabrio Top, Comet, Frowncide 500 SC, Stratego e Vitavax-Thiram 200 SC, na dose recomendada e meia dose dos fungicidas Captan SC, Derosal Plus e Opera e nas meias doses dos fungicidas Derosal 500 e Nativo.

As três doses dos fungicidas Derosal 500 e Nativo inibiram o desenvolvimento do isolado T7R. Na presença dos fungicidas Captan SC, Comet, Opera e Stratego o desenvolvimento do isolado T7R não diferiu estatisticamente da Testemunha. Também não houve diferença estatística da Testemunha quando o isolado foi inoculado na presença da dose recomendada e meia dose dos fungicidas Cabrio Top, Derosal Plus, Frowncide 500 SC e Vitavax-Thiram 200 SC.

O isolado PCT não diferiu estatisticamente da Testemunha quando inoculado com quaisquer das doses dos fungicidas Cabrio Top, Captan SC e Stratego, na dose recomendada e meia dose do fungicida Frowncide 500 SC e meia dose dos fungicidas Comet e Nativo. Os fungicidas Derosal 500, Opera e Vitavax-Thiram 200 SC inibiram o desenvolvimento do isolado que apresentou halos de inibição de 1,19 a 2,58 cm.

Comparando-se os dois testes *in vitro* realizados pode-se concluir que, para análise de compatibilidade de isolados de *Trichoderma* sp. com fungicidas, o teste em que os defensivos agrícolas foram adicionados ao meio BDA apresenta resultados mais confiáveis, pois o fungo entra em contato direto com o produto químico. No experimento em que os fungicidas foram aplicados nos discos de papel filtro e confrontados com os isolados de *Trichoderma* sp. os resultados não confirmaram o teste anterior. No primeiro teste, todos os isolados tiveram seu desenvolvimento inibido quando inoculados em meio de cultura contendo os fungicidas Derosal Plus e Derosal 500, o mesmo não aconteceu no segundo teste quando os isolados foram confrontados com discos de papel filtro embebidos em soluções desses fungicidas.

Pode-se concluir então, pelos resultados apresentados que o isolado T4R se mostrou o menos sensível aos fungicidas utilizados em testes *in vitro*. Os isolados T6R e PCT apresentaram maior sensibilidade aos fungicidas testados nos testes *in vitro*. Os fungicidas Stratego e Vitavax-Thiram 200 SC apresentaram menor toxicidade, *in vitro*, aos

isolados de *Trichoderma* sp. testados. Os fungicidas que apresentaram maior toxicidade aos isolados de *Trichoderma* sp. testados *in vitro* foram o Derosal 500, Derosal Plus, Nativo e Opera. O fungicida Frowncide 500 SC apresentou características antiesporulantes aos isolados de *Trichoderma* sp.

CAPÍTULO III

3 EFEITO DE FUNGICIDAS SOBRE DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* E INTERAÇÃO DESTES COM *Trichoderma* sp.

3.1 Introdução

Entre as doenças que ocorrem no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), a murcha ou amarelecimento, causada por *Fusarium oxysporum* Schelecht f.sp. *phaseoli* kendrich & Snyder, destaca-se como uma das principais, causando reduções na produtividade em até 80% (Echandi, 1967).

Em geral, os princípios de controle recomendados são baseados em medida de exclusão, visando a não introdução do patógeno na área de cultivo e a evasão para locais ou áreas sem o histórico da doença. No entanto, trabalhos com agentes biológicos contra algumas “formae speciales” de *Fusarium oxysporum* têm sido extensivamente pesquisados. Diversas espécies de *Trichoderma* têm se destacado como biocontroladores de fitopatógenos habitantes do solo. Êxitos também têm sido obtidos com o emprego de fungicidas em aplicações preventivas em diferentes patossistemas envolvendo “formae speciales” de *Fusarium oxysporum* (Batista et al., 2002).

Assim, o objetivo deste trabalho foi (i) avaliar o potencial antagonista de isolados de *Trichoderma* sp. contra o agente causal da murcha em feijoeiro *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (ii) testar diferentes fungicidas para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e (iii) avaliar, *in vivo*, a ação de dois fungicidas indicados para o tratamento de sementes de feijão contra *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* juntamente com isolados de *Trichoderma* sp.

3.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica e em casa de vegetação, localizados no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Os seguintes fungicidas foram escolhidos por serem produtos aplicados no cultivo do feijoeiro comum.

Nome comercial: Cabrio Top
 Nome químico: methyl N-(2-{[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxymethyl}phenyl) N-methoxy carbamate + Zinc ammoniate ethylenebis(dithiocarbamate)-poly(ethylenethiuram disulfide)
 Ingrediente ativo: pyraclostrobin + metiram
 Classe: fungicida
 Formulação: granulado dispersível
 Concentração: (50g de pyraclostrobin + 550g de metiram)/ kg
 Classe toxicológica: III – medianamente tóxico
 Dose recomendada: 1,5 kg / 200 a 300 L de água

Nome comercial: Captan SC
 Nome químico: N-(trichloromethylthio)
 Ingrediente ativo: captana
 Classe: fungicida
 Formulação: suspensão concentrada
 Concentração: 480g de captana / L
 Classe toxicológica: I – Extremamente tóxico
 Dose recomendada: 400 mL / 100L

Nome comercial: Comet

Nome químico: methyl N-(2- {[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxymethyl}phenyl) N-methoxy carbamate

Ingrediente ativo: pyraclostrobin

Classe: fungicida

Formulação: concentrado emulsionável

Concentração: 250g de pyraclostrobin / L

Classe toxicológica: II – altamente tóxico

Dose recomendada: 0,3 L / 200 a 300 L

Nome químico: Derosal 500

Nome químico: Methyl benzimidazol-2-ylcarbamate

Ingrediente ativo: carbendazim

Classe: fungicida

Formulação: suspensão concentrada

Concentração: 500g de carbendazim / L

Classe toxicológica: III – medianamente tóxico

Dose recomendada: 0,5L / 300 a 600 L

Nome comercial: Derosal Plus

Nome químico: methyl benzimidazol-2-ylcarbamato + tetramethylthiuram dissulfide

Ingrediente ativo: carbendazim + thiram

Classe: fungicida

Formulação: suspensão concentrada para tratamento de sementes

Concentração: (150g de carbendazim + 350g de tiram) / L

Classe toxicológica: III – medianamente tóxico

Dose recomendada: 300 mL / 100kg de sementes

Nome comercial: Frowncide 500 SC

Nome químico: 3-cloro-N-(3-cloro-5-trifluorometil-2-piridil)-a,a,a-trifluoro-2,6-dinitro-p-toluidina

Ingrediente ativo: fluazinam

Classe: fungicida

Formulação: suspensão concentrada

Concentração: 500g de fluazinam / L

Classe toxicológica: II – altamente tóxico

Dose recomendada: 1,0 a 1,5 L / 1000 a 1500 L

Nome comercial: Nativo

Nome químico: methyl (E)-methoxyimino- {(E)- α -[1-(α,α,α -trifluoro-m-tolyl)ethylideneaminoxy]-o-tolyl} acetate + (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol

Ingrediente ativo: trifloxistrobina + tebuconazole

Classe: fungicida

Formulação: suspensão concentrada

Concentração: (100g de trifloxistrobina + 200g de tebuconazole) / L

Classe toxicológica: III – medianamente tóxico

Dose recomendada: 0,6 L / 300

Nome comercial: Ópera

Nome químico: (2RS, 3SR)-1-[3-(2-chlorophenyl)-2,3-epoxy-2-(4-fluorophenyl)propyl]-1H-1,2,4-triazole + methyl N-(2-{[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxymethyl}phenyl) N-methoxy carbamate

Ingrediente ativo: epoxiconazole + pyraclostrobin

Classe: fungicida

Formulação: emulsão

Concentração: (50g de epoxiconazole + 133g de pyraclostrobin) / L

Classe toxicológica: II – altamente tóxico

Dose recomendada: 0,75L / 30

Nome comercial: Stratego

Nome químico: Methyl (E)-methoxyimino-{(E)- α -[1-(α,α,α -trifluoro-m-tolyl)ethylideneaminoxy]-o-tolyl}acetate + (RS)-1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl]methyl]-1H-1,2,4-triazole

Ingrediente ativo: trifloxistrobina + propiconazol

Classe: fungicida

Formulação: concentrado emulsionável

Concentração: (125g de trifloxistrobina + 125g de propiconazol) / L

Classe toxicológica: II – Altamente tóxico

Dose recomendada: 0,6 L / 200 a 300L

Nome comercial: Vitavax – Thiram 200 SC

Nome químico: 5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathi-ine-3-carboxanilin + tetramethylthiuram disulfide

Ingrediente ativo: carboxina + thiram

Classe: fungicida

Formulação: suspensão concentrada para tratamento de sementes

Concentração: (200g de carboxina + 200g de tiram) / L

Classe toxicológica: IV – Pouco tóxico

Dose recomendada: 250 a 300 mL / 100kg de sementes

3.2.1 Testes em laboratório

3.2.1.1 Obtenção dos isolados de *Trichoderma* sp.

Foram utilizados três isolados de *Trichoderma* sp. denominados T4R, TSV e PCT.

Os isolados de *Trichoderma* sp. foram obtidos a partir de amostras de solo coletadas de lavouras de feijão irrigado, localizadas na cidade de Cristalina, GO. Das amostras de solo, devidamente identificadas, foram retiradas alíquotas de 10 g e homogeneizadas com 90 mL de água destilada esterilizada; a partir desta suspensão, foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-3} . Da última diluição, foi inoculado 0,1 mL, em placa, (cinco placas por amostra, contendo meio de cultura sólido de batata-dextrose-ágar, BDA (Batata 200 g, dextrose 20 g, ágar 15 g) acidificado com ácido láctico (3 gotas / 100 mL). O inóculo foi espalhado com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após 5 dias, foi feita a repicagem para obtenção de culturas axênicas.

Os isolados foram identificados conforme o local da coleta das amostras de solo. O isolado T4R (T: *Trichoderma* sp.; 4: número do pivô central; R: identificação da fazenda produtora de feijão), foi retirado de uma área (pivô) de cultivo, portanto, com intensa aplicação de defensivos agrícolas. O isolado TSV foi obtido de uma área não cultivada e sem aplicação de produtos químicos (T: *Trichoderma* sp.; SV: selvagem). Foi utilizado também, um produto comercial formulado à base de isolados de *Trichoderma* sp. veiculados em arroz. Este foi denominado PCT (produto comercial *Trichoderma* sp.).

3.2.1.2 Obtenção e multiplicação do inóculo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

Para isolar *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* plantas de feijão apresentando sintomas de escurecimento da raiz e amarelecimento das folhas foram lavadas em água corrente, cortadas em pequenos pedaços e desinfestadas com álcool 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% durante 1 minuto e três lavagens com água destilada esterilizada. Os pedaços da planta desinfestados foram, então, plaqueados em meio de cultura BDA acidificado com ácido láctico, e mantidos a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, por 14 dias. Posteriormente, um esporo de cada cultura foi isolado e plaqueado sob as mesmas condições anteriormente descritas para obtenção de culturas puras. A confirmação da identificação do patógeno como sendo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi feita no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade da UFRGS.

3.2.1.3 Avaliação do potencial antagônico de *Trichoderma* sp. a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio BDA.

Discos de micélio, de 0,6 cm de diâmetro, dos isolados T4R, TSV e PCT de *Trichoderma* sp. e do isolado *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foram inoculados em lados opostos da placas contendo somente meio de cultura BDA acidificado com ácido láctico. Foram feitos confrontos inoculando-se o antagonista 48 horas antes do patógeno, 48 horas depois e junto com o patógeno. A Testemunha consistiu de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* inoculado sem o *Trichoderma* sp. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições para cada tratamento. As placas foram incubadas a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, até os isolados do antagonista e do patógeno se encontrarem. Foi feita medição do crescimento do patógeno

no dia do encontro das colônias. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias.

3.1.2.4 Interferência *in vitro* de fungicidas no crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

O efeito de fungicidas sobre o *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi estudado avaliando-se o crescimento do isolado do patógeno na presença dos mesmos. Primeiramente, a adição dos produtos foi feita no meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acidificado com ácido láctico, 3 gotas / 100mL , depois de autoclavado e ainda líquido (40°C), de modo que a concentração final do produto foi estabelecida considerando o volume de meio utilizado. Foram utilizadas 4 tratamentos, sendo três concentrações para cada fungicida (a dose recomendada pelo fabricante (Tabela 1), a metade e o dobro desta dose) mais a Testemunha, constituída apenas de BDA. Em seguida, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri e foram preparadas quatro placas por tratamento. A inoculação do isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi feita com discos de micélio, no centro da placa. As placas foram incubadas em câmara de crescimento, com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 horas, por 14 dias. A avaliação foi feita medindo-se o diâmetro das colônias no décimo quarto dia. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias.

TABELA 1. Doses utilizadas para cada fungicida

Fungicida (nome comercial)	Dose utilizada no experimento
Cabrio Top	1,5 kg / 300 L de água*
Captan SC	400 mL / 100L
Comet	0,3 L / 300 L
Derosal 500	0,5L / 300 L
Derosal Plus	300 mL / 100 kg de sementes
Frownicide 500 SC	1,0 L / 1000 L
Nativo	0,6 L / 300L
Opera	0,75L / 300L
Stratego	0,6 L / 300L
Vitavax-Thiram 200 SC	300 mL / 100 kg de sementes

* Dose recomendada pelo fabricante

O segundo teste foi feito mergulhando-se discos de 0,6 cm de diâmetro de papel filtro em soluções de fungicida com água destilada esterilizada. As concentrações utilizadas foram as mesmas citadas no teste anterior. Os discos de papel filtro foram encharcados na solução e colocados em um lado das placas de Petri, do lado oposto foi colocado um disco de BDA contendo micélio e esporos do patógeno. Cada tratamento contou com quatro repetições e a Testemunha que consistiu somente do isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* na placa. Os tratamentos foram mantidos em câmara de crescimento, com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 horas. No décimo quarto dia foi medido do halo de inibição formado em torno do disco de papel filtro. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias.

3.2.2 Testes em casa de vegetação

Para o experimento na casa de vegetação foram utilizados dois fungicidas: Derosal Plus e Vitavax-Thiram 200 SC. Estes produtos são recomendados pelos fabricantes para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e são utilizados pelos produtores de feijão da cidade de Cristalina, GO. Foram utilizados também, três isolados

de *Trichoderma* sp.: T4R, TSV e PCT. Estes isolados foram utilizados, pois foi coletado em diferentes locais, além do isolado T4R ter se mostrado o menos sensível a fungicidas em testes realizados anteriormente.

3.2.2.1 Produção do inóculo de *Trichoderma* sp.

Para produção de inóculo foram utilizados sacos plásticos transparentes de 2 L com 250 g de grãos de arroz sem casca e esterilizados em autoclave por 30 min a 120°C, estes foram inoculados com 50 mL de uma suspensão com 10^7 esporos de *Trichoderma* sp. dos isolados T4R e TSV, cada isolado foi inoculado separadamente. Após a incubação, por 14 dias, a 23 ± 1 °C, o substrato colonizado foi seco a 36°C, por aproximadamente quatro dias. Em seguida, o inóculo de cada um dos isolados foi triturado e passado em peneira de 40 mesh. O produto comercial PCT já é veiculado em grãos de arroz triturados.

3.2.2.2 Produção do inóculo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

Para produção de inóculo do patógeno foram utilizado sacos plásticos transparentes de 2 L com 250 g de grãos de arroz sem casca e esterilizados em autoclave por 30 min a 120°C, estes foram inoculados com 50 mL de uma suspensão com 10^7 esporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, de água destilada esterilizada. Após a incubação, por 14 dias, a 23 ± 1 °C (Figura 1), o substrato colonizado foi seco a 36°C, por aproximadamente quatro dias. Em seguida, o inóculo foi triturado e peneirado.



FIGURA 1. Inóculo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em arroz após 14 dias de incubação.

3.2.2.3 Esterilização do substrato

Para o cultivo do feijão foram utilizadas duas partes de vermiculita e uma parte de areia. A areia foi lavada em água corrente e posta para secar em estufa a 40 °C. Após dois dias de secagem a areia, ainda úmida, foi autoclavada por 30 min a 120°C ou 1 atm. A vermiculita foi esterilizada também por 30 min a 120°C ou 1 atm.

3.2.2.4 Montagem do experimento.

O experimento foi feito na casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da UFRGS.

A cultivar de feijão utilizado foi a carioca por ser suscetível a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Foram feitos os seguintes tratamentos:

1. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*

2. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + Vitavax-Thiram 200 SC
3. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + Derosal Plus
4. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + T4R
5. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + TSV
6. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + PCT
7. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + T4R + Vitavax-Thiram 200 SC
8. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + TSV + Vitavax-Thiram 200 SC
9. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + PCT + Vitavax-Thiram 200 SC
10. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + T4R + Derosal Plus
11. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + TSV + Derosal Plus
12. *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* + PCT + Derosal Plus
13. T4R
14. TSV
15. PCT
16. Testemunha

Para a execução do experimento, copos plásticos com capacidade para 300 mL foram cheios com uma mistura composta por duas partes de vermiculita e uma parte de areia (Figura 2). As sementes para cada tratamento foram pesadas e inoculadas com os fungicidas e os isolados do antagonista e do fitopatógeno conforme os tratamentos propostos. Os fungicidas, utilizados como tratamento de sementes, foram aplicados conforme a dosagem recomendada pelo fabricante (300 mL do produto para cada 100 kg de sementes). Os isolados de *Trichoderma* sp. e o isolado de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* foram inoculados na forma de tratamento de sementes conforme a dosagem utilizada para a aplicação do produto comercial formulado à base de *Trichoderma* sp., ou seja, 5 g do

produto para cada 60 kg de sementes. Cada tratamento teve quatro repetições com duas sementes cada uma. A Testemunha consistiu de sementes não tratadas.



FIGURA 2. Experimento montado em casa de vegetação. Copos plásticos contendo mistura de areia e vermiculita. Cada tratamento teve quatro repetições.

Após três semanas foram retirados, de uma das repetições, segmentos de raízes ao acaso que foram plaqueadas em meio batata-dextrose-agar (BDA) acidificado com ácido lático, e em *Trichoderma seletive médium* (Dhingra & Sinclair, 1995) composto por: glicose 3,0 g; KCl 0,15 g; MgSO₄7H₂O 0,2 g; NH₄NO₃ 1,0 g; K₂HPO₄ 0,9 g; Agar 15 g e água 1L. Após a esterilização do meio, acrescentou-se 250 mg de clorofenicol, 200 mg de quintozene e 150 mg de rosa de bengala. As amostras tiveram 3 repetições para cada meio de cultura com 4 segmentos de raízes. Após sete dias de incubação a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, foi feita a contagem de raízes com presença de *Trichoderma* sp. e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Avaliação do potencial antagonico de *Trichoderma* sp. a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio BDA.

A seleção *in vivo* é essencial para um bom resultado do biocontrole em campo, mas a seleção de antagonistas *in vitro*, apesar das restrições quanto à sua eficácia, é uma técnica bastante utilizada na detecção de potenciais biocontroladores, como testes preliminares, por consumir pouco tempo, espaço e material (Faria et al., 2002). O método de cultura pareada em disco de agar é o mais utilizado em estudos de antagonismo *in vitro*, existindo inúmeros relatos de sucesso na seleção de microrganismos, visando ao controle biológico de fitopatógenos (Mariano, 1993).

No teste de confrontos entre os isolados do antagonista contra o patógeno, todos os isolados mostraram potencial antagonico a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* principalmente quando o patógeno foi inoculado simultaneamente ou 48 horas depois que os isolados de *Trichoderma* sp. (Tabela 2).

O antagonismo de *Trichoderma* sp. é explicado pela produção de antibióticos, de amplo espectro de ação, tais como glitoxina, viridina, trichodermina, suzuczilina, alameticina e dermadina, que têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos (Dennis & Webster, 1971). Além de antibióticos, *Trichoderma* sp. produzem enzimas, como celulase e hemicelulase, capazes de degradar materiais lignocelulolíticos e causar a lise na parede de células de fungos fitopatogênicos (Melo, 1996).

TABELA 2. Médias originais do crescimento de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* inoculados 48h antes, simultaneamente e 48h após a inoculação de isolados de *Trichoderma* sp. em meio de cultura.

Tratamentos	Desenvolvimento de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> na presença dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp.		
	48h antes do antagonista	Junto com o antagonista	48h depois do antagonista
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> x T4R	2,40 c*	1,09 b	0,62 d
Testemunha	6,50 a	2,00 a	1,25 b
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> x TSV	2,84 bc	1,02 b	0,60 d
Testemunha	6,50 a	2,40 a	1,10 bc
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> x PCT	1,07 d	0,90 b	0,17 e
Testemunha	6,50 a	2,40 a	1,70 a

*- Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não são estatisticamente diferentes (Tukey, 5%)

3.3.2 Interferência *in vitro* de fungicidas no crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

A Tabela 3 mostra os resultados referentes ao experimento em que fungicidas, em três dosagens, foram incorporados ao BDA. O crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* diferiu estatisticamente da Testemunha na presença de todos os fungicidas e nas três doses testadas. O patógeno apresentou algum desenvolvimento na presença dos fungicidas Cabrio Top, Captan SC, Comet, Frowncide 500 SC Stratego e na metade da dose recomendada do fungicida Vitavax-Thiram 200 SC. Com os fungicidas Derosal 500, Derosal Plus (Figura 3), Nativo, Opera e nas doses recomendada e dobro da dose do fungicida Vitavax-Thiram o isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* não se desenvolveu.

No trabalho realizado por Batista et al. (2002) o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* teve seu desenvolvimento reduzido quando inoculado em meio de cultura BDA adicionado com o fungicida carbendazim (Derosal 500 e Derosal Plus) em uma dose de 0,5 g.i.a.L⁻¹.

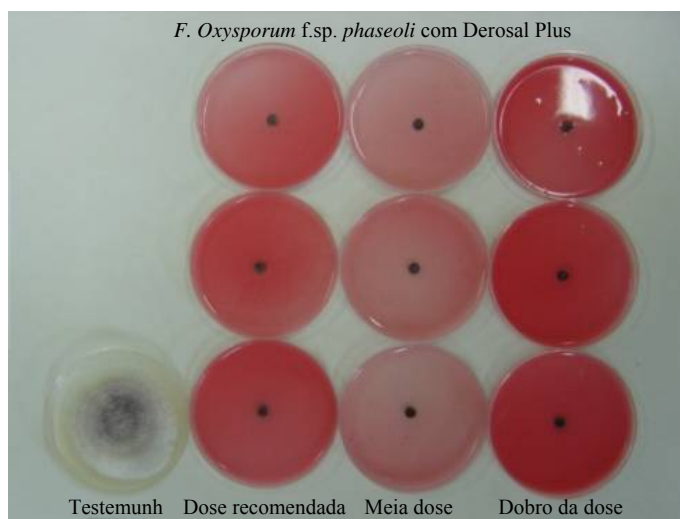


FIGURA 3. *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* na presença de três doses do fungicida Derosal Plus, depois de sete dias de incubação.

No trabalho realizado por Fischer et al. (2006) foram avaliados a eficiência *in vitro* de oito fungicidas na inibição do crescimento micelial de três isolados de *F. subglutinans*. Os produtos tebuconazole (fungicida Nativo) e carbendazim (Derosal 500 e Derosal Plus) foram os mais eficientes na inibição dos isolados enquanto o fungicida Captan se mostrou pouco eficiente.

Dentre os fungicidas sistêmicos, os benzimidazóis são os mais conhecidos devido as suas excelentes propriedades sistêmicas e eficácia no controle de importantes agentes fitopatogênicos (Ghini & Kimati, 2002).

O grupo das estrobilurinas é desenvolvido a partir de compostos naturais produzidos por cogumelos, e atua na inibição da respiração mitocondrial de fungos, impedindo a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c (Barlett et al., 2002). Nota-se que os produtos Cabrio Top, Comet, Nativo, Opera e Stratego, apesar de pertencerem ao grupo das estrobilurinas revelaram diferenças significativas entre eles. *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* apresentou crescimento na presença dos fungicidas Cabrio Top, Comet e Stratego e não se desenvolveu na presença de nenhuma das doses dos

fungicidas Nativo e Opera. Portanto, dentro do grupo das estrobilurinas, os fungicidas Nativo e Opera se mostraram eficientes no controle deste agente fitopatogênico.

TABELA 3. Diâmetro (cm) do crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio de cultura contendo discos de papel filtro impregnados com diferentes fungicidas.

Fungicidas	Medida do diâmetro (cm) da colônia
Cabrio Top	
5g / L	3,45 de*
2,5 g / L	4,50 c
10 g / L	3,00 ef
Captan SC	
4 mL / L	0,92 ij
2 mL / L	1,10 hij
8 mL / L	0,82 j
Comet	
1 mL / L	3,32 de
0,5 mL / L	4,15 cd
2 mL / L	2,12 fg
Derosal 500	
0,83 mL / L	0,60 j
0,415 mL / L	0,60 j
1,66 mL / L	0,60 j
Derosal Plus	
3 mL / L	0,60 j
1,5 mL / L	0,60 j
6 mL / L	0,60 j
Frownicide 500 SC	
1,5 mL / L	2,10 fg
0,75 mL / L	2,05 fgh
3 mL / L	2,00 gh
Nativo	
2 mL / L	0,60 j
1 mL / L	0,60 j
4 mL / L	0,60 j
Opera	
2,5 mL / L	0,60 j
1, 25 mL / L	0,60 j
5 mL / L	0,60 j
Stratego	
2 mL / L	2,00 gh
1 mL / L	2,52 efg
4 mL / L	1,92 gh
Vitavax-Thiram 200 SC	
3 mL / L	0,60 j
1,5 mL / L	1,90 ghi
6 mL / L	0,60 j
Testemunha	8,50 a

*Médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (Tukey 5%)

A Tabela 4 mostra os resultados referentes ao experimento com os discos de papel filtro embebidos em soluções com três dosagens de cada fungicida. *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* não diferiu estatisticamente da Testemunha quando esteve na presença dos discos de papel filtro contendo as diferentes doses dos fungicidas Cabrio

Top, Derosal 500, Nativo e Stratego. Nos tratamentos com discos contendo a dose recomendada e a meia dose dos fungicidas Captan SC, Comet e Opera o desenvolvimento do patógeno não diferiu estatisticamente da Testemunha. Na presença dos discos de papel filtro contendo as três doses dos fungicidas Derosal Plus, Frownicide 500 SC e Vitavax-Thiram 200 SC o desenvolvimento do patógeno diferiu estatisticamente da Testemunha.

TABELA 4. Halos de inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio de cultura contendo discos de papel filtro impregnados com diferentes fungicidas.

Fungicidas	Medida do halo de inibição (cm)
Cabrio Top	
5g / L	0,00 f*
2,5 g / L	0,00 f
10 g / L	0,00 f
Captan SC	
4 mL / L	0,48 ef
2 mL / L	0,33 ef
8 mL / L	0,79 abcde
Comet	
1 mL / L	0,40 ef
0,5 mL / L	0,34 ef
2 mL / L	0,52 de
Derosal 500	
0,83 mL / L	0,00 f
0,415 mL / L	0,00 f
1,66 mL / L	0,00 f
Derosal Plus	
3 mL / L	1,29 a
1,5 mL / L	1,12 abc
6 mL / L	1,39 a
Frownicide 500 SC	
1,5 mL / L	1,44 a
0,75 mL / L	1,04 abcd
3 mL / L	1,44 a
Nativo	
2 mL / L	0,00 f
1 mL / L	0,00 f
4 mL / L	0,44 f
Opera	
2,5 mL / L	0,49 def
1, 25 mL / L	0,40 ef
5 mL / L	0,62 bcde
Stratego	
2 mL / L	0,00 f
1 mL / L	0,00 f
4 mL / L	0,00 f
Vitavax-Thiram 200 SC	
3 mL / L	1,16 ab
1,5 mL / L	1,12 abc
6 mL / L	1,44 a
Testemunha	0,00 f

*Médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (Tukey 5%)

O teste em que os fungicidas foram adicionados ao meio de cultura BDA parece ser mais eficiente quando se quer avaliar o desenvolvimento de algum microrganismo. Isso porque o microrganismo, nesse caso o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, entra em contato direto com o fungicida. No teste em que discos de papel filtro foram embebidos em soluções dos fungicidas e confrontados com o fitopatógeno, os resultados não concordaram com o primeiro teste. Os fungicidas Derosal 500 e Nativo inibiram totalmente o desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* no primeiro experimento *in vitro*, já no segundo experimento *in vitro*, os tratamentos não diferiram estatisticamente da Testemunha.

3.3.3 Experimentos em casa de vegetação

Os resultados quanto à influência dos tratamentos nas plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) estão relacionados na Tabela 5.

TABELA 5. Influência dos tratamentos realizados no experimento em casa de vegetação sobre as plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tratamento	Estado das plantas (6 plantas por tratamento)
1. Testemunha	6 plantas sadias
2. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	6 plantas apresentando sintomas de escurecimento de raiz
3. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + T4R	6 plantas apresentando sintomas de escurecimento de raiz
4. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + TSV	6 plantas sadias
5. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + PCT	3 plantas sadias e 3 plantas apresentando escurecimento das raízes
6. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + T4R + Derosal Plus	4 plantas sadias e 2 plantas apresentando escurecimento nas raízes
7. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + TSV + Derosal Plus	4 plantas sadias e 2 plantas apresentando escurecimento nas raízes
8. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + PCT + Derosal Plus	5 plantas sadias e 1 plantas apresentando escurecimento nas raízes.
9. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + T4R + Vitavax-Thiram 200 SC	4 plantas sadias e 2 plantas apresentando escurecimento nas raízes
10. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + TSV + Vitavax-Thiram 200 SC	4 plantas sadias e 2 plantas apresentando escurecimento nas raízes
11. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + PCT + Vitavax-Thiram 200 SC	4 plantas sadias e 2 plantas apresentando escurecimento nas raízes.
12. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + Derosal Plus	6 plantas sadias
13. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> + Vitavax-Thiram 200 SC	6 plantas sadias
14. T4R	6 plantas sadias
15. TSV	6 plantas sadias
16. PCT	6 plantas sadias

No tratamento onde foi inoculado somente o *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, todas as plantas apresentaram sintomas de escurecimento na raiz. Nos tratamentos com o agente fitopatogênico e os isolados de *Trichoderma* sp. houve controle efetivo da doença somente pelo isolado TSV. Todas as plantas apresentaram sintomas de escurecimento na raiz quando inoculadas com o isolado T4R e com o fitopatógeno e 50 % das plantas apresentaram os mesmos sintomas com o isolado PCT e o fitopatógeno (Figura 4).



FIGURA 4. Plantas cujas sementes foram tratadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e com o isolado PCT.

Nos tratamentos em que as sementes foram tratadas com o fitopatógeno, os isolados de *Trichoderma* sp. e o fungicida Derosal plus, 33% das plantas apresentaram sintomas de escurecimento de raiz quando tratadas com o isolado T4R, a mesma porcentagem de plantas doentes ocorreu no tratamento com o isolado TSV e 16,6 % das plantas apresentaram sintoma da doença quando tratadas com o isolado PCT.

Quando as sementes foram tratadas com *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*, isolados de *Trichoderma* sp e o fungicida Vitavax-Thiram 200 SC, 33 % das plantas, em cada tratamento, apresentaram sintomas de escurecimento nas raízes.

Nos tratamentos onde as sementes foram tratadas pelos fungicidas e inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, as plantas não apresentaram sintomas da doença.

Os resultados mostraram que os dois fungicidas testados, Derosal Plus e Vitavax-Thiram 200 SC, foram efetivos no controle do agente fitopatogênico, principalmente quando as sementes foram tratadas somente com esses produtos. Os isolados de *Trichoderma* sp. T4R e PCT não foram efetivos no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp *phaseoli* *in vivo*. Apenas o isolado TSV apresentou controle sobre o fitopatógeno nos experimentos *in vivo*.

Em todas as plantas que apresentaram sintomas do agente patogênico *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* houve a recuperação do mesmo quando os fragmentos de raízes foram colocados em meio de cultura BDA. Nos tratamentos em que houve inoculação dos isolados de *Trichoderma* sp. na presença ou não dos fungicidas, estes também foram recuperados quando os fragmentos de raízes foram colocados em *Trichoderma* seletive médium (Figura 5).



FIGURA 5. Isolado de *Trichoderma* sp. T4R em *Trichoderma* seletive médium, recuperados de raízes de plantas que tiveram suas sementes tratadas com Derosal Plus (300 mL / 100 kg de sementes) e com o presente isolado.

Os isolados T4R, TSV e PCT já haviam sido testados *in vitro* quanto ao seu desenvolvimento na presença de fungicidas. Todos os isolados se desenvolveram *in vitro*

na presença do fungicida Vitavax-Thiram 200 SC em três doses testadas (1,5 mL/ L, 3 mL / L e 6 mL / L). Já o fungicida Derosal Plus inibiu completamente o desenvolvimento *in vitro* desses isolados em todas as doses testadas (1,5 mL/ L, 3 mL / L e 6 mL / L). Isso comprova que os resultados de testes *in vitro* não descartam a possibilidade de isolados de *Trichoderma* sp. se desenvolverem *in vivo*. Estudos *in vitro* têm a vantagem de expor ao máximo o microrganismo à ação do produto químico, fato que não ocorre em condições de campo, onde vários fatores servem de obstáculo a essa exposição, assim, constatada a inocuidade de um produto em laboratório, espera-se que o mesmo seja seletivo no campo. Por outro lado, a alta toxicidade de um produto *in vitro* nem sempre indica a sua elevada toxicidade no campo, mas sim a possibilidade da ocorrência de danos dessa natureza (Moino Jr. & Alves, 1998).

Os três isolados de *Trichoderma* sp. T4R, TSV e PCT foram efetivos no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, agente causal da murcha do feijoeiro, em testes *in vitro*, principalmente quando inoculados 48 horas antes do fitopatógeno e simultaneamente com o fitopatógeno.

Os fungicidas Derosal 500, Derosal Plus, Nativo, Opera e Vitavax-Thiram 200 SC foram efetivos no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em experimento *in vitro*, quando adicionados ao meio de cultura BDA.

Os isolados T4R e PCT não foram efetivos no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em experimento *in vivo*, somente as plantas cujas sementes foram tratadas com o isolado TSV e com o fitopatógeno não apresentaram sintomas de escurecimento da raiz.

No experimento em casa de vegetação, os fungicidas Derosal Plus e Vitavax-Thiram 200 SC não inibiram o desenvolvimento dos isolados de *Trichoderma* sp. T4R, TSV e PCT.

4 CONCLUSÕES

O isolado T4R de *Trichoderma* sp. se mostrou o menos sensível aos fungicidas nos testes *in vitro*.

O isolado T6R de *Trichoderma* sp. e o produto PCT foram os mais sensíveis aos fungicidas em testes *in vitro*.

Os produtos que apresentaram menos toxicidade aos isolados de *Trichoderma* sp. *in vitro* foram o Stratego e o Vitavax-Thiram 200 SC.

Os fungicidas que apresentaram mais toxicidade aos isolados de *Trichoderma* sp. *in vitro* foram Derosal 500, Derosal Plus, Nativo e Opera.

O fungicida Frownicide 500 SC apresentou características antiesporulantes em todos os isolados de *Trichoderma* sp. nos experimentos *in vitro*.

Os fungicidas Derosal 500, Derosal Plus, Nativo, Opera e Vitavax-Thiram 200 SC foram efetivos na inibição do desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro*.

Os isolados de *Trichoderma* sp. T4R, TSV e o produto PCT foram efetivos no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *in vitro*, quando inoculados 48 horas antes e simultaneamente com o patógeno.

Em experimentos *in vivo*, somente o isolado TSV foi efetivo no controle do fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Os isolados de *Trichoderma* sp. T4R, TSV e o produto PCT foram recuperados de raízes de plantas cujas sementes foram tratadas com Derosal 500 e Vitavax-Thiram 200 SC.

5 SUGESTÕES

Realizar novas avaliações com o fungicida Frowncide 500 SC em isolados de *Trichoderma* sp., testando diferentes doses do produto, diferentes meios de cultura, valores de pH's e temperaturas de incubação.

Experimentos em casa de vegetação testando os isolados de *Trichoderma* sp. com diferentes doses dos fungicidas .

Realizar novos experimentos em casa de vegetação testando novos métodos de inoculação e diferentes concentrações do inóculo dos isolados de *Trichoderma* sp. e de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Testar os fungicidas Vitavax-Thiram 200 SC e Derosal Plus na metade da dose recomendada com os isolados de *Trichoderma* sp. para avaliar suas eficiências no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4.ed. Academic Press: San Diego, 1997. 635 p.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5.ed. Academic Press: San Diego, 2004. 922 p.
- ALVES, S.B.; MOINO Jr. A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 217-238.
- BARLETT, D.W.; CLOUGH, J.M.; GODWIN, J.R.; HALL, A.A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, Brighton-UK, v.58, 649-662, 2002
- BATISTA, D.C.; OLIVEIRA, S.M.A.; TAVARES, S.C.C.H.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R.A.F.; SILVA, R.L.X. Efeitos de fungicidas inibindo o crescimento in vitro de *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* e interferência com *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, Recife – PE, v.28, n. 4, 2002. p.305-309.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Manejo de fitopatossistemas: conceitos básicos. In: BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. p.189-229.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1995. p. 717-728.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CANEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; MOHAN, S. K.; BIANCHINI, A.; MENEZES, R.J. **Doenças do feijoeiro no Estado do Paraná: Guia para identificação e controle**. Londrina: IAPAR, 1983. p.26.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G.; Doenças do Feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.A.E.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.376-399.
- CAMPAGNOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPAGNOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna-SP: EMBRAPA, SP, 2003. Cap.1.

CARDOSO, C.O.N.; KIMATI, N.H.; FERNANDES, N.G. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, causando murcha vascular em feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**. São Paulo – SP, v. 23, p. 273-276, 1966.

CARVER, C. E.; PITT, D.; RHODES, D. J. Aetiology and biological control of fusarium wilt of pinks (*Dianthus caryophyllus*) using *Trichoderma aureoviride*. **Plant Pathology**, Bracknell-UK, v. 45, p. 618-630. 1996.

CASSIOLATO, A.M.R.; BAKER, R.; MELO, I.S. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* por mutantes de *Trichoderma harzianum* em segmentos de aipo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.120-122, 1996.

CHET, I.; BAKER, R. Induction of suppressives to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n.5, p.994-998, 1980.

CHET, I.; BAKER, R. Isolation and biocontrol potencial of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.71, n.3, p.286-290, 1981.

CONCEIÇÃO, M. Z. Manejo integrado em defesa vegetal. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo Integrado. Doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2000. p.01-81.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.;POZZA, E.A.;ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli* em sementes de feijoeiro através da restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.27, n.5, p.1023-1030, 2003.

COSTA, A.F. da; MENEZES, M.; MIRANDA, P. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Pernambuco, Alagoas. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, Goiânia, 1982. **Anais**. Goiânia: EMBRAPA, CNPAF, 1982, p.282-284.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species – groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, n.1, p.25-39, 1971.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. Basic Plant Pathology Methods. 2^a ed. London: CRC Press. 1995. 435p.

ECHANDI, E. Amarillamento del frijol (*Phaseolis vulgaris* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Turrialba**, Turrialba, v.17, n.4, p, 409-410, 1967.

FARIA, A.Y.K.; CASSETARI NETO, D.; ALBUQUERQUE, M.C.F. Atividade antagônica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* a patógenos de sementes de algodoeiro. **Agricultura Tropical**. Cuiabá, v.6, n.1, p.59-68, 2002.

FISCHER , I. H.; ALMEIDA, A.M.; GARCIA, M.J.D.M. Efeito de fungicidas no crescimento micelial de *Fusarium subglutinans in vitro*. **O Biológico**. Bauru, v.8, suplemento 2, p.1-4, 2006.

GEIER, P.W. Management of insect pests. **Annual Review Entomology**, 1966, v.11, p.471-490.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: EMBRAPA, , SP. 2002, p. 01-77.

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*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n.5, p.1167-1172, 1980.

ITO, M.F.; CASTRO, J.L.; MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D. Importância do uso de sementes sadias de feijão e tratamento químico. **O Agrônomo**, Campinas. v.55, n. 1, 2003, p.14-16.

KIMATI, H. Controle Químico. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3 ed. São Paulo: Ceres 1995. v.1. p. 761-785.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) In: GALLI, F. (Coord.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, cap. 19, p.297-318.

KREDICS, L.; ANTAL, Z.; MANCZINGER, L.; NAGY, E. Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains for heavy metal resistance. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, Szeged, v.33, p.112-116, 2001.

LARKIN, R. P.; FRAVEL, D. R.; Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of fusarium wilt of tomato. **Plant Disease**, Beltsville, v. 82, n. 9, p. 1022-1028, 1998.

LIMA, E.R. *et al.* Custo de produção e lucratividade do feijoeiro da seca no município de Pereira Barreto, SP. **Cultura Agrônômica**, Ilha Solteira, v.12, n.2, p. 131-143, 2003.

LIU, S.; BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n.5, p.404-412, 1980.

LOBO Jr., M.; ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.521-526, 2000.

LOUREIRO, E.S.; MOINO Jr. A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G.C. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, Campinas, v. 32, n.2, p. 263-269, 2002.

MAGALHÃES, H. http://www.21.sede.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2005. Acesso em 15 de jan 2005.

MARIANO, R de L.R. Métodos de seleção in vitro para controle microbiológico. **Revisão anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.1, p.369-409, 1993.

MAY, L.L.; KIMATI, H. Controle de *Phytophthora parasitica* com fungicidas e efeito desses produtos no crescimento micelial de *Trichoderma* sp. **Summa Phytopathologica**. Piracicaba – SP, v.26, n.1, 2000, p.52-57.

MEDEIROS, E.V.; ALBUQUERQUE, J.F.C.; MICHEREFF, S.J.; SALES JÚNIOR, R.; NUNES, G.H.S. Controle de *Monosporascus cannonballus* por tiazolidina-2,4-diona e efeito sobre o agente de controle biológico *Trichoderma* spp. **Revista Caatinga**, Mossoró. v.19, n.1, 2006, p.44-50.

MELO, I. S.; Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de Plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPDA, 1991. p. 7-23.

MELO, I. S.; Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de.; AZEVEDO, J. L. de. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

MELO, I. S.; *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 261 – 295, 1996.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; OLIVEIRA, C.; HATANO, L.T. **Avaliação do efeito de pesticidas no crescimento de *Cercospora caricis***. Brasília: Comunicado técnico: EMBRAPA: Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2003.

MOINO Jr., A.; ALVES, S.B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen.). **Anais da Sociedade de Entomologia**, Piracicaba, v.27, p.611-620, 1998.

MOINO Jr., A.; ALVES, S.B. Efeito de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Scientia Agrícola**, v.56, n.1, p. 217-224, Piracicaba, 1999.

MORAES, W.B.C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, p.175-190, 1992.

MOHAN, S.K.; BIANCHINI, A.; MENEZES, R.J. **Doenças do feijoeiro no Estado do Paraná**: guia para identificação e controle. Londrina: IAPAR, 1983. p.26.

NEL, B.; STEINBERG, C.; LABUSCHAGNE, N.; VILJOEN, A. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of fusarium wilt of banana. **Crop Protection**, Dijon, v.26, n.4, p.697-705, 2007.

NEMEC, S.; DATNOFF, L. E.; STRANDBEGR, J. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. **Crop Protection**. Sanford, v. 15, p. 735-742. 1996.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.23, p.23-54, 1985.

PEREIRA, J.C.R.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L.; MATSUOKA, K.; SILVA-ACUÑA, R.; VALE, F.X.R. Controle integrado de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.2, 1996, p.254-259.

PORTES, T. A. Ecofisiologia. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Coord.). **Cultura do Feijoeiro Comum**. Piracicaba-SP. 1996, p.101-137.

RAVA, C.A.; SARTORATO, A. Controle químico de doenças fúngicas. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Coord.). **Cultura do Feijoeiro Comum**. Piracicaba-SP: 1996. p.723-729.

REID, T.C.; HAUSBECK, M.K.; KIZILKAYA, K. Use of fungicides and biological controls in the suppression of Fusarium crown and root rot of asparagus under greenhouse and growth chamber conditions. **Plant Disease**, East Lansing, v.86, n.5, p.493-498, 2002.

REIS, A.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de fusarium do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Recife, v. 21, n.1, p.16-20, 1995.

ROIGER, T.C.; JEFFERS S. N.; CALDWELL, R. W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Britain, v.43, n.4, p. 353 – 359, 1991.

ROJO, F.G.; REYNOSO, M.M.; FERREZ, M.; CHULZE, S.N.; TORRES, A.M. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. **Crop Protection**, Córdoba, v.26, n.4, p.549-555, 2007.

SALGADO, C.H.G.; LARRAMENDI, L.R.; ARJONA, C.; PUERTAS, A. FONSECA, M. Efecto de la aplicacion de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composicion cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de solanaceaea y su influencia em el crecimiento vegetativo. **Investigaciones Agropecuarias: Produccion Producto Vegetal**, Bayamo, v.14, n. 1-2, 1999.

SILVA, A.C.F. Uso de radiação gama para obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai e *Trichoderma viride* Pers.: Fr. Com capacidade melhorada no controle ao *Sclerotinia saclerotiorum* (Lib.) de Bary. Piracicaba, 1997. 143 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo, 1997.

SILVA, A.C.F.; ROSA, C.R.E.; MELO, I.S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* sp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n. 3, p. 395-399, 1999.

SIVAN, A.; CHET, I. Integrated control of Fusarium crown and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil sterilization. **Crop Protection**, Israel, v.12, p. 380-386. 1993.

THAVENGALU, R.; PALANISWAMI, A.; VELAZHAHAN, R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wit of banana. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Tâmil Nadu, v.103, p.259-263, 2004.

TUSET-BARRACHINA, J. J. Estudios sobre la marchitez y secado de plantas herbáceas. **Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agronômicas**. Serie Producción vegetal, n.3, 1973, p.73-93.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F. X. R. Controle químico de doenças de hortaliças no contexto do manejo integrado de doenças. In: ZAMBOLIM, L. **Manejo Integrado. Doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2000.

WANG, H. *et al.* Fusarium root rot of coneflower seedlings and integrated control using *Trichoderma* and fungicides. **BioControl**. Netherlands, v. 50, p. 317-329, 2005.