

ANAIS DA 3ª REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS

Anais...

1989

PC-PP-1989.00231



CNPMA-1390-1

SÃO PAULO

UNIVERSIDADE

9 A 11 DE OUTUBRO DE 1989

PROMOÇÃO:

Departamento de Genética ESALQ – FEALQ USP
Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da
Agricultura EMBRAPA



3rd BRAZILIAN
MEETING
ON BIOLOGICAL
CONTROL OF PLANT
DISEASES

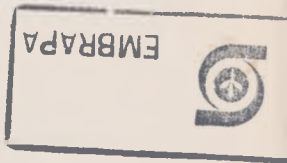
UNIVERSITY OF SÃO PAULO
SÃO CARLOS CAMPUS



TRICHODERMA POLYSPORUM

-1989.00231

*Doação
Itamar*



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Departamento de Genética

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura

ANAIS DA III REUNIÃO BRASILEIRA
SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS

COORDENAÇÃO
ITAMAR SOARES DE MELO

PIRACICABA - SÃO PAULO - BRASIL
9 a 11 de Outubro de 1989

COMISSÃO ORGANIZADORA/ORGANIZING COMMITTEE:

Ana Maria R. Cassiolato
Antônio Carlos da Silva
Cleuza M. Mantovanello
Ila Cardin Rêgo
Itamar Soares de Melo
Lindomar S.C. Alves
Raquel Ghini
Tânia M.C. dos Santos
Wagner Bettiol

EQUIPE DE APOIO/SUPPORT GROUP:

Adelaide F. Magalhães
Cláudia Silva
Eri Saito
Eloisa Peres
Gerhard Bandel
Gerson A. Conus
Valdir Próspero

CONFERENCISTAS :

John L. Lockwood
Rui P. Leite
Milton Luiz de Souza
Aike Kreftschmar
Regina Gomes Carneiro
Iracema de Moraes
Yigal Elad
Valkyria B.C. Moraes

MESA REDONDA :

Cleber N. Bastos
Rosa Maria V. Sanhueza
Carlos Alberto Lopes
Erlei M. Reis
Shinobu Sudo

AGRADECIMENTOS

Os promotores da III Reunião Brasileira Sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas agradecem a colaboração recebida das seguintes Instituições e Empresas:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP
- Newtec
- Sementes Agroceres S/A
- Fundação Cargill
- Asgrow do Brasil Sementes Ltda.
- Bioplanta Tecnologia de Plantas
- Alphasab
- Millipore
- Kibon S/A
- Piragua Distribuidora de Água
- Balas Berê

APRESENTAÇÃO

A necessidade cada vez mais premente de se estudar as relações entre planta, patógenos e microrganismos benéficos e aprender a manejar o ambiente de forma racional objetivando melhorar a produção agrícola contribuirá sobremaneira para o equilíbrio ecológico do agroecossistema.

O controle biológico de fitopatógenos tem apresentado avanços relevantes e alterações significativas tem ocorrido tanto na qualidade como na quantidade das pesquisas, com reflexos altamente positivos à comunidade.

Pretende-se com esta reunião a integração entre os participantes e, os conhecimentos adquiridos, venham estimular novos grupos de estudiosos, fazendo com que a pesquisa sobre controle biológico se estenda a todo território nacional.

Os promotores da III Reunião, o CNPDA e o Departamento de Genética/ESALQ, esperam que essa realização, substanciada na presente publicação, tenha o máximo de aproveitamento e desejam a todos os participantes um feliz conagraçamento durante esta estadia em Piracicaba.

Itamar Soares de Melo

PROGRAMA/PROGRAMME

09/Outubro/1989 - Segunda-feira/Monday

08:00 - 10:00 h - Inscrições/Registration

10:00 - 10:30 h - Abertura (Anfiteatro do Pavilhão de Engenharia)

Humberto de Campos - Diretor da ESALQ

José Machado - Prefeito de Piracicaba

Carlos Magno Campos da Rocha - Presidente da EMBRAPA

Flávio Fava de Moraes - Diretor Científico da Fapesp

Roland Vencovsky - Chefe do Departamento de Genética

Murilo X. Flores - Chefe DNPDA/EMBRAPA

Paulo Fernando Cidade de Araujo - Diretor Presidente/FEALQ

Walter Lazarini - Secretário da Agricultura

-PALESTRA DE ABERTURA/OPENNING SESSION

PRESIDENTE/Chairman: Dr. A. BERGAMIN FILHO - ESALQ/USP

10:45 - 11:30 H - CONFERÊNCIA/Conference: Dr. John L. Lockwood
Michigan State University

"The Role of Microbial Energy Stress in
Biological Control".

SESSÃO I/Session I - PRESIDENTE/Chairman:

Dr. M. HOMECHIN - CNPSo/EMBRAPA

SECRETARIO/secretary:

Dr. Eduardo Bagalhi - UNESP/BOTUCATU - SP

CONFERÊNCIAS/conferences

14:00 - 14:40 h - BACTERIAS PARA NUCLEAÇÃO DE GELO: SEU CONTROLE
E IMPORTANCIA NA AGRICULTURA Brasileira/Ice
nucleation bacteria: biocontrol and implication
on brazilian agriculture.
Dr. Rui P. Leite - IAPAR/PR

14:40 - 15:30 h - SOLARIZAÇÃO DO SOLO PARA CONTROLE DE
FITOPATÓGENOS/Solar heating for control of
plant pathogens in the soil.
Dr. Nilton Luiz de Souza - UNESP/BOTUCATU - SP.

15:30 - 16:00 h - Intervalo/Coffee break.

16:00 - 16:45 h - CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PÓS-
COLHEITA/Biocontrol of post-harvest diseases.
Dra. Aike Kreftschmar - CNPFT/EMBRAPA-VACARIA-
RS.

16:45 - 17:30 h - PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO SOLO NO BIOCONTROLE DE NEMATÓIDES DE GÊNERO Meloidogyne: Influência do tipo de solo e fontes de matéria orgânica/Using soil - borne fungi on biocontrol of nematode of the genus Meloidogyne: influence of soil type organic matter sources.
Dra. regina Gomes Carneiro - UEL, LONDRINA/PR.

10/Outubro/1989 - Terça-feira/Tuesday

08:30 - 11:30 h - SESSAO II/ Session II - PRESIDENTE/Chairman:
Dra. RAQUEL GHINI CNPDA/EMBRAPA
Secretário/Secretary:
Dr. Wagner Bettiol CNPDA/EMBRAPA

08:30 *p. 84* - Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. BETTIOL, W.

08:45 *p. 85* Efeito de Bacillus subtilis no controle do mofo cinzento (Botryllis cinerea) do morango. BETTIOL, W.

09:00 Efeito de proteção à ferrugem do cafeeiro determinado por bactérias do gênero Bacillus. ROVERATTI, D.S. et alii.

09:15 *p. 89* Sensibilidade de Agrobacterium tumefaciens a alguns antagonistas. BERIAM, L.O.S. et alii.

09:30 Seleção de Streptomyces no controle de Verticillium dahliae. ALMEIDA, O.C. et alii.

09:45 Efeito de Saccaromyces cerevisiae na redução da antracnose em plantas de milho mantidas em casa-de-vegetação. SILVA, S.R. et alii.

10:00 Intervalo/Coffee Break

10:15 *p. 92* Isolamento e regeneração de protoplastos de Talaromyces Flavus: um agente de biocontrole de fitopatógenos. Santos, T.M.C. & Melo, I.S.

10:30 *p. 93* Resistência de Verticillium lecanii: um agente de biocontrole de Hemileia vastatrix (agente causal da ferrugem do café) à benomyl e oxicloreto de cobre. CONUS, G.A. & MELO, I.S.

10:45 *p. 94* Obtenção de biótipos de Verticillium lecanii resistentes a luz ultravioleta. CONUS, G.A. & MELO I.S.

- 11:00 Temperaturas em campos solarizados e determinação de temperaturas letais para fitopatógenos do solo. LEFEVRE, A.F.V. & SOUZA, N.L.
- 11:15 Fungos endofíticos da gramínea Digitaria insularis ("capim amargoso"). BAGALHI, E & PAGLIARINI, A.C.

SESSÃO III/Session III - PRESIDENTE/Chairman:
 Dra. SIU MUI TSAI - CENA/USP
 Secretário/Secretary:
 Dr. Júlio Rodrigues Neto, I.B. - SP

CONFERENCIAS/Conferences

- 14:00 - 14:45 h - FORMULAÇÃO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO/
 Formulation with biological control agents.
 Dra. Iracema de Moraes - UNICAMP, Campinas - SP
- 14:45 - 15:30 h - CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS FOLIARES /
 Biological Control of Foliar Diseases.
 Dr. Yigal Elad - Agriculture Research Organization - Israel.
- 15:30 - 16:00 h - Intervalo/Coffee Break
- 16:00 - 16:45 h - INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM CAFEIEIRO PARA
 CONTROLE DA FERRUGEM (Hemileia vastatrix)/Resistance induction in coffee tree
 for control of rust (Hemileia vastatrix).
 Dra. Walkyria B.C.Moraes-Instituto Biológico-SP.
- 16:45 - 18:30 h - SESSÃO IV/Session IV - PRESIDENTE/Chairman:
 Dra. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER - ESALQ/USP
 Secretário/Secretary:
 Dr. Roberto Bonetti - CENA/USP
- 16:45 Purificação, clonagem e expressão da arcelina em espécies de feijão susceptíveis ao ataque de caruncho: estudo comparativo da expressão obtida através de técnicas de retrocruzamento e engenharia genética. SOUZA, C.R. et alii.
- 17:15 Formação de comissões para analisar o que vem sendo feito e propor novos trabalhos e metas em relação às várias áreas de controle biológico.
- 20:00 Programa Sócio-Cultural/Socio-Cultural Programme

11/Outubro/1989 - Quarta-feira/Wednesday

08:30 - 11:30 h - SESSÃO V/Session V - PRESIDENTE/Chairman:
Dra. LUZIA D. PACCOLA-Meirelis - UEL/Londrina-PR
Secretário/Secretary:
Dr. Renê Sordi - COPERSUCAR, Piracicaba, SP

08:30 199 Variabilidade em Trichoderma harzianum. PERES,
E.C.MELO, I.S.

08:45 100 Efeito antagônico de Trichoderma à Verticillium
dahliae em beringela. PIMENTEL, M. & MELO, I.S.

09:00 109 Obtenção de biótipos de Trichoderma viride
antagônicos a Sclerotinia minor. Faggar. MELO,
I.S.

09:15 102 Obtenção de biótipos de Trichoderma harzianum
resistentes ao fungicida iprodione. SILVA,
A.C.F. & MELO, I.S.

09:30 103 Sobrevivência de linhagens de Trichoderma
resistentes a iprodione em morangueiro. VITTI,
A.J. & GHINI, R.

09:45 Atividade celulolítica da linhagem selvagem e
mutantes mono e duplo auxotrófico de
Trichoderma pseudokoningii RIFAI. FURLANETO,
M.C. & PIZZIRANI-KLEINER, A.A.

10:00 Obtenção de mutantes de Paecilomyces lilacinus
para utilização no controle biológico de nema-
toides. Pimentel, I.C. & Azevedo, J.L.

10:15 Obtenção de protoplastos de Paecilomyces lila-
cinus agente utilizado no controle biológico de
nematóides. Pimentel, I.C. & Azevedo, J.L.

SESSÃO VI/Session VI - PRESIDENTE/Chairman:
Dr. João LÚCIO DE AZEVEDO - ESALQ/USP
SECRETARIO/Secretary:
Dr. Tasso Leo Krugner - ESALQ/USP

-MESA REDONDA: "POSSIBILIDADES DE
BIOCONTROLE DE IMPORTANTES FITOPATOGENOS
NO BRASIL"/Possibility of biological
control of important pathogens in Brazil.

14:00 - 14:30 h - BIOCONTROLE DE Crinipellis pernicioso DO
CACAUUEIRO/Biocontrol of Crinipellis pernicioso
of cacao-tree.
Dr. CLEBER N. BASTOS - CEPLAC, Pará.

- 14:30 - 15:00 h - BIOCONTROLE DE Phytophthora cactorum DA
MACIEIRA/Biocontrol of Phytophthora cactorum of
apple-tree.
Dra. ROSA MARIA V. SANHUEZA - CNPFT/EMBRAPA
VACARIA/RS.
- 15:00 - 15:30 h - BIOCONTROLE DE Pseudomonas avenae DO
MILHO/Biocontrol of Pseudomonas avenae of
maize.
Dr. CARLOS ALBERTO LOPES
CNPB/EMBRAPA, BRASILIA/DF
- 15:30 - 15:50 h - INTERVALO/Coffee break
- 15:50 - 16:20 h - BIOCONTROLE DE Gaeumannomyces graminis DO
TRIGO/Biocontrol of the wheat take-all
(Gaeumannomyces graminis).
- 16:20 - 16:50 h - BIOCONTROLE DE Catacauma torrendella e
Coccostroma palmicola AGENTES DE "LIXA" DO
COQUEIRO/Biocontrol of Catacauma torrendella
and Coccostroma palmicola agents of coconut
"lixa".
Dr. SHINOBU SUDO - Centro de Pesquisa e
Desenvolvimento, Cia Souza Cruz.
- 16:50 h - DEBATE/Discussion
Debatedores:
Dr. John L. Lockwood - Michigan State University
Dr. Hiroshi Kimati - ESALQ/USP
Dr. Charles F. Robbs - CNPDA/EMBRAPA
Dra. Cecilia S. Sadi - CNPDA/EMBRAPA
- 18:00 h - ENCERRAMENTO/Meeting End.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	111
APRESENTAÇÃO	v
PROGRAMA	vii
CONFERÊNCIAS	01
THE ROLE OF MICROBIAL ENERGY STRESS IN BIOLOGICAL CONTROL - John L. Lockwood	03
SOLARIZAÇÃO DO SOLO - Nilton Luiz de Souza	04
CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS QUE OCORREM EM PÓS - COLHEITA EM FRUTEIRAS - Aike A. Kretzchmar	10
FORMULAÇÃO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO - Iracema O. Moraes	20
BIOLOGICAL CONTROL OF FOLIAR DISEASES - Yigal Elad ..	35
CONTROLE ALTERNATIVO APLICADO A CULTURA DE CAFÉ - Walquyria B.C. Moraes	36
POSSIBILIDADE DO CONTROLE BIOLÓGICO DA VASSOURA - DEBRUCA (<i>Crinipellis perniciosa</i>) DO CACAUEIRO - Cleber N. Bastos	45
CONTROLE BIOLÓGICO DE PODRIDÕES DE RAÍZES DE MACIEIRA, CAUSADAS POR <i>Phytophthora</i> spp - Rosa María Valdebenito-Sanhueza	48
POSSIBILIDADES DE CONTROLE BIOLÓGICO DO MAL-DO-PÉ DE TRIGO - Erlei Melo Reis	49
BIOCONTROLE DE <i>Catacauma torrendiella</i> <i>Coccostroma palmicela</i> AGENTES CAUSADORES DA LIXA PRETA NO COQUEIRO - Shinobu Sudo	57
INTEGRATED CONTROL OF THE MOST SEVERE DISEASES OF SOME PROTECTED VEGETABLE CROPS IN ITALY - A. Garibaldi.	60
BACTÉRIAS PARA NUCLEAÇÃO DE GELO: SEU BIOCONTROLE E IMPLICAÇÕES NA AGRICULTURA BRASILEIRA - R.P. Leite Jr..	71
PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO SOLO NO BIOCONTROLE DE NEMATÓIDES DE GÊNERO <i>Metoidogone</i> : INFLUÊNCIA DO TIPO DE SOLO E FONTES DE MATÉRIA ORGÂNICA - Regina Gomes Carneiro	76
RESUMOS DE TRABALHOS	83

CONFERÊNCIAS

THE ROLE OF MICROBIAL ENERGY STRESS IN BIOLOGICAL CONTROL

John L. Lockwood

Michigan State University

USA

Most research on biological control involves the application of a single strain of an antagonistic microorganism to soil or a plant part. However, biological control in nature can occur through the joint action of several or many members of the indigenous microbial community, most often operating via competition for limited energy sources. Some of the characteristic responses of pathogenic fungi to energy stress in soil are fungistasis, debilitation in germinability and virulence, and autolysis of hyphae. These responses would seem to be exploitable for biological control, but their study in this respect has been neglected. Some approaches to employing soil fungistasis in biological control include the additions of organic matter or calcium to soil to increase fungistasis, and the substitution of pathogen-free soil for pathogen-bearing soil in the planting site. The debilitation of fungal propagules might be augmented by use of specific chemicals that increase exudation. Exploitation of the germination-lysis phenomenon depends on finding effective germination stimulants that would not support the production of new inoculum. On foliage, biological control appears to occur naturally through competition for energy sources by resident yeasts and filamentous fungi. The use of biological control that is broadly based microbiologically might offer advantages of reliability and stability.

SOLARIZAÇÃO DO SOLO

Nilton Luiz de Souza

Prof. Assistente Doutor
Deptº Defesa Fitossani-
tária-FCA/UNESP-Cx. Pos-
tal 237
18600 - Botucatu-SP

Ainda que o tratamento térmico seja um dos mais antigos métodos de controle de doenças de plantas, tem sido usado para termoterapia de sementes infestadas e/ou infectadas, material de propagação e para desinfestação de solos em canteiros e casa-de-vegetação. Somente na última década o tratamento térmico, em condições de campo, mereceu interesse pelos progressos na eficiência da solarização e pelas crescentes restrições concernentes ao uso de defensivos.

Solarização é um termo proposto por Katan *et al.* (1976) e usado para descrever o aquecimento do solo, através do calor solar como tratamento de pré-plantio; o processo envolve a cobertura do solo úmido com filme de polietileno, que de maneira geral aumenta a temperatura a níveis letais para diversos fitopatógenos, pragas e sementes de plantas daninhas.

Embora Grooshevoy (1939) tenha utilizado a energia solar para desinfestação do solo, visando o controle de *Thielaviopsis basicola*, a exposição ao sol foi feita diretamente, sendo que Adams (1971) foi o pioneiro no emprego do filme de polietileno objetivando elevar a temperatura do solo com a finalidade de controlar fitopatógenos em cultura em desenvolvimento.

Desde 1976 vem crescendo, a cada ano, o número de trabalhos relatando os benefícios da solarização no que diz respeito ao seu papel de reduzir a população de fitopatógenos do solo, minimizando seus efeitos sobre as culturas (Katan *et al.*, 1987). O emprego da solarização mostrou-se como realmente efetivo no controle de importantes agentes causais de doenças de plantas como por exemplo: *Fusarium* spp. (Katan *et al.*, 1981 e Katan *et al.*, 1983); *Phytophthora cinamomi* (Pinkas *et al.*, 1984); *Pythium ultimum* (Pullman *et al.*, 1981); *Sclerotium* spp. (Grinstein *et al.*, 1979 e Porter & Merriman, 1981); *Sclerotinia* spp. (Porter & Merriman, 1983, 1985);

Verticillium dahliae (Katan et al., 1976; Pullman et al., 1981; Ashworth & Gaona, 1982) além de outros citados por Katan (1987).

Os mecanismos de inativação dos fungos, quando submetidos à solarização, não são bem conhecidos, porém, Pullman et al. (1981) sugerem o envolvimento de ação enzimática, mudança nos compostos das membranas e sensibilidade das proteínas ao calor, além do efeito térmico direto. Considerando os valores necessários para a inativação térmica dos fungos fitopatogênicos (Bollen, 1969), nem sempre as temperaturas atingidas pela solarização são letais àqueles microrganismos; ainda assim existe um efeito advindo do enfraquecimento do patógeno aumentando a sua vulnerabilidade aos agentes antagonísticos ou simplesmente reduzindo a sua patogenicidade (Freeman & Katan, 1988).

O efeito da solarização também é relatado como efetivo no controle de vários gêneros de fitonematóides (Siti et al., 1982; Lamondia & Brodie, 1984; Barbercheck & Von Broembsen, 1986), assim como na redução da população de diversas ervas daninhas. Com relação às bactérias, foram observados efeitos letais sobre *Agrobacterium* spp., *Pseudomonas* pectinolífticas, sendo que em cultura de noqueira a população de *Agrobacterium radiobacter* biovar *tumefaciens* atingiu níveis indetectáveis após a solarização (Stapleton & De Vay, 1983).

A solarização possui efeitos adicionais. Solos solarizados apresentam geralmente minerais solúveis, como nitrogênio amoniacal e nitrato, Ca^{2+} , Mg^{2+} , P, K^+ , além de maior condutividade elétrica que solos não tratados. Esse aumento do nível dos nutrientes representa segundo Stapleton & De Vay (1985, 1986), um adicional benefício econômico. Outro aspecto vantajoso do método é a seletividade com relação aos microrganismos (Stapleton, 1984). É frequentemente observado uma alta densidade populacional de actinomicetos e fungos termofílicos em solos solarizados, em níveis maiores que em solos não tratados, por outro lado, são relatados efeitos neutros ou estimuladores da solarização na população de *Rhizobium* sp. e *Trichoderma* sp. (Katan et al., 1976; Elad et al., 1980; Pullman et al., 1981; Mihail & Alcorn, 1984; Martyn & Hartz, 1986). A alta tolerância térmica dos fungos micorrízicos (51,5°C por 10 minutos para *Glomus fasciculatus*) tem sido observada, já que plantas perenes ou anuais crescendo em solos recentemente solarizados são bem colonizadas por micorrizas (Pulmann et al., 1981; Stapleton & De Vay, 1984, 1986). Diversos trabalhos têm focalizado benefícios como: maior crescimento das plantas, rápida germinação

das sementes, padronização, maturação precoce e maior produtividade (Stapleton & De Vay, 1984; Stapleton & Garza-Lopez, 1988).

São poucos os trabalhos que discutem alternativas sobre o tempo de cobertura do solo, necessário para o controle dos patógenos ou efetivação de outros benefícios da solarização (Katan, 1987). Pullman et al. (1981) e La Mondia & Brodie (1984) mostraram as vantagens da utilização de polietileno transparente quando comparado com o de coloração preta. Siti et al. (1982) e Stapleton & Garza-Lopez (1988) utilizaram filmes com espessuras que vão desde 18 até 40 μm com sucesso. A utilização de plásticos finos promove melhor transmissão do calor, resultando em uma solarização mais efetiva (Pullman et al., 1981; Barbercheck & Von Borembesen, 1986).

Com relação à umidade do solo, ao que tudo indica (Stapleton & De Vay, 1985) quando o aquecimento do solo é máximo, a importância da umidade na sobrevivência dos microrganismos é diminuída; e quando o aquecimento é mínimo, a importância é aumentada.

A possibilidade do uso da solarização, também em pós-plantio, tem apresentado resultados promissores (Stapleton & De Vay, 1986; Szejnberg et al., 1987; Stapleton & Garza-Lopez, 1988).

A solarização empregada como complementação à outros métodos de desinfestação do solo, é descrita como viável, como por exemplo: fumigação (Smith et al., 1984; Barbercheck & Von Broembsen, 1986); adição de agente biocontrolador (Elad et al., 1980); incorporação de resíduos orgânicos (Ramirez Villapudua & Munnecke, 1987).

Segundo Katan (1981) o método da solarização, sendo simples, seguro e efetivo no controle de pragas e doenças, reduz o uso de produtos químicos. É uma técnica especialmente promissora para culturas que crescem em regiões quentes do mundo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P.B. Effect of soil temperature and soil amendments on Thielaviopsis root rot of sesame. Phytopathology, 61: 93-97, 1971.

- ASHWORTH, L.J. Jr. & GAONA, S.A. Evaluation of clear polyethylene mulch for controlling *Verticillium* wilt in established pistachio nut groves. Phytopathology, 72: 243-246, 1982.
- BARBERCHECK, M.E. & VON BROEMSEN, S.L. Effects of soil solarization on plant-parasitic nematodes and *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. Plant Disease, 70: 945-50, 1986.
- BOLLEN, G.J. The selective effect on heat treatment on the microflora of a greenhouse soil. Neth. J. Pl. Path., 75: 157-163, 1969.
- ELAD, Y., KATAN, J. and CHET, I. Physical, biological and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. Phytopathology, 70: 418-422, 1980.
- FREEMAN, S. & KATAN, J. Weakening effect on propagules of *Fusarium* of sublethal heating. Phytopathology, 78: 1656-1661, 1988.
- GRINSTEIN, A.; KATAN, J.; ABDUL RAZIK, A.; ZEYDAN, O. & ELAD, Y. Control of *Sclerotium rolfsii* and weeds in peanuts by solar heating of the soil. Plant. Dis. Report., 63: 1056-9, 1979.
- GROSSHEVOY, S.E. Desinfection of seed-bed soil in cold frames by solar energy. The A.I. Mikoyan Pan.Soviet Sci. Res. Inst. Tob. and Indian Tob. Ind. (VITIM), Kransnadar, Publ., 137, pp. 51-56. Rev. Appl. Mycol. 18: 635-636, 1939.
- KATAN, J. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. Ann. Rev. Phytopathol., 19: 211-236, 1981.
- KATAN, J. Soil solarization. In: CHET, I. (Edit.). Innovative approaches to plant disease control. A Wiley-Interscience Publication, New York, p.77-105, 1987.
- KATAN, J.; FISHLER, G. & GRINSTEIN, A. Short and long-term effects of soil solarization and crop sequence on *Fusarium* wilt and yield of cotton in Israel. Phytopathology, 73: 1215-1219, 1983.

- KATAN, J.; GREENBERGER, A.; ALON, H. & GRINSTEIN, A. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. Phytopathology, 66: 683-688, 1976.
- KATAN, J.; GRINSTEIN, A.; FISHLER, G.; FRANK, A.Z.; RABINOWITZ, H. D.; GREENBERGER, A.; ALON, H. and ZIG, U. Long-term effects of solar heating of the soil. Phytoparasitica, 9: 236 (Abstract), 1981.
- KATAN, J.; GRINSTEIN, A.; GREENBERGER, A.; YARDEN, O. & DE VAY, J.E. The first decade (1976-1986) of soil solarization (solar heating): A chronological bibliography. Phytoparasitica, 15: 229-255, 1987.
- LA MONDIA, J.A. & BRODIE, B.B. Control of *Globodera rostochiensis* by solar heat. Plant Disease, 68: 474-6, 1984.
- MARTYN, R.D. & HARTZ, T.K. Use of soil solarization to control *Fusarium* wilt of watermelon. Plant Disease, 70: 762-6, 1986.
- MIHAIL, J.D. & ALCORN, S.M. Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*. Plant Disease, 68: 156-9, 1984.
- PINKAS, Y.; KARIV, A. & KATAN, J. Soil solarization for the control of *Phytophthora cinnamomi*: Thermal and biological effects. Phytopathology, 74: 796 (Abs.), 1984.
- PORTER, I.J. and MERRIMAN, L.R. Effects of solarization of soil on nematode and fungal pathogens at two sites in Victoria. Soil Biol. Biochem., 15: 39-44, 1983.
- PORTER, I.J. and MERRIMAN, P.R. Evaluation of soil solarization for control of root diseases of row crops in Victoria. Pl. Pathol., 34: 108-118, 1985.
- PULLMAN, G.S.; DE VAY, J.E. & GARBER, R.H. Soil solarization and thermal death: A logarithmic relationship between time and temperature for four soilborne plant pathogens. Phytopathology, 71: 959-64, 1981.

- RAMIREZ-VILLAPUDUA, J. & MUNNECKE, D.E. Control of cabbage yellows (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) by solar heating of field soil amended with dry cabbage residues. Plant Disease, 71: 217-21, 1987.
- SITI, E.; COHN, E.; KATAN, J. & MORDECHAI, M. Control of *Ditylenchus dipsaci* in garlic by bulb and soil treatments. Phytoparasitica, 10: 93-100, 1982.
- SMITH, E.M.; WEHNER, F.C. & KOTZÉ, J.M. Effect of soil solarization and fungicide soil drenches on crater disease of wheat. Plant Disease, 68: 582-4, 1984.
- STAPLETON, J.J. & DE VAY, J.E. Responses of phytoparasitic and free-living nematodes to soil solarization and 1,3-dichloropropene in California. Phytopathology, 73: 1429-36, 1983.
- STAPLETON, J.J. & DE VAY, J.E. Thermal components of soil solarization as related to changes in soil and root microflora and increased plant growth response. Phytopathology, 74: 255-9, 1984.
- STAPLETON, J.J. & DE VAY, J.E. Soil solarization as a post-plant treatment to increase growth of nursery trees. Phytopathology, 75: 1179 (Abs.,) 1985.
- STAPLETON, J.J. & DE VAY, J.E. Soil solarization: A non-chemical approach for management of plant pathogens and pests. Crop Protection, 5: 190-8, 1986.

CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS QUE OCORREM EM PÓS-COLHEITA EM FRUTEIRAS

Aike A. Kretzchmar

Pós-Graduação da UFPel

Caixa Postal 354

96100 - Pelotas-RS

INTRODUÇÃO

As perdas de frutas após a colheita podem ser aumentadas pelo manejo inadequado dos produtos, por condições desfavoráveis de colheita, armazenamento e comercialização, por modificações, físicas e bioquímicas do processo de senescência e pela atividade microbiana, causadora de podridões.

Estas podridões são de difícil controle e têm sido apontadas por diversos autores como responsáveis por grande porcentagem de perdas de produtos colhidos. Na Espanha, as cifras médias globais de perdas em maçãs e peras submetidas à frigoconservação devem-se em 2 a 3% a perdas por podridões, 2 a 3% a perdas por alterações fisiológicas e 3 a 7% a perdas por diminuição do peso (11). No Chile, a porcentagem de podridões de pomáceas varia, em condições normais, entre 15 e 35%, após um manejo regularmente bom da fruta e com um período de armazenagem ótimo (19). O levantamento do Departamento de Agricultura demonstra que as perdas de pós-colheita em frutas, nozes e vegetais somam em volta de 23% do total de produto colhido, nos EUA (20). As perdas são ainda maiores em regiões subdesenvolvidas, devido à inferioridade de armazenagem e tecnologia de manuseio de alimentos (20). Inspeções em países tropicais têm revelado que perdas de pós-colheita de 25 a 50% são comuns em situações onde as vantagens da refrigeração não são utilizadas (4). Estudos sobre perdas em pós-colheita de maçãs no Brasil indicam que na cultivar Golden Delicious armazenada na safra 82/83 ocorreu podridão em 5,7% dos frutos (2).

Levantamentos realizados nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina demonstraram a importância do mofo-azul como agente causal de podridões de maçãs conservadas em câmara frigorífica (17). Outro patógeno, *Alternaria alternata* tem sido indicado como um dos mais importantes organismos dentre os associados à podridão de maçãs em pós-colheita, ocor-

rendo também em outros países produtores de pomáceas da América do Sul e Europa (18).

Além de *Penicillium* spp. e *Alternaria* spp., são citados ainda os fungos *Glomorella cingulata*, *Rhizopus stolonifer*, *Physalospora malorum*, *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis mali*, *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotia* spp., *Botryodiplodia* sp. e *Botryosphaeria dothidea* como causadores das podridões dos frutos da macieira na pós-colheita. (3). Os fungos *Penicillium expansum*, *Rhizopus nigricans*, *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Glucosporium album* e *Phoma* sp. são considerados como os maiores causadores de podridões de peras e maçãs na Espanha, sendo que apenas *Penicillium expansum* tem sido responsável por 80 a 90% das perdas ocorridas por podridões em pós-colheita (11). *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* são citados como principais causadores de podridões de maçãs e peras em armazenamento refrigerado (2, 9).

Como forma de controlar as doenças ocorridas no período de pós-colheita tem sido utilizados vários métodos, como tratamentos químicos, calor e irradiação. Os tratamentos químicos são usualmente mais utilizados, na pré e pós-colheita. Os tratamentos realizados na pós-colheita são mais usados no controle das doenças por serem mais econômicos, porém têm eficácia relativa. Os tratamentos utilizados em câmaras frias para conservação de frutos têm sido banho de imersão em tanques com solução fungicida e tratamento com fumigantes dentro das câmaras. No Brasil, o único fungicida registrado para tratamento pós-colheita é o Tiabendazol, que possui sérias restrições de uso, devido ao fato de selecionar estirpes resistentes de certos fungos (17). O uso de fungicidas sistêmicos do grupo dos benzimidazóis tem o maior número de surgimentos de organismos resistentes (1). Vários autores (5, 9, 10, 12 e 17) já constataram o surgimento de estirpes resistentes de fungos a benzimidazóis. A falta de um produto mais eficaz e o surgimento destas estirpes resistentes tem contribuído para a busca de alternativas mais viáveis para a conservação de frutos. Além disto, o uso de produtos químicos na conservação de alimentos pode acarretar sérios prejuízos ao consumidor quando não são observados os períodos de carência e as doses máximas de resíduos toleradas pela legislação.

- Experiências realizadas com controle biológico de doenças pós-colheita em fruteiras

Um dos grandes empecilhos na utilização de microrganismos para controle de doenças através de antagonismo tem sido a impossibilidade de controle das condições ambientais (20). Assim sendo, muitas vezes um trabalho promissor em condições de laboratório não logra êxito a campo devido a condições adversas aos microrganismos utilizados, principalmente destruição por raios ultra-violeta e dessecação. Os produtos armazenados normalmente estão sob condições controladas de temperatura e umidade relativa, principalmente no caso de armazenagem a frio. Existem três fatores que apresentam o controle biológico como uma alternativa viável e passível de exploração para controle de patógenos em pós-colheita:

- controle das condições ambientais
- limitação das áreas de aplicação
- economicamente praticável sob condições de armazenamento (20).

Vários trabalhos realizados com controle biológico têm sido bem sucedidos (Quadro 1). Apesar de serem poucas as publicações na área de controle biológico de pós-colheita, estas pesquisas vêm tendo bons resultados.

Em macieira, a infecção de frutos por *Botrytis cinerea* foi reduzida pelo controle do inóculo no campo. O controle do patógeno foi obtido após inoculação artificial das flores por tratamento com conídios de *Trichoderma pseudokoningii* (15). Porém, devido ao fato deste fungo ser incapaz de crescer em temperaturas abaixo de 9°C, a ocorrência de baixas temperaturas no período de floração poderia ter incapacitado o antagonista de se desenvolver normalmente, motivo pelo qual o sucesso deste experimento foi considerado limitado. O fungo *Trichoderma harzianum* foi testado com o mesmo procedimento e foram obtidos melhores resultados (16). Neste trabalho, tratamentos com *T. harzianum* controlaram a doença de forma semelhante a diclofluanida 0,038% + benomil 0,015%, reduzindo significativamente a infecção de frutos por *Botrytis cinerea*.

Quadro 1. Principais doenças de pós-colheita em fruteiras de clima temperado estudadas quanto ao controle biológico.

Hospedeiro			
Pêssego	<i>M. fructicola</i>	<i>B. subtilis</i>	Wilson & Pusey (1984)
Abricó	<i>M. fructicola</i>	<i>B. subtilis</i>	Wilson & Pusey (1984)
Nectarina	<i>M. fructicola</i>	<i>B. subtilis</i>	Wilson & Pusey (1984)
Ameixa	<i>M. fructicola</i>	<i>B. subtilis</i>	Wilson & Pusey (1984)
Pêssego	<i>M. fructicola</i>	<i>B. subtilis</i>	Fortes*
Maçã	<i>B. cinerea</i>	<i>A. breve</i>	Janisiewicz (1988)
Maçã	<i>B. cinerea</i>	<i>T. harzianum</i>	Tronsmo & Ystaas (1980)
Maçã	<i>P. expansum</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Janisiewicz (1988)
Maçã	<i>B. cinerea</i>	<i>T. pseudokoningii</i>	Tronsmo & Raa (1977)
Pêssego	<i>R. stolonifer</i>	<i>E. cloacae</i>	Wilson; Pusey & Franklin (1987)
Maçã	<i>P. expansum</i>	Bactéria antagonista	Janisiewicz (1987)
Maçã/Pera	<i>P. expansum</i>	<i>P. cepacia</i>	Janisiewicz & Roitman (1988)
	<i>B. cinerea</i>	<i>P. cepacia</i>	
Maçã	<i>P. expansum</i>	<i>B. subtilis</i>	Kretzschmar & Valdebenito*

* Trabalhos em desenvolvimento no Brasil.

Suspensão de células de *Acremonium breve* no controle de *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas* sp. no controle de *Penicillium expansum* foram utilizadas em frutos de maçã (7). Os frutos feridos foram protegidos com suspensões dos antagonistas e posteriormente tratados com suspensão de esporos de patógeno. Segundo o autor, testes com maçãs Golden Delicious logo após a colheita mostraram que total proteção de *B. cinerea* (10^4 esp/ml) foi obtida com 10^4 CFU/ml de *A. breve*, sendo esta a mais baixa concentração aplicada. A proteção durou por dez semanas, até o final do experimento. Quando foram testadas misturas de antagonistas, a combinação de *Pseudomonas* sp. e *A. breve* deram excelentes resultados, inibindo *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*. Foram também realizados testes para verificação da inibição "in vitro". Os resultados indicaram que a relação entre ação antagonista em placas e sobre frutos parece ser limitada, embora em alguns casos houve correlação, ou seja, forte inibição em placas foi para-

lela a forte inibição em frutos. O mesmo autor, em 1987 utilizou uma bactéria antagonista (L-22-64) e uma levedura (F-43-31) para controlar o mofo azul em maçãs, causado por *P. expansum*. A mais alta concentração de esporos do patógeno (10^7 esp/ml) foi totalmente controlada por altas concentrações do antagonista. Esta proteção foi contínua, porque reinoculações subsequentes de fermentos, após 7 a 10 dias, não resultaram em desenvolvimento de lesões (6).

Experimentos com a bactéria *Enterobacter cloacae* (isolado D-3) foram realizados para controle de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos feridos e inoculados artificialmente (21). Foram isolados 70 antagonistas, dos quais apenas treze inibiram crescimento e/ou esporulação de *R. stolonifer* "in vitro". Destes isolados, somente *E. cloacae* reduziu desenvolvimento de podridão comparável a Dicloran. Segundo os autores, apesar de a bactéria inibir infecção por *Rhizopus stolonifer* em até 70% nos frutos, e o ataque de podridão ter sido reduzido em frutos tratados, não foi obtido controle completo de podridão de *Rhizopus*. Mesmo que observações dos autores em outros ensaios demonstrem que possivelmente *E. cloacae* possa vir a ter uma larga aplicação no controle biológico, é necessário neste trabalho, indicar os riscos de uso deste organismo, que sendo habitante do intestino de animais e do homem, poderia causar problemas à saúde.

Pseudomonas cepacia, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus subtilis* foram testados em laboratório para antagonismo contra *Monilinia fructicola* sobre furtos feridos de pêssegos, nectarinas, abricós e ameixas (13). Todas as cinco bactérias inibiram crescimento radial de *M. fructicola* sobre meio de cultura. No entanto, apenas *Bacillus subtilis*, (isolado B-3), controlou a podridão parda em todos os tipos de frutos, sendo mais efetivo sobre pêssegos e abricós do que nectarinas e ameixas. Benomil foi mais efetivo do que o isolado B-3 contra a podridão parda. Possivelmente um antagonista como B-3, não sensível a fungicidas, possa ser misturado com estes produtos ou outro antagonista para melhor controle desta doença.

A compatibilidade de *Bacillus subtilis* (isolado B-3) com outros agentes ou procedimentos de pós-colheita usados comercialmente foi testada (14). Neste trabalho, observou-se que o tratamento Dicloram + B-3 tiveram baixa porcentagem de frutos atacados, menor que Dicloram e B-3 usados isoladamente. No entanto, quando misturado com cera e cera + Dicloram,

o antagonista não teve o mesmo efeito. Aparentemente, a cera teve um efeito negativo sobre a atividade do isolado B-3 contra *Monilinia fructicola*. Frutos tratados com B-3 foram também submetidos a condições simuladas de armazenagem a frio (2 a 4°C) durante 21 dias. A atividade de B-3 contra *M. fructicola* em frutos tratados com cultura e com suspensão de células foi mantida durante todo o período, com apenas 10 e 20% de podridão de frutos para os dois tratamentos, respectivamente. Isto indica que o antagonista *Bacillus subtilis* (B-3) tem um bom potencial para controle biológico sob baixas temperaturas e em mistura com outros produtos.

O desenvolvimento de podridão causada por *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* em peras e maçãs foi inibido pulverizando os frutos feridos com suspensão de *Pseudomonas cepacia* (8). Um composto antifúngico efetivo foi isolado das células bacterianas e de meio de cultura, identificado como pirrolnitrina. Este composto inibiu crescimento dos dois patógenos em uma concentração de 1 mg/l em teste de difusão em agar, "in vitro". Em concentração de 10 mg/l de pirrolnitrina foi obtida completa proteção de *B. cinerea* em maçãs e peras com concentrações do patógeno de 10^3 a 10^5 conídios/ml. Para *Penicillium expansum*, a mesma concentração do composto antifúngico controlou concentrações de 10^3 conídios/ml em peras e 10^3 a 10^4 conídios/ml em maçãs. Em concentrações de 50 mg/l ou maiores, foi obtido completo controle em ambas doenças e ambos frutos em todos os níveis de inóculo testados. Segundo os autores a estirpe testada de *P. cepacia* protegeu maçãs e peras em concentrações suficientemente baixas para considerar possível o desenvolvimento comercial desta bactéria.

No Brasil, na área de controle biológico de doenças pós-colheita, o Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado de Pelotas/RS, vem conduzindo um projeto de controle biológico de podridão parda em pêssego utilizando bactérias, porém os trabalhos ainda não têm sido publicados (Dr. Joel Fortes, comunicação pessoal).

No Campo Experimental de Vacaria (CNPFT, Vacaria/RS), sob orientação da Dra. Rosa M^o Valdebenito-Sanhueza, foram realizados alguns ensaios com controle biológico de doenças pós-colheita em maçã, visando principalmente o controle do fungo *Penicillium expansum*, responsável pela maior porcentagem de perdas de frutos em câmara fria. Nos testes realizados "in vitro" foi observada inibição da germinação de esporos do fungo *P. expansum* quando imersos em suspensão de *B. subtilis**. Nos testes realiza-

* Isolado cedido pelo Dr. Joel Fortes (CNPFT/Pelotas/RS).

dos em frutos, observou-se que *B. subtilis* e *B. thuringiensis* ocasionaram a redução da incidência de podridão por *P. expansum* em até 80%, em pré-inoculação à temperatura ambiente. Quando realizado o teste em câmara fria, o melhor controle foi obtido por *B. subtilis* em pré-inoculação, reduzindo a incidência do patógeno em até 70%. O mesmo antagonista quando misturado em suspensão com o patógeno controlou a doença em apenas 56%. Isto demonstra que existem possibilidades de se obter antagonistas com bom controle de *P. expansum* em câmara fria.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo não sendo esta uma revisão exaustiva sobre o assunto, os trabalhos apresentados demonstraram que há necessidade de se estender as pesquisas nesta área, pois o controle biológico de patógenos em pós-colheita tem muitas dificuldades a serem vencidas.

O antagonismo testado "in vitro" nem sempre ocorre "in vivo", sendo necessário enorme número de isolamentos e testes para obter alguns antagonistas efetivos. Além disto, a necessidade de utilizar suspensões antagonistas em alta concentração torna o custo de reprodução muito alto, devido principalmente ao substrato utilizado. É preciso desenvolver formulações de produtos biológicos para produção em larga escala que possam competir com fungicidas e/ou serem usados em controle integrado, testando também a viabilidade de misturas de produtos químicos e antagonistas, e seu efeito na proteção de alimentos.

No caso da macieira é preciso procurar antagonistas ou misturas deles que possam abranger os diferentes organismos patogênicos que ocorrem nos tanques de lavagem de frutos, para um controle mais efetivo.

Também no caso de fruta refrigerada existe a necessidade de pesquisar antagonistas que tenham atividade constante, tanto em condições ambientais como em baixas temperaturas.

Outro fator a ser considerado é o efeito toxicológico que os antagonistas possam exercer sobre os alimentos, para evitar problemas de contaminação de produtos e conseqüente intoxicação do consumidor. Deve-se lembrar também que a introdução de organismos estranhos a um ambiente pode causar certo impacto que deve ser verificado antes de sua utilização

em larga escala. No caso de armazenamento de frutos em câmara frigorífica o local abrangido é limitado, podendo ser satisfatoriamente controlado.

Pesquisas sobre ciclo de vida dos patógenos que ocorrem em pós-colheita de fruteiras e respectivos antagonistas, requerimento nutricional de ambos, bem como composição nutricional da superfície dos alimentos também deverão ser implementadas.

O controle biológico pode ser uma solução prática e viável na conservação de alimentos, diminuindo o acúmulo de químicos na cadeia alimentar, e servindo como nova alternativa para controle de doenças em pós-colheita.

A necessidade de resolução dos problemas apontados acima demonstra que existe campo aberto nesta área para pesquisa na agricultura brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECKER, W.F. Compostos sistêmicos recomendados para controle de doenças. In: Curso de Aperfeiçoamento em Agrotóxicos, ACARESC, Florianópolis, 1988.
2. BIONDI, G.; MENNITI, A.M. e FOSCHI, F. Lotta antibotritica con aerosol alle pere. Atti Giornate Fitopatologiche, vol. 2, Cooperativa Libreria Universitaria Editrice Bologna, 1982.
3. BLEICHER, J. e BERNARDI, J. Podridões da maçã e seu controle na pós-colheita. Boletim Técnico nº 28, EMPASC, Florianópolis, 1985.
4. ECKERT, W.J. Control of postharvest diseases. In: Antifungal Compounds, Ed. Siegel & Sisler, vol 1, New York, 1977. p.269-293.
5. FORTES, J.F. *Glomerella cingulata* e *Penicillium* sp.: surgimento de cepas resistentes ao benomil. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 10(2): 280, 1975.
6. JANISIEWICZ, W.J. Postharvest biological control of blue mold on apple. Phytopathology, 77: 481-485, 1987.

7. JANISIEWICZ, W.J. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixtures. Phytopathology, 78: 194-198, 1988.
8. JANISIEWICZ, W.J. and ROITMAN, J. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology, 78: 1697-1700, 1988.
9. MORALES MUÑOZ, A.R. Razas tolerantes de *Penicillium expansum* (Link) Thom. a benomyl y thiabendazole en plantas embaladoras de manzanas. Simiente, 52(3-4): 165-168, 1982.
10. MORALES MUÑOZ, A.R. Resistencia del moho azul, *Penicillium expansum* (Link) a benomyl y thiabendazole en almacenaje de manzanas. Revista Fruticola, 4(3): 7-9, 1984.
11. PALAZÓN, I.J. Problemática de las podedumbres de post-cosecha en manzanas y peras conservadas en cámara. Jornadas Abiertas de Frigo-conservación, Barcelona, 1983.
12. PRUSKY, D.; BAZAK, M. and BEN-ARIE, R. Development, persistence, survival and strategies for control of thiabendazole-resistant strains of *Penicillium expansum* on pome fruits. Phytopathology, 75(8):877-882, 1985.
13. PUSEY, P.L. and WILSON, C.L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Disease, 68: 753-756, 1984.
14. PUSEY, P.L.; WILSON, C.L.; HOTCHKISS, M.W. and FRANKLIN, J.D. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran and cold-storage conditions. Plant Disease, 70: 587-590, 1986.
15. TRONSMO, A. and RAA, J. Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. Phytopathologische Zeitschrift (Abstr.), 89(3): 216-220, 1977.
16. TRONSMO, A. and YSTAAS, J. Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. Plant Disease, 64: 1009, 1980.
17. VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Controle de *Penicillium expansum* Link resistance aos benzimidazóis em maçãs frigorificadas. Revista Brasileira de Fruticultura, 8(2): 31-34, 1986.

18. VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. e CANTILLANO, R.F.F. Controle da podridão de maçãs causada por *Alternaria alternata*. Comunicado Técnico nº 58, EMBRAPA, 1987.
19. VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Enfermedades de post-cosecha en pomáceas y uvas. INIA, 1969.
20. WILSON, C.L. and PUSEY, P.L. Potential for biological control of post harvest plant diseases. Plant Disease, 69(5): 375-378, 1985.
21. WILSON, C.L.; FRANKLIN, J.D. and PUSEY, P.L. Biological control of *Rhizopus* rot of peach with *Enterobacter cloacae*. Phytopathology, 77: 303-305, 1987.

FORMULAÇÃO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Profª. Iracema O. Moraes

DETA/IBILCE/UNESP - CP 136

15055-S. José do Rio Preto-SP

INTRODUÇÃO

A formulação dos inseticidas microbianos seguiram inicialmente as mesmas etapas utilizadas na preparação de inseticidas químicos, entretanto, devido às muitas diferenças existentes entre ambos, nos últimos tempos, vem se tentando desenvolver formulações mais adequadas.

O inseticida biológico contém como princípio ativo, na maioria das vezes o próprio microrganismo em sua forma esporulada e é a atuação desse microrganismo ou seus produtos de metabolismo que são tóxicos, nesse caso todo cuidado é necessário para não inibir a atuação do microrganismo através de formulação inadequada e se possível a formulação deve ampliar o espectro tóxico. Deve-se evitar o uso de agentes antimicrobianos e no caso de *Bacillus thuringiensis* (Bt) os compostos capazes de desnaturar proteínas devido ao caráter tóxico do cristal proteico.

Alguns autores estudaram equipamentos para aplicação de inseticidas biológicos, com métodos e características de formulação, bem como a compatibilidade do inseticida com aditivos e outros pesticidas químicos (Bailey and Smith, 1951; Martin, 1959; Angus and Lüthy, 1971; Schaefer et al., 1986; Entwistle, 1986; Killick, 1986; Most and Quinlan, 1986; Brown, 1951; Potts, 1958).

É importante rever algumas características dos inseticidas, tais como: atributos; tipos de formulação; aditivos; compatibilidade com outros pesticidas (Angus and Lüthy, 1971).

O desenvolvimento de formulações de pesticidas microbianos, especialmente aqueles baseados em *Bacillus thuringiensis*, progrediram desde a plataforma inicial de um potente produto estável e aspergível, a um leque de materiais adaptados para obter determinadas exigências. Tais desenvolvimentos foram necessários quer para se empregar os microbianos em áreas específicas do mercado (aplicação aérea em florestas), quer para com

petir diretamente com alternativas químicas (como exemplo, o desenvolvimento das formulações granuladas contra mosquitos).

O desenvolvimento de uma formulação varia desde o simples ingrediente ativo, passando por otimização da produção, comportamento do produto, redução de custo, métodos de aplicação ou atenção para diferenciação na demanda do mercado. Most and Quinlan (1986) citam o exemplo do desenvolvimento de formulações do *Bacillus thuringiensis* H 14, larvicida contra mosquitos e moscas, apresentando as vantagens e desvantagens de cada uma delas. Concluem seu trabalho afirmando que os cientistas de formulação estão na interface entre as possibilidades técnicas e a realidade comercial, transformando um alto potencial em pesticidas que realmente funcionam.

Para as formulações do inseticida biológico estão sendo empregados os mesmos processos usados para inseticidas químicos ou seja: pó, pó molhável, concentrado aquoso, emulsão, suspensão oleosa, granulado.

As formulações e potências são ajustadas para dar controle ótimo aos insetos-alvo (insetos-testes). Bulla and Yousten (1979) listam alguns produtos formulados presentemente disponíveis nos Estados Unidos. No Pesticide Dictionary, do FARMCHEMICALS HANDBOOK (1985) se apresentam os diversos preparados, incluindo os pesticidas microbianos, com sua composição, denominação comercial, formulações e produtores.

CARACTERÍSTICAS DOS INSETICIDAS

Por definição estrita, um inseticida é simplesmente um composto que mata insetos. Na prática é um composto desenvolvido ou usado com aquele propósito (o princípio químico ativo) ou é um biocida diluído e aplicado de tal forma a ampliar a atividade inseticida (o material formulado). Inseticidas químicos baseiam-se num grande número de elementos ou compostos orgânicos e inorgânicos.

Usualmente o princípio ativo é diluído usando um veículo ou extensor sólido ou líquido. Os líquidos incluem água, óleo, solventes voláteis e misturas ou emulsões destes. Às vezes, o composto inseticida é um sólido e o veículo é um solvente ou diluente, permitindo uniforme aplicação por aspersão.

Na formulação seca, o princípio ativo é misturado com extensores tais como: finas argilas, terra de diatomáceas etc, as quais são também conhecidas como enchimentos. Às vezes o princípio ativo é adsorvido em um sólido, que além da função de diluidor atua como atraente.

A atuação do inseticida pode ser por contato ou envenenamento estomacal, caso em que o inseto precisa ingerir o produto. Este deve estar presente na folhagem-alimento no ato da ingestão. O inseticida neste caso é formulado para ser facilmente aspergido nas folhas, havendo necessidade de agentes molháveis que reduzem a tensão superficial da gota aspergida. Muitas formulações se fazem como pó molhável, facilitando a suspensão em água.

No entanto, ao facilitar a aspersão, também se facilita o processo de lavagem da folha, por chuva ou mesmo orvalho. É necessário melhorar a adesão do inseticida à folha, com o emprego de adesivos ou ligantes.

Se a formulação prevê o uso de água e óleo (ou algum solvente imiscível) há necessidade da adição de emulsificantes para estabilizar a emulsão.

Em algumas formulações há o perigo da formação de grumos, para o que se necessita adicionar os agentes "anti-caking". Outros agentes usados podem atuar como sinergistas, não tem finalidade inseticida mas potencializam o mesmo (Brown et al., 1967).

Não se consegue catalogar todos os agentes pois alguns deles atuam de forma multipropósito ora como diluente, adesivo, solvente, etc. Há aditivos que apresentam ao mesmo tempo duas funções, por exemplo: adesivo e facilitador da aspersão.

Vários autores discutiram os principais atributos desejáveis num patógeno microbiano para ser usado em controle de insetos (Bucher, 1956; Cameron, 1963; Hall, 1963; Angus, 1965; Dulmage, 1967; Rivers, 1967; Moraes, 1976; Moraes, 1988).

Podem-se empregar os mesmos métodos de formulação dos inseticidas químicos para os inseticidas biológicos porém é preciso conhecer e ob-

servar as especificidades dos microrganismos entomopatôgenos, para se evitarem erros fatais. Um ponto importante é a manutenção da viabilidade dos microrganismos no produto formulado pois estes podem sofrer danos por fatores que não prejudicam os inseticidas químicos tais como; luz ultra violeta, temperatura, pressão (por exemplo durante a moagem); etc (Burgess and Hussey, 1971).

A escolha de formulação pode ser virtualmente importante na aplicação prática, por exemplo, na expectativa de chuva forte, a formulação em pó é desaconselhada e um produto aspergível com um bom adesivo é recomendável. Já, para plantas de pequeno porte, a aplicação de pós, no verso das folhas é o recomendado. Dias muito luminosos exigem protetores de U.V., luz solar etc.

FORMULAÇÕES

1. Formulação líqüida: em água

Inseticidas microbianos usados por aspersão, constituem suspensões de entidades unicelulares, cuja habilidade tóxica desaparece se a célula é fisicamente ou quimicamente destruída. Por isso a água é geralmente usada como diluente, por não causar a dissolução dos patógenos.

Os corpos de inclusão encontrados em alguns vírus entomopatôgenos geralmente estão oclusos em uma matriz proteica cristalina. São muito estáveis em água, sendo que suspensões aquosas armazenadas a 3°C por ano, mantêm sem nível de virulência.

Os endosporos dos *Bacillus* também são bem estáveis em água, embora a presença de certos compostos possa provocar a germinação prematura, as exigências variam de espécie a espécie (Ignoffo, 1964; Sussman and Halvorson, 1966).

Os esporos de muitos fungos patógenos, por outro lado, germinam quando um limite de umidade for atingido (Sussman and Halvorson, 1966; Hedlund and Pass, 1968; Yendol, 1968).

Alguns tipos de esporos de fungos sofrem um processo de maturação, antes da germinação, mas os conidiosporos germinam prontamente em água (Clark et al., 1968; Krejová, 1968).

Assim a conservação de fungos em água ou com alta umidade deve ser evitada. Os esporos de protozoários germinam na água, se o pH for apropriado ou na presença de determinados íons, visto se parecerem aos esporos de *Bacillus*. Porém, diferentemente de esporos de bactérias e de fungos, os de protozoários são muito sensíveis à dessecação (Kellen and Lindgren, 1968; Steinhaus, 1960).

Estas observações mostram a adequabilidade da água como diluente para formas relativamente resistentes tais como esporos e poliedrus (vírus). As fases vegetativas de bactérias, fungos e protozoários são, às vezes afetadas adversamente por armazenagem em condições marcadamente hipotônicas ou hipertônicas. Para armazenamento prolongado a pureza da água (em termos de pH, conteúdo de íons e de matéria orgânica) é fundamental para a retenção da virulência de certos tipos de patógenos (Chambers, 1968; Magnoler, 1968). Para a adição de água para aspersão, a pureza não é crítica. Água é seguramente o diluente mais usado quando se preparam pós molháveis para uso. Os tipos de pós molháveis contêm células secas juntados inertes adequados, agentes molhantes, aspersivos, adesivos etc.

2. Formulação líquida: em óleo

Óleos de vários tipos vem sendo usados em preparações inseticidas, devido especialmente ao seu custo, e características desejáveis para aspersão, como adesividade e espalhamento. O uso em inseticidas microbianos, apareceu, em parte, devido à necessidade de ajustar tais produtos a procedimentos e equipamentos existentes (Angus et al., Clark and Reiner, 1956). Inicialmente o uso de óleo acarretou algumas dificuldades, como no preparo de suspensões uniformes, porque primeiro se hidratava o produto seco para depois dispersá-la no veículo oleoso.

Em vista da tendência dos fungos germinarem prematuramente em água e de sensibilidade das fases vegetativas de alguns microrganismos nesse veículo, foi necessário aprofundar os estudos para um maior uso do veículo oleoso, uma vez que a manutenção de microrganismos em óleo é já um procedimento laboratorial estabelecido a longo tempo.

O uso de óleos, às vezes, é limitado por possível ação fitotóxica, embora em certos casos o dano a folhas possa ser tolerado em outros cujo uso é direto como alimento humano (alfaca, couve, rúcula, etc.) o re-

síduo oleoso é inaceitável. Para aspersão de florestas ou programas de reforestamento o uso de óleos é muito interessante.

3. Formulação líquida: emulsões

O uso de emulsões surgiu da necessidade de adaptar o produto para emprego em equipamentos para aplicação aérea, ou seja, para aspersão em florestas (Angus et al., 1961). Outro motivo é que geralmente, pós fermentação, o produto é separado por centrifugação como uma pasta cremosa, e nesse caso é mais interessante omitir a etapa de secagem (custo e danos ao produto) e suspender a pasta em uma emulsão concentrada para depois diluí-la em água para aplicação. A composição de uma particular emulsão depende de um número de fatores incluindo a quantidade e tipo de patógeno, mas, basicamente incluirá um emulsificante (para misturar as fases óleo-água), um sal para conseguir a isotonicidade (quando necessário), agentes molhantes e/ou adesivos (Lewis and Cannola, 1966). Existe um grande número de emulsificantes, sendo que, aquelas do tipo usado para alimentos e cosméticos vem sendo usados com sucesso (Angus et al., 1961; Smirnoff, 1967; Frear, 1968; Jaques et al., 1968).

O tipo de emulsão, óleo-água e sua estabilidade variam com os componentes e tipo de equipamento gerador usado. Se não se conseguir uma emulsão permanente, é desejável que ela possa ser restabelecida rapidamente por uma simples agitação ou retro-bombeamento (Winchester, 1967).

O preparado emulsionável de *B. thuringiensis*, comercializado como "Thuricide 90 TS" é estável por largos períodos desde que se evite o congelamento. Precipitados que podem ocorrer, são facilmente dispersos, por agitação.

4. Formulação em pó

Os primeiros inseticidas foram formulados na forma seca e usados como pós ou pós molháveis. Os inertes usados foram: atalpulgita, terra de Fuller, pirofilita, talco, caolin, bentonita, e outros. Em certos casos, alguns destes inertes agem também como abrasivo, ampliando a suscetibilidade dos insetos à infecção, portanto este inerte age também como si

nergista. A história do produto, às vezes recomenda a formulação seca. Por exemplo, entomovirozes, são patógenos obrigatórios e podem ser produzidos apenas "in vitro", no particular hospedeiro. Após produção, torna-se difícil separar os corpos de inclusão do tecido residual (é laboriosa e consome tempo). Na produção comercial, este material (corpos de inclusão mais tecido residual) é macerado e diluído num veículo inerte. Uma formulação líquida pode putreficar-se (restos orgânicos) e será menos estável, além de ser esteticamente menos aceitável que um produto seco.

Também para o *Bacillus popilliae* a formulação seca é preferível (pois também é um patógeno obrigatório).

No caso do *Bacillus thuringiensis*, quando cultivado em meio semi-sólido é mais econômica a preparação em pó ou pó molhável, que a separação de esporos e cristais dos sólidos do meio de cultura. A mistura e moagem desses materiais contendo os patógenos, para obter fino pó, deve ser muito cuidadosa para evitar danos aos patógenos. Deve-se evitar aumento de temperatura e danos físicos que podem comprometer a toxicidade do patógeno.

A escolha do veículo inerte para usar na formulação em pó, passa pela condição de que não seja tóxico ao patógeno que está sendo formulado, nem possa, após a aplicação, na dissolução em água ou ao ser molhado pela chuva ou orvalho, produzir uma solução hostil ao patógeno (pH desfavorável, alta concentração salina, etc).

A decisão do uso na forma aspersão ou pó, varia, com a cultura que está sendo tratada, o inseto alvo, as condições climáticas e primordialmente o patógeno que está sendo empregado. Testes usando uma e outra formulação não indicam diferenças de resultados.

5. Uso do adesivo

A. Espalhantes

Para assegurar a molhabilidade e o espalhamento do inseticida usam-se os agentes molhantes e espalhantes (Furnidge, 1959 a, b; Hartley, 1960; Frear, 1968). Aspectos físico-químicos são envolvidos no uso desses agentes, assim, um espalhante permite obter uma interface estável líquido/

sólido. Os espalhantes usados incluem leite em pó, caseína em pó, sangue seco, gelatina, saponina, sabões, etc. Dentre os atributos destes agentes é essencial que ele não induza crescimento do microrganismo e germinação prematura nem iniba o estabelecimento do patógeno. Algumas peculiaridades do agente devem ser conhecidas, por exemplo, entre os detergentes dodecil sulfato de sódio, embora não inative o cristal proteico tóxico de *Bacillus thuringiensis*, rompe a estrutura do cristal tornando-o mais suscetível à destruição por outros meios.

A Tabela I, apresenta agentes espalhantes e molhantes usados ou recomendados para inseticidas microbianos.

B. Adesivos

Alguns dos agentes espalhantes (sabão, saponinos e detergentes) são agentes de limpeza e auxiliam na molhabilidade e formação de filme, porém são facilmente arrastados por chuva e orvalho. Para solucionar este impasse, usam-se os adesivos que asseguram a formação de um filme resistente às intempéries na folhagem (Geering and Lloyd, 1962; Frear, 1968). Sua presença é importante quando o patógeno atua como um envenenador estomacal. Também, com o uso de adesivos, eles não podem atuar reduzindo a patogenicidade. Farinhas, dextrinas, e gomas (Martin, 1959) e modernos adesivos sintéticos (soluções de estearatos aminados e polivinil clorado) formam suspensões dispersíveis em água, que secam e formam filmes insolúveis em água. Na Tabela I apresentam-se alguns dos adesivos usados ou recomendados para formular inseticidas microbianos.

C. Protetores

Alguns patógenos são altamente suscetíveis à dessecação, exposição à luz solar ou à radiação ultravioleta (Stephens, 1957; Cantwell and Franklin, 1966; Cantwell, 1967; David, 1967; David et al., 1968; Gudauskas and Canerday, 1968; Jaques, 1968; Jones and Mckinlay, 1986).

Dentre esses patógenos estão bactérias, vírus, fungos e protozoários, cuja formulação necessita incluir agentes que minimizem estes efeitos, para evitar a redução da patogenicidade.

Um dos métodos de proteção é pela encapsulação sendo que segundo alguns autores, esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* encapsulados apresentaram menor sensibilidade à luz solar e sua toxicidade foi mantida (Raun and Jackson, 1966; Raun et al., 1966; Greeves et al., 1968).

Outra metodologia preve a formação de grumos, pela adição de agentes que induzem a precipitação e aglomeração, mantendo o agente patógeno no centro do grumo e protegendo-o. Às vezes este material necessita de uma moagem adicional para se obter a uniformidade.

A formulação oleosa de *B. thuringiensis* (Thurricidae 90 TS) foi tratada para aumentar a resistência ao dano pela luz solar, ou piloto, tendo usado fubá, caolin, talco, bentonita, tween 80, amido, melaço, água de maceração de milho, etc, como agentes de formulação.

Outro ponto interessante a considerar é a compatibilidade do inseticida microbiano com pesticidas químicos, com a finalidade de se estabelecerem programas de controle integrado. A Tabela II fornece algumas pesquisas realizadas, sendo que envolvem principalmente *B. thuringiensis* e vírus. A compatibilidade com fungos é bastante complicado.

Concluindo, verificamos que há ainda um grande trabalho a ser desenvolvido no campo de formulação de pesticidas microbianos em função também dos hábitos dos insetos, em função de suas especificidades (moscas de frutos, insetos de solo, espécies aquáticas, etc), em função dos processos fermentativos desenvolvidos, e especialmente em vista da grande importância que os danos de muitas espécies representam não apenas à Agricultura mas principalmente à saúde pública.

TABELA 1 - Aditivos que tem sido adicionados a formulações de inseticidas microbianos

Aditivo	Tipo de patógeno	Referência	Compatibilidade
<u>Diluent (dust)</u>			
Pyrophyllite	Bt	Commercial literature	Rec
Talc	Bt	Commercial literature	Rec
Celite	Bt	Commercial literature	Rec
Chalk	Bt	Commercial literature	Rec
Starch	Bt	Commercial literature	Rec
Synthetic silicates	Bt	Commercial literature	Rec
Kaolin	Bt	Commercial literature	Rec
Bentonite	Bt	Commercial literature	Rec
Attapulgate	Bt	Commercial literature	Rec
Lactose	Bt	Ignoffo and Graham (1967)	Lab
Lactose	V	Ignoffo (1965)	Lab
Magnabentonite	V	Smlenoff (1967)	Field
<u>Wetting Agents and Spreaders</u>			
Alkyl phenols	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Valsol OT	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Lab
Sandovit	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Lab
Novémol	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Petro AG	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Colloidal X77	Bt	Tanada and Reiner (1962)	Field
Colloidal X77	V	Elmore (1961), Tanada and Reiner (1962)	Field
Triton X45	V	McEwen and Heivey (1958)	Lab
Triton X100	V	Clark and Reiner (1956)	Lab
Triton X100	V	Ignoffo <i>et al</i> (1965)	Field
Triton X114	Bt	Jaques and Fox (1960)	Field
Triton X155	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Lab
Latex surfactant	Bt	Morris (1969)	Lab
Igepal CO-630	Bt	Morris (1969)	Lab
Arlacel "C"	V	Clark and Reiner (1956)	Lab
Tween 20	f	Jaques <i>et al</i> (1968)	Lab
<u>Adhesives and Stickers</u>			
Tung oil	Bt	Lewis and Connola (1966)	Field
Wabot E77L	Bt	Commercial literature	Rec
Molasses	Bt	Commercial literature	Rec
Powdered skum milk	Bt	Commercial literature	Rec
Powdered skum milk	V	Commercial literature	Rec
Glutolin	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Methocel	V	Clark and Reiner (1956)	Lab
Methocel	Bt	Angus (1959), Herfs (1965), Heimpel (1967)	Lab
Polyvinyl chloride latexes	Bt	Angus (1959), Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Dried blood	V	Sinunoff (1967)	Field
Corn syrup	Bt	Stelzer (1967)	Field

TABLE I—cont

Kind of additive ^a	Type of pathogen ^b	Reference	Compatibility ^c
Adhesives and Stickers—cont			
Corn syrup	V	Stelzer (1967)	Field
Latex D	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Rec
Geon latex 652	Bt	Angus (1959)	Lab.
Geon latex 652	V	Smunoff (1967)	Field
Plyac	Bt	Morris (1969)	Lab.
Casein	Bt	Morris (1969)	Lab.
Folicote	Bt	Morris (1969)	Lab.
Lovo 190	Bt	Geering and Lloyd (1962)	Lab.
Lovo 192	Bt	Geering and Lloyd (1962), Morris (1969)	Lab.
Emulsifiers			
9D 207	Bt	Lewis and Connola (1966)	Field
9D 207	V	Wollenbarger (1965)	Lab.
Finolene 1882	Bt	Morris (1969)	Lab.
Tween 80	Bt	Angus <i>et al.</i> (1961)	Field
Tween 80	V	Clark and Reuner (1956)	Lab.
Span 80	Bt	Angus <i>et al.</i> (1961)	Field
Span 80	V	Clark and Reuner (1956)	Lab.
Triton B 1956	Bt	Tanada (1956), McEwen and Hervey (1959), Fox and Jaques (1961)	Field
Triton B 1956	V	McEwen and Hervey (1959)	Field
Triton B 1956	V	Clark and Reuner (1956)	Lab.
Bait Constituents			
Ground corn meal	Bt	Commercial literature	Rec.
Cottonseed oil	p	McLaughlin <i>et al.</i> (1968)	Field
Honey	p	McLaughlin <i>et al.</i> (1968)	Field
Hydroxy ethyl cellulose	p	McLaughlin <i>et al.</i> (1968)	Field
Miscellaneous			
Sodium chloride	Bt	Lewis and Connola (1966)	Field
Propionic acid	Bt	Lewis and Connola (1966)	Field
Xylene	Bt	Lewis and Connola (1966)	Field
Lactose	V	Ignoffo and Graham (1967)	Lab.
Benzene	V	Smirnov (1961)	Field
Boric acid	Bt	Doane and Wallis (1964)	Lab.

^a In some cases, the function is assumed since it is not stated in original reference.

^b Bt., *B. thuringiensis*; I, fungus; V, Virus; p, protozoan.

^c Lab.: In laboratory tests no indication that the additive was harmful to the pathogen.
Field: Good results obtained in field trials implying that under the conditions stated the additive did not significantly reduce effectiveness.

Rec.: Use of additive noted or recommended without supporting evidence about effect on pathogen, presumably harmless.

TABELA II - Pesticidas químicos já usados com inseticidas microbianos.

Pesticida	Patógeno	Referência	Compatibilidade
Inseticidas			
Azinphosmethyl	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Rec
Azinphosmethyl	V	Commercial literature	Rec
Bdtrin	Bt	Commercial literature	Rec.
Carbaryl	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960), Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Carbophenothion	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960), Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
DDD	Bt	Commercial literature	Rec
DDT	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
DDT	V	Wollenbarger (1965)	Field
Demeton	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960)	Field
Diazinon	Bt	Commercial literature	Rec.
Dieldrin	Bt	Commercial literature	Rec.
Dinotrocesnil	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Endosulfan	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Endrin	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Rec
Endrin	V	Commercial literature	
Malathion	Bt	Hofmaster and Ditman (1961), Wollenbarger (1965), Gardeau and Mitchell (1968)	Field
Malathion	Bt	Commercial literature	Rec
Malathion	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Unc.
Malathion	V	Hofmaster and Ditman (1961)	Field
Methyl parathion	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967), Commercial literature	Field
Methyl parathion	V	Ignoffo <i>et al.</i> (1965)	Unc
Methyl triethion	Bt	Commercial literature	Rec
Mevinphos	Bt	Commercial literature	Rec.
Mevinphos	V	Hofmaster and Ditman (1961), Wollenbarger (1965)	Field
Naled	Bt	Creghton <i>et al.</i> (1964), Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Naled	V	Hofmaster and Ditman (1961)	Field
Parathion	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960)	Field
Parathion	V	Hofmaster and Ditman (1961), Getzin (1962), Wollenbarger (1965)	Field
Pertthane	V	Hofmaster and Ditman (1961)	Field
Phosphamidon	Bt	Commercial literature	Rec
Pyrethrins	Bt	Commercial literature	Rec
Rotenone	Bt	Commercial literature	Rec
Ryania	Bt	Qatman (1966), Commercial literature	Field
Suobane	Bt	Commercial literature	Rec
TDE	Bt	Commercial literature	Rec
Tepp	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960), Commercial literature	Unc

TABLE II - *cont.*

Pesticide	Type of pathogen ^a	Reference	Compatibility ^b
Insecticides - <i>cont.</i>			
Tepp	V	McEwen and Hervey (1958)	Field
Toxaphene	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Toxaphene	V	Hofmeister and Disman (1961), Getzin (1962), Wolfenbarger (1965)	Field
Trichlorfon	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Fungicides			
Captan	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960)	Field
Chloranil	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960)	Field
COCs	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960)	Field
Copper oxychloride	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Dacnil	Bt	Commercial literature	Rec
Difolatan	Bt	Commercial literature	Rec
Dichloro	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Dimethoate	Bt	Commercial literature	Rec
Dithane M22 M45 Z78	Bt	Commercial literature	Rec
Dyrene	Bt	Commercial literature	Rec
Dodane	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960), Jaques (1963), Oatman (1968)	Field
Feibam	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960)	Field
Folpel	Bt	Commercial literature	Rec
Glyodin	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960), Jaques (1963)	Unc
Maneb	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960), Jaques (1963)	Field
Phenyl mercuric acetate	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960)	Field
Sulphur	Bt	McEwen <i>et al.</i> (1960)	Field
Thiocarbamates	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Zineb	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Ziram	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967)	Field
Acaricides			
Aramite	Bt	Commercial literature	Rec
Difocol	Bt	Herfs (1965), Heimpel (1967), Commercial literature	Field
Tetraclon	Bt	Commercial literature	Rec
Miscellaneous			
Maleic hydrazide	Bt	Commercial literature	Rec

^a Bt, *B. thuringiensis* V. Virus

^b Lab - In laboratory tests no indication that the additive was harmful to the pathogen
Field - Good results obtained in field trials implying that, under the conditions stated, the additive did not significantly reduce effectiveness

Rec - Use of additive noted or recommended without supporting evidence about effect on pathogen, presumably harmless

Unc - On the basis of the reported data, or because of the unavailability of the original reference, the effect of the additive on the pathogen is uncertain

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGUS, T.A. (1965). Bact. Rev., 29: 364-372.
- ANGUS, T.A.; HEIMPEL, A.M. and FISHER, R.A. (1961). Bi-Monthly Prog. Rep. Can. Dep. Forestry, 17: 1-2.
- ANGUS, T.A. and LUTHY, P. (1971). In: Microbial Control of Insects and mites. (H.D. Burges and N.W. Hussey, ed.). Academic Press Inc. pp. 623-638.
- BAILEY, S.F. and SMITH, L.M. (1951). Handbook of Agric. Pest Control. In Industry Pub. Inc., New York.
- BROWN, A.W.A. (1951). Insect Control by Chemicals. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- BURGES, H.D. and Hussey, N.W. (1963). Microbial Control of Insects and mites. 2.ed. Academic Press Inc., London. 861pp.
- CAMERON, J.W.M. (1963). Ann. Rev. Ent., 8: 265-286.
- CANTWELL, G.E. (1967). J. Invert. Pathol., 9: 138-140.
- CANTWELL, G.E. and FRANKLIN, B.A. (1966). J. Invert. Pathol., 8: 256-258.
- CHAMBERS, D.L. (1968). J. Invert. Pathol., 10: 245-261.
- CLARK, E.C. and REINER, C.E. (1956). J. Econ. Ent., 49: 703-704.
- CLARK, E.C.; KELLEN, W.R.; FUKUDA, T. and LINDEGREN, J.E. (1968). J. Invert. Pathol., 11: 1-7.
- DAVID, W.A.L.; GARDINER, B.O.C. and WOOLNER, M. (1968). J. Invert. Pathol. 11: 496-501.
- DULMAGE, H.T. (1967) In: Insect Pathology and Microbial Control (P.A. van der Laan. ed.). North Holland Pub. Co., Amst. pp.120-124.

- ENTWISTLE, P.F. (1986). In: Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology (R.A. Samson, J.M. Vlask and D. Peters, ed.) Ed. IV ICIP, The Netherlands. pp.613-615.
- FREAR, D.E.H. Ed. (1968). Pesticide Handbook-Entoma. 20.ed. Coll. Science Publishers, State College, Pennsylvania.
- FURMIDGE, C.G.L. (1959a). J. Science Food Agric., 5: 267-273.
- FURMIDGE, C.G.L. (1959b). J. Science Food Agric., 5: 274-282.
- GEERING, Q.A. and LLOYD, J.H. (1962). J. Econ. Ent., 55: 786-790.
- GREAVES, J.H.; ROWE, F.P.; REDFERN, R. and AYRES, P. (1968). Nature, London, 219: 402-403.
- GUDAUSKAS, R.T. and CANERDAY, D. (1968). J. Invertebrate Pathol., 12: 405-411.
- HALL, I.M. (1963). In: Insect Pathology and Advanced Treatise (E.A. Steinhilber), Academic Press, New York. Vol2, p.477-517.
- HARTLEY, G.S. (1960). Chemical Industries: 448-452.
- HEDLUND, R.C. and PASS, B.C. (1968). J. Invert. Pathol., 11: 25-34.
- JAQUES, R.P. (1968). Can. J. Microb., 14: 1161-1163.
- JONES, K.A. and MCKINLEY, D.J. In: Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. Ed. IV ICIP, The Netherlands, p.155.
- KILLICK, H.J. (1986). In: Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. Ed. IV ICIP, The Netherlands. p.620.
- LEWIS, F.B. and CANOLLA, D.P. (1966) U.S. Forest Service Research Paper NE-50.
- MAGNOLER, A. (1968) J. Invertebrate Pathol., 11: 326-328.
- MARTIN, H. (1959) The Scientific Principles of Crop Protection. Edward Arnold (Publishers) Ltd, London

BIOLOGICAL CONTROL OF FOLIAR DISEASES

Yigal Elad

Dep. of Plant Pathology, Agricultural Research Organization, The Volcani Center
Bet Dagan 50250, Israel

Biocontrol of foliar diseases is not well studied as this of soilborne diseases, however, research has advanced considerably in the last few years. The aim of reduction of fungicide residues in agricultural products, the public concern of environmental pollution and the absence of satisfactory chemical solution for certain diseases has encouraged the development of foliar biocontrol. Important points to be taken care during development of an effective biocontrol preparation are: Selection of an effective microorganisms from the agricultural niche where it is going to be applied, by an *in vitro* bioassay. Ability of the candidate to survive non optimal conditions. Acceptable mode of action preferably competition. Formulation which assists with dispersal, contacts with host and activity. Compatibility with other procedures involved in the commercial practice.

All the above mentioned demands were applied in the development of biological control of gray mold disease by means of *Trichoderma* spp. The system is presented and discussed. A preparation of the effective isolate was prepared and applied under commercial conditions. Botrytis disease was controlled on grape berries and in vegetable crops e.g. cucumber and tomato grown in non-heated greenhouses. A reduction of ca. 50% in disease severity was obtained on stems, fruits and leaves. Levels of population of the biocontrol agent over leaves and fruits were above 10^5 - 10^6 after initial applications on plants. Later in the growth season, after few sprays it becomes stable even between sprays. We hope to select isolates which will be non-sensitive to fungicides used in greenhouses. The mode of action of *Trichoderma* sp. against *Botrytis cinerea* is competition for space and nutrients.

CONTROLE ALTERNATIVO APLICADO A CULTURA DE CAFÉ

Walquyria B.C. Moraes
Seção de Bioquímica Fitopatológica. Instituto Biológico
Caixa Postal 7119. São Paulo-SP.

INTRODUÇÃO

Sob a denominação genética de **Controle Alternativo**, estão incluídos todos os tipos de controle, quer sejam de pragas ou de doenças, que não façam uso de defensivos agrícolas, embora possam esses diferentes métodos ser associados de maneira integrada aos métodos tradicionais de controle químico.

São considerados métodos alternativos o **Controle Biológico** e o **Controle Induzido**.

No **Controle Biológico**, o alvo principal é a própria praga ou o patógeno que se quer combater. O combate é feito através do emprego de microrganismos isolados do próprio meio ambiente, não-patogênicos, quase sempre saprofitos, que vão agir diretamente sobre o patógeno, inibindo-o, destruindo-o ou causando um bloqueio de seu desenvolvimento por competirem diretamente pelas fontes de alimento e energia. Muitos microrganismos empregados no controle biológico são produtores de substâncias tóxicas que atuam diretamente sobre o metabolismo do patógeno em potencial. Algumas dessas substâncias são altamente específicas, como as bacteriocinas produzidas por algumas bactérias, outras são inespecíficas como as enzimas quitinolíticas produzidas por diversos fungos saprofitos e hiperparasitas.

O **Controle Induzido**, que engloba tanto a indução de proteção como a imunização, difere fundamentalmente do primeiro por ter sua ação direcionada à planta hospedeira, e não ao patógeno propriamente. Certamente, como um efeito secundário, haverá inibição, bloqueio ou mesmo a morte do patógeno.

Todo controle induzido pressupõe o acontecimento de alterações no mecanismo bioquímico da resposta de resistência da planta com reflexos na expressão genética da resistência da mesma

O termo indução de proteção tanto pode ser utilizado para designar uma proteção local, isto é, uma resistência induzida apenas nos tecidos que receberam o tratamento com o agente indutor, como uma resistência à distância do local do tratamento de efeito sistêmico na planta. Entretanto, pesquisadores modernos vêm sugerindo que se empregue o termo **Imunização** quando se tratar de indução de proteção sistêmica. O termo **imunização** leva a uma conotação com a **vacinação** empregada no homem e nos animais. Assim, uma planta imunizada contra um agente fitopatogênico equi valeria, guardando as devidas proporções a uma planta "vacinada". Entretanto, essa conotação deve ser tomada com muitas restrições, uma vez que os mecanismos envolvidos nos dois processos são fundamentalmente diferentes. No caso das vacinas de uso humano e animal, o efeito é altamente específico, enquanto que a imunização de plantas é um processo inespecífico, geralmente de largo espectro quanto aos patógenos potencialmente atingíveis de eficiência limitada no tempo, salvo algumas exceções e pode ser alcançada não apenas a partir do uso de microrganismos vivos ou mortos, mas também a partir de produtos metabólicos deles ou mesmo a partir de macromoléculas indutoras extraídas de suas paredes celulares.

Na presente palestra, procuraremos nos ater mais especificamente ao controle alternativo da ferrugem do cafeeiro em laboratório e campo, abordando tanto o controle induzido (indução de resistência e imunização) como o controle biológico.

INDUÇÃO DE PROTEÇÃO

- Indução de resistência pelo próprio patógeno ou seus metabólitos

No Brasil, os trabalhos pioneiros sobre indução de resistência a fungos se iniciaram com café à época do aparecimento da ferrugem, por iniciativa do Instituto Biológico de São Paulo.

Trabalhando com plantas de café cv. Mundo Novo, em condições de laboratório e casa-de-vegetação, Martins et al. (1973) verificaram a possibilidade de induzir proteção a uma subsequente infecção por *Hemileia vastatrix* através do tratamento prévio das folhas com uma suspensão de uredíniosporos termicamente inativados do patógeno, a intervalos de 24, 48 e 72 horas antes da inoculação com uredíniosporos viáveis. As porcentagens

de proteção alcançadas foram da ordem de 67%, 56% e 92%, respectivamente. Em 1976, Moraes *et al.* aprofundando-se mais nos estudos anteriormente iniciados verificaram que intervalos até de 7 dias entre o tratamento e a inoculação não afetavam a taxa de proteção induzida, a partir do que havia acentuada redução da mesma. Também ficou claro que é necessário um balanço entre as concentrações do indutor e do inóculo para que a proteção seja efetiva. Assim, mantendo-se a concentração do indutor e aumentando-se a do inóculo, determina-se uma redução no índice de proteção. A proporção mínima que se mostrou efetiva foi de 1:1.

Até aquele momento, a proteção induzida era tratada como de efeito apenas local. Restava saber se ela podia ser alcançada à distância, ou seja, se ela poderia ser sistêmica e se a presença física dos uredínios poros era essencial para que ela se processasse. Segundo Beretta *et al.* (1977), não apenas a suspensão de uredíniosporos termicamente inativados era eficiente, mas também o filtrado da água de lavagem dos mesmos. Uma proteção de 65,3% foi alcançada para uma proporção de concentração de uredíniosporos na preparação indutora em relação ao inóculo de 2:1 e com um intervalo entre o tratamento e a inoculação de 96 horas. Os autores também verificaram que a proteção induzida era sistêmica e que se dava tanto entre meias folhas como entre folhas opostas.

A partir daí, vários trabalhos foram realizados para isolamento e determinação da natureza química da substância indutora presente no lavado de uredíniosporos vivos ou autoclavados (Moraes *et al.*, 1981; Martins *et al.*, 1983), ao mesmo tempo que se processavam outros estudos sobre os mecanismos de resistência da planta, a biologia do patógeno, o emprego de métodos serológicos para uma possível identificação das raças fisiológicas do fungo e sobre os mecanismos de reconhecimento e de infecção do patógeno. Partindo de estudos preliminares realizados por Moraes *et al.* (1981), Guzzo *et al.* (1987b), demonstraram que o indutor liberado em meio aquoso a partir tanto de uredíniosporos autoclavados como daqueles vivos, é de natureza polissacarídica, termo-estável e constituído majoritariamente por resíduos de manana ligados em configuração β e de pequenas quantidades de resíduos de glucose e galactose, também ligados em β -configuração. O indutor purificado não teve qualquer influência quer na germinação dos uredíniosporos do fungo, quer na formação de apressórios, penetração e diferenciação da vesícula sub-estomática, sugerindo que a inibição do desenvolvimento do fungo se dá em fases posteriores à penetração

Rodrigues et al. (1975) verificaram a possibilidade de aumentarem a resistência de cafeeiros pela inoculação de raças avirulentas como indutor de proteção seguida da inoculação com a raça virulenta. A redução obtida foi da ordem de 80% para as plantas tratadas com a raça avirulenta.

- Indução de resistência por microrganismos não patogênicos ao café

No Brasil, experimentos preliminares mostraram a possibilidade de se induzir proteção em cafeeiros a partir de microrganismos não patogênicos ao café (Beretta et al., 1980 e Martins et al., 1980).

Em experimentos posteriores, foram conseguidos índices de proteção variando de 40 a 94%, através da inoculação de vários não-patógenos como: *Puccinia psidii* (85%), *Tranzschelia pruni spinosae* var. *discolor* (94%), *P. oxalidis* (41%), *Uromyces maydis* (60%), *Helminthosporium carbonum* (64%) e *Mycospahaerella melonis* (80%). Bactérias não-patogênicas ao café ou saprofitas também demonstraram ação indutora contra a ferrugem, tais como o *Bacillus megaterium* (92,5%), *Xanthomonas manihotis* (92%), *Alcaligena faecalis* (60%), *Bacillus subtilis* (56%) e *Pseudomonas rubrilineans* (52%). Alguns não-patógenos testados não chegaram a induzir resistência ou os índices alcançados não foram significativos (Martins et al., 1985). A proteção obtida pelo tratamento com os fungos não-patogênicos, apesar de ter sido testada apenas localmente, não parece ter sido devida a uma ação sobre o patógeno, uma vez que a influência dos mesmos sobre a germinação dos urediniosporos de *H. vastatrix* foi sempre menor que 20% para uma proteção sempre superior a 60%, com exceção da proteção induzida por *P. oxalidis* que não ultrapassou a 40,5%. No caso da utilização de bactérias e bacilos como indutores, o efeito sobre a germinação do patógeno foi ainda menor, não ultrapassando a casa de 14%, para uma proteção que variou de 52% a 92,5% (Beretta et al., 1980 e Martins et al., 1980).

A partir de 1985, iniciaram-se estudos sobre a possível utilização de preparados comerciais do *Bacillus thuringiensis* como promotor de resistência em plantas de café (Roveratti et al., 1985; 1987b; 1989b).

Tanto proteção local como sistêmica foram conseguidas pelo tratamento de plantas de café com produtos comerciais à base de *B. thuringiensis*, tais como Thuricide HD, Bactospeine PM e Bactimos. Todas as formulações empregadas, inclusive a preparação e preparação comercial do próprio

bacilo liofilizado mostraram Índices de proteção induzida bastante elevados, variando de acordo com a formulação e concentração do produto utilizado. Especialmente no caso do Thuricide HD, a proteção foi efetiva em concentrações que variaram de 5 a 100 g/l, atingindo índices de 99% para as concentrações de 50 e 100 g/l. Quanto aos intervalos entre a aplicação do produto e a inoculação com a ferrugem, a variação de até 5 semanas não alterou de forma substancial as taxas de proteção alcançadas (82% a 97%) para uma concentração de 20 g/l (Roveratti et al., 1987a; 1989b). Além da redução do número médio de lesões observadas por folha tratada, os autores também observaram uma redução do tamanho das lesões e um retardamento na esporulação daquelas lesões que lograram se formar nas plantas tratadas.

Estudos realizados à nível de campo têm se mostrado bastante promissor, embora ainda sem resultados conclusivos.

Três isolados de *Verticillium lacanti* que se mostraram ativos no controle da ferrugem do feijão e do trigo, na Alemanha, não foram efetivos no controle da ferrugem do café.

Por outro lado, bons resultados, à nível de laboratório, foram obtidos com o emprego de um lavado aquoso de células de *Xanthomonas manihotis*, rico em exopolissacarídeos (EPS), que nas concentrações de 12,5 a 200 eq. µg de glucose/ml induziram proteção entre 50 e 57% contra a ferrugem do café. Neste caso foi também comprovada a indução sistêmica, bem como a não influência do tratamento quer na germinação dos uredíniosporos de *H. vastatrix*, quer na formação de apressórios (Guzzo et al., 1987a).

- Controle biológico

Trabalhos recentes vêm estudando a possibilidade de se controlar a ferrugem biologicamente através do emprego de suspensões de células vivas de *B. thuringiensis* das variedades *kurstaki*, *subtoxicus* e do isolado 998, crescidas em meio de cultura (Roveratti et al., 1989 - comunicação pessoal). Os autores verificaram que os resultados eram positivos no controle da ferrugem, embora essas preparações tenham atuado apenas à nível de proteção local, tendo afetado a germinação dos uredíniosporos, tanto "in vitro", como "in vivo", mas não alterando a formação de apressórios dos mesmos. Porém, a caracterização do mecanismo de ação sobre os uredíniosporos da ferrugem ainda deverá ser esclarecida.

Os mesmos autores dando seqüência aos trabalhos com *B. subtilis* B50, vêm realizando uma série de experimentos para demonstrar o efeito protetor desse isolado, associado ou não, a um efeito de controle biológico sobre o patógeno.

Bettiol *et al.* (1988) vêm demonstrando a possibilidade de se exercer um controle biológico da ferrugem através do emprego de vários isolados de *B. subtilis*, à nível de laboratório, com resultados positivos que variam de 85% a 100% na inibição da germinação dos uredíniosporos da ferrugem, quando aplicados 24 horas antes da inoculação com o patógeno.

A utilização de células vivas ou autoclavadas do produto biológico comercial "Fermento Fleischmann", usado em panificação, vem demonstrando a possibilidade da utilização desta levedura como agente biológico para o controle da ferrugem, tanto à nível de laboratório como de campo (Roveratti *et al.*, 1985; 1987b). Células vivas ou autoclavadas da levedura usadas em concentrações variando de 5 a 30 g/l propiciaram uma redução na infecção por *H. vastatrix* da ordem de 90%. A proteção foi efetiva até 5 semanas, quando a concentração das células vivas foi de 20 g/l. Entretanto, os autores verificaram que a proteção observada não era resultado de uma indução de resistência, mas antes de uma combinação de dois efeitos: a inibição da germinação dos uredíniosporos do patógeno e a diminuição da aderência dos mesmos sobre a superfície foliar (Roveratti, 1989a).

- Perspectivas para uso futuro do controle induzido

A exemplo do que vem ocorrendo em países avançados, a tendência cada vez maior de buscar formas alternativas de controle de doenças e pragas das culturas de importância econômica nos estimulam a continuar as pesquisas ora em desenvolvimento e mesmo, em ampliar esses estudos, aplicando-os a outros sistemas patógeno-hospedeiro.

Acreditamos ser possível num futuro não tão distante a substituição, pelo menos parcial, dos defensivos agrícolas por formas mais inócuas de combate de microrganismos e de pragas. Acreditamos, também, que mesmo com o desenvolvimento pleno das pesquisas e a seleção de microrganismos ou de seus produtos com alto potencial como indutores de resistência ou agentes de controle biológico, sempre estes serão usados de forma inte-

grada com os defensivos clássicos, pelo menos com uma aplicação inicial destes últimos para diminuir o inóculo inicial do patógeno.

Entretanto, é possível que, como já foi demonstrado para o fumo em relação ao mofo azul, no futuro se possa imunizar plantas com um efeito que dure por todo o ciclo da cultura. Pelo menos nas culturas anuais a possibilidade existe. Quanto às culturas perenes, faz-se necessário ainda muitos estudos a médio e longo prazo sobre a duração da eficiência da imunização.

Com o advento da engenharia genética, maiores possibilidades se abriram neste campo, não apenas pelas possibilidades de se obter microrganismos geneticamente manipulados, que tenham maior eficiência como indutores ou agentes de controle biológico, mas também pela possibilidade de se poder incorporar nas plantas genes provenientes de microrganismos, capazes de produzir naquelas os indutores constitutivos que vão estimular de maneira constante os mecanismos inespecíficos de resistência e resposta da planta hospedeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERETTA, M.J.G.; MARTINS, E.M.F. e MORAES, W.B.C. Induced protection to *H. vastatrix* at a distance from this site of the inducing action in coffee plants. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 3: 66-70, 1977.
- BERETTA, M.J.G.; MARTINS, E.F. e MORAES, W.B.C. Indução de proteção a *H. vastatrix* em plantas de café suscetíveis por fungos não-patogênicos ao cafeeiro. In: XIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Itaguaí, 1980. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 5: 387, 1980.
- BETTIOL, W.; GALVÃO, J.A.H.; GHINI, R. e MENDES, M.D.L. Efeito de *Ba cellus subtilis* sobre a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) In: XII Congresso Paulista de Fitopatologia, Araras, 1989. Summa Phytologia, Piracicaba, 15: 43, 1989.
- GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. e MORAES, W.B.C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. 1. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. Fitopatologia Brasileira, 12: 377- . 1987a.

- GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.; BACH, E.E.; MORAES, W.B.C.; LOPEZ, A.M.Q. e PUCCA, L.E. Indução de resistência em cafeeiros suscetíveis a *Hemileia vastatrix* por exopolissacaridos de *Xanthomonas campestris* pv. *manihoti*. In: XX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Londrina, 1987. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12: 130, 1987b.
- MARTINS, E.M.F.; BERETTA, M.J.G. e MORAES, W.B.C. Indução de proteção a *Hemileia vastatrix* em plantas de café suscetíveis por fungos não-patogênicos ao cafeeiro. In: XIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Itaguai, 1980. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 5: 425, 1980.
- MARTINS, E.M.F.; BERETTA, M.J.G.; ROVERATTI, D.S. e MORAES, W.B.C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 10: 627-636, 1985.
- MARTINS, E.M.F.; GUZZO, S.D.; ALBA, A.P.C.; ROVERATTI, D.S.; MIGLIOLI, D. M.M. e MORAES, W.B.C. Differences between the biochemical behaviour of filtrates of water-washes of autoclaved and non-autoclaved urediniosporos of *Hemileia vastatrix*. In: IV International Congress of Plant Pathology, Melbourne, 1983. Proceedings. Melbourne, Australian Academy of Sciences, 1983. p.746.
- MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. e OLIVEIRA, D.A. Proteção induzida em cafeeiros suscetíveis a *Hemileia vastatrix*. In: I Congresso Brasileiro sobre Pragas e Doenças do Cafeeiro, Vitória, 1973. Resumos. Vitória, 1973. p.8.
- MORAES, W.B.C.; MARTINS, E.M.F. e BERETTA, M.J.G. Studies on the induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. III. Chemical analysis of the inducer. In: Colloque International sur la Protection des Cultures Tropicales, Lyon, 1981. Resumes. Lyon, 1981. p.58.
- MORAES, W.B.C.; MARTINS, E.M.F.; MUSUMECI, M.R. e BERETTA, M.J.G. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 2: 39-43, 1973.
- RODRIGUES JR., C.J.; MEDEIROS, E.F. e LEWIS, B.G. The relationship between lexin like response in coffee leaves (*Coffea arabica* L.) and incompatibility with *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Physiological Plant Pathology, London, 6: 35-41. 1975

- ROVERATTI, D.S. Proteção de plantas de café (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. por *Saccharomyces cerevisiae* Meven. Piracicaba, 1989a. 96p. (Mestrado - ESALQ/USP).
- ROVERATTI, D.S.; GUSSO, S.D. e MORAES, W.B.C. Emprego de controle alternativo da ferrugem do cafeeiro através da indução de resistência. In: XII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu, 1985. Anais. IBC, 1985. p.39.
- ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.R.R. e MORAES, W.B.C. Controle alternativo da ferrugem do cafeeiro pela utilização de produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis*. In: XX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Londrina, 1987. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12:137, 1987a.
- ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.R.R. e MORAES, W.B.C. Emprego de *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo indutor de proteção em plantas de café a *Hemileia vastatrix*. In: XX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Londrina, 1987. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12: 137, 1987b.
- ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.R.R. e MORAES, W.B.C. *Bacillus thuringiensis* - A new perspective for and induced protection to coffee leaf rust. Journal Phytopathology, Berlin, 126: 149-159, 1989b.

POSSIBILIDADE DO CONTROLE BIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA
(*Crinipellis perniciosa*) DO CACAUEIRO

Cleber N. Bastos
CEPLAC, Pará

A enfermidade do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) conhecida vulgarmente por vassoura-de-bruxa é causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* e se constitui num dos principais problemas fitossanitários da cacauicultura em vários países produtores de cacau. O método de controle atualmente recomendado são as práticas culturais mais especificamente as podas fitossanitárias, que consistem na remoção de todas as partes infectadas. Todavia, a eficiência e custo destas práticas dependem de muitos fatores, principalmente do nível de infecção das plantas.

Uma das possibilidades de minimizar as perdas causadas pela vassoura-de-bruxa e reduzir o potencial de inóculo é através do controle biológico do inóculo de *C. perniciosa* na fase saprofitica empregando-se microrganismos saprófitas antagonísticos capazes de suprimir a formação ou causar destruição dos basidiocarpos. Bastos (1979) e Andebrhan (1981), isolaram os fungos *Clodobotryum amazonense* (Bastos et al., 1981) e *Venturiella lamellicola*, como hiperparasitas de basidiocarpos de *C. perniciosa*, respectivamente. Bastos (1979) verificou que quando uma suspensão de esporos mais fragmentos de micélio de *C. amazonense* era aplicada em vassouras secas e em basidiocarpos, o hiperparasita colonizava os basidiocarpos impedindo a liberação e disseminação de basidiosporos.

Alguns fungos têm sido registrados como competidores de *C. perniciosa* em vassouras secas do cacauzeiro, formando zonas de confrontação no cortex e competindo com o micélio do patógeno durante a colonização das vassouras com conseqüente redução na produção de basidiocarpos (Hedger, 1985).

Resultados promissores vêm sendo obtidos com o controle biológico de doenças de plantas utilizando espécies do gênero *Trichoderma* (Pavizas, 1981; Baker & Cook, 1982; Cook & Baker, 1983). Apesar de *Trichoderma* ser um saprófita do solo, algumas espécies são antagonísticas a fungos que atacam a parte aérea de plantas (Grosclaude, 1970; Grosclaude et al.,

1973). Com relação a enfermidade vassoura-de-bruxa do cacau, Bastos (1986) constatou, a partir de experimentos realizados sob condições controladas, que uma suspensão de conídios de *T. vici* aplicada em vassouras secas em estágio de produtividade de basidiocarpos, provocou uma paralisação na produção desses. Em experimentos conduzidos em condições de campo, utilizando vassouras no solo e penduradas em cacauzeiros, *T. vici* reduziu significativamente a produção de basidiocarpos (Bastos, 1988). Foi verificado que o antagonista coloniza rapidamente as vassouras, formando na superfície massas esporógenas brancas e paralisando totalmente a esporulação de *C. perniciosa*.

Acredita-se que no ecossistema do cacau na Amazônia há a possibilidade de se estabelecer uma população de fungos saprófitas antagonistas em vassouras secas do cacauzeiro, com perspectivas de sua utilização no controle biológico de *C. perniciosa* e consequente redução na incidência de infecção nos frutos e lançamentos vegetativos.

Os resultados obtidos com as pesquisas sobre o controle biológico da vassoura-de-bruxa são muito animadores, permitindo já prever novas alternativas de controle de enfermidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, R.F. and COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1982. 433p.
- BASTOS, C.N. Hiperparasitismo do fungo *Dactylium* sp. a *Crotopellis perniciosa* (Stahel) Singer em vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. Revista Theobroma, Itabuna, 9(4): 197-200, 1979.
- BASTOS, C.N.; EVANS, H.C.; SAMSON, R.A. A new hyperparasitic fungus, *Cladobotryum amazonense*, with potential for control of fungal pathogens of cocoa. Transactions of the British Mycological Society, 72(2):273-278, 1981.
- BASTOS, C.N. Resultados preliminares sobre controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crotopellis perniciosa*) do cacauzeiro. In: CEPLAC DEPEA, Informe Técnico. 1986. p.78-79

- BASTOS, C.N. Resultados preliminares sobre a eficácia de *Trichoderma viride* de no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacaueteiro. Fitopatologia Brasileira, 23(4): 340-342, 1988.
- COOK, R.J. & BAKER, K.J. The nature and practices of biological control of plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983. 539p.
- GROSCLAUDE, C. Premiers essais de protection biologique des blessures de taille vis-à-vis du *Stereum purpureum* Pers. Annals de Phytopathologie, 2: 205-216, 1970.
- GROSCLAUDE, C.; RICHARD, J. & DUBOS, B. Inoculation of *Trichoderma viride* spores via pruning shears for biological control of *Stereum purpureum* on plum tree wounds. Plant Disease Reporter, 57: 25-28, 1973.
- HEDGER, J.N. Tropical agarics: resource relation and fruting periodicity. In: MOORE, D.; CASSELTON, L.A.; WOOD, D.A. & FRANKLAND, J.C. (ed.). Development Biology of Higher Fungi. Cambridge, Cambridge University Press, 1985. p.41-46.
- PAPAVIZAS, G.C. Biological control in crops production. Allanheld Osmun & Co. Publishers, Inc., 1981. 461p.

CONTROLE BIOLÓGICO DE PODRIDÕES DE RAÍZES DE MACIEIRA,
CAUSADAS POR *Phytophthora* spp.

Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

Pesquisador, EMBRAPA-CNPFT/

Campo Experimental de Vacaria

Caixa Postal 177

05200 - Vacaria-RS.

As podridões de raízes de macieira constituem-se em problema grave de mortalidade de plantas. O manejo do solo em pomares é um dos fatores importantes na diminuição dessas perdas.

A simples substituição de plantas doentes apresentava-se como um problema, visto que em solo tratado com brometo de metila ocorria a podridão de raízes, da muda replantada.

Assim, visando proteger o solo de replante de macieira, foram selecionados isolados de *Trichoderma* antagônicos à *Phytophthora*, que fossem competitivos e adaptados às condições de solo da região produtora de maçã do RS. Como o uso de tratamento com formaldeído no solo das covas apresentou vantagens em relação ao controle de *P. cactorum*, decidiu-se pela aplicação consecutiva de formaldeído 3% i.a. e de *Trichoderma*. A produção de inóculo de *Trichoderma* está sendo feita utilizando o sorgo sacari no como substrato e acondicionando-se em embalagens de cerca de 24 g, disponíveis para aplicação, a partir do mês de julho. O produto vem sendo bem aceito pelos produtores de maçã, confirmando-se suas vantagens.

Esta embalagem de manejo integrado de fungos de solo tem potencial para uso em viveiros e casa de vegetação, visando evitar a infestação do substrato com fungos do solo patogênicos às culturas, podendo ser associado aos tratamentos curativos do sistema radicular.

POSSIBILIDADES DE CONTROLE BIOLÓGICO DO MAL-DO-PÉ DE TRIGO

Erlei Melo Reis

Centro Nacional de Pesquisa do
Trigo. Caixa Postal 569
99105 - Passo Fundo - RS

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico de fungos infectantes de raízes pela ação antagônica de microrganismos tem sido estudado por mais de 65 anos (2,5). A partir de 1965, o interesse da pesquisa nesta área aumentou consideravelmente (2). Ao mesmo tempo tem havido uma mudança na filosofia do controle de doenças de plantas fazendo com que o controle biológico possa desempenhar um importante papel na agricultura do futuro e, isto tem incentivado a pesquisa em diversos lugares.

Os microrganismos que desenvolvem-se na rizosfera são ideais para o uso como agentes de biocontrole, isto porque a rizosfera constitui-se na primeira linha de defesa das raízes contra o ataque dos fungos infectantes de raízes. Os patógenos encontram antagonismo dos microrganismos antes da penetração do córtex radicular e depois, durante o desenvolvimento do patógeno sobre as raízes.

No caso do mal-do-pé, causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt), como a resistência genética à doença é de difícil obtenção e o controle químico é antieconômico, o controle biológico surge como uma opção viável.

2. BACTERIZAÇÃO DE SEMENTES DE TRIGO

Segundo Brown (4), bacterização é o tratamento de sementes ou de raízes de plântulas com culturas de bactérias para melhorar o crescimento das plantas.

O mal-do-pé do trigo é uma das mais importantes doenças radiculares não só no Brasil (9) como em vários outros países (7,8). A ocorrên-

cia do fenômeno denominado declínio desta doença levou a muitos pesquisadores a investigarem atentamente as causas envolvidas na sua ocorrência (1,3,7,8,12). O fator de declínio era transferível quando misturava-se solo supressivo a um condutivo. Demonstrou-se, também, que o calor úmido a 60°C por 30 minutos o destruía, o que comprovou ser de natureza biológica. Foi, posteriormente, verificado que o declínio sõ ocorria na presença de raízes infectadas (14). Procedeu-se a isolamentos da rizosfera de plantas de trigo cultivadas em solo onde ocorria a supressividade tendo sido demonstrado que bactérias do gênero *Pseudomonas* eram as principais causas do fenômeno da supressão (15).

Pensou-se na potencialidade de uso destes agentes no controle da doença em escala comercial. Desta maneira, o mal-do-pé do trigo, da cevada, do centeio e do triticale constitui-se num exemplo de doenças de importância econômica na qual se procura desenvolver um produto biológico formulado comercialmente.

Convém salientar-se que o fungo Ggt é um parasita que cresce ectotroficamente sobre a superfície das raízes do trigo antes da penetração (9). Isto o torna sujeito ao efeito inibidor da competição microbiana do rizoplano e da rizosfera.

As bactérias *Pseudomonas* spp. fluorescentes, anteriormente isoladas e produtoras de antibiótico, eram mais numerosas sobre as raízes do trigo em solos onde este cereal era cultivado em monocultura do que em rotação de culturas o que confirmou serem estas bactérias as principais responsáveis pelo fenômeno de declínio (16,17). Weller e Cook (17), selecionaram alguns isolados destas *Pseudomonas*, antagônicas a Ggt em cultura, e inocularam sementes de trigo com estas bactérias. Dois isolados reduziram a intensidade da doença em ensaios conduzidos a campo havendo evidências de que a mistura de dois isolados foi superior ao uso das cepas individuais. Os autores calcularam que as raízes das plantas originadas de sementes inoculadas continham 10⁶ unidades formadoras de colônias por 0,1 g de tecido radicular três semanas após o plantio em condições de campo. Estes isolados mostraram-se competitivos no ambiente radicular sob condições de campo e a colonização das raízes seminais pelas bactérias chegou a ser de 100%, porém, nas coronais sã 10%. A bactéria introduzida foi mais efetiva em proteger as raízes seminais do que as coronais.

O sucesso do controle biológico, logicamente, dependerá do es-

tabelecimento e da manutenção de um limiar populacional da bactéria sobre as raízes ou no solo. Um decréscimo da viabilidade abaixo daquele nível poderá eliminar a possibilidade de controle.

As formulações experimentais têm sido testadas empregando a turfa como veículo (pó ou granulado). O sucesso dependerá da manutenção da competição ecológica da bactéria introduzida no solo via semente. Deve-se enfatizar que o controle efetivo só será alcançado se houver uma colonização efetiva do rizoplano. A melhor temperatura do solo, para isto é de 20°C. Os rendimentos de grãos de trigo foram superiores, nas parcelas com sementes tratadas, em média 17% em experimentos de campo e em 11% em escala comercial (17).

Embora o controle não tenha sido completo, este método mostrou-se promissor e por isto, os autores patentearam o uso desta bactéria em trigo visando o controle desta doença radicular pela bacterização das sementes.

3. ROTAÇÃO DE CULTURAS

A rotação de culturas é uma prática agrícola recomendada desde há muito tempo. A observação e a experiência antiga mostravam aos agricultores e necessidade de variar os cultivos em um mesmo campo. Por conceito, constitui-se na alternância, mais ou menos regular de diferentes culturas em uma mesma área. Essa troca deve ser de acordo com um planejamento adequado, no qual devem ser considerados diversos fatores, entre eles a cultura predominante da região em torno da qual será planejada a rotação, além dos fatores ambientais que influirão nas culturas escolhidas para a sucessão (13).

No sul do Brasil, o trigo tem sido, praticamente, a única opção para o agricultor como cultura de inverno produtora de grãos. Os incentivos dados a esse cereal podem ter contribuído para isso. Sua exploração em larga escala, sem obedecer a rotação de culturas, trouxe um aumento, principalmente, das podridões radiculares do trigo entre as quais o mal-do-pé (13).

Gaeumannomyces graminis var. *tritici*, tem sido historicamente



controlado por rotações relativamente curtas, um ou dois anos, com espécies não suscetíveis, isto por que o fungo não possui propágulos dormentes e morre quando o resto cultural do hospedeiro decompõem-se. Estas rotações são eficientes na ausência de gramíneas que não sejam suscetíveis ao agente causal.

O fungo Ggt é controlável pela rotação de culturas, através da sucessão de espécies vegetais de inverno, não suscetíveis. A vulnerabilidade deste patógeno ao controle pela rotação deve-se ao fato deste fungo não apresentar estruturas de descanso, de resistência e nem habilidade de competição saprofítica (9). Assim, a prática da rotação constitui-se num método de controle biológico (5,6), ao submeter o patógeno à competição microbiana, não específica, durante a decomposição dos tecidos radiculares do trigo. Ao completar-se a mineralização dos restos culturais do hospedeiro o patógeno perecerá por desnutrição. A rotação de culturas o submete a um grande estresse nutricional, o que determina a sua eliminação do solo naquela área. Além disto, as espécies vegetais que entram no sistema agrícola podem favorecer ao desenvolvimento da antibiose do solo o que contribui, também, para a eliminação mais rápida do patógeno do solo cultivado.

No momento, a medida de controle mais viável para esta podridão radicular do trigo, no Brasil, é a rotação de culturas (11). O seu efeito é facilmente avaliado como demonstram as Tabela 1 e 2. Além do controle desta doença a rotação é, também eficiente na redução do inóculo dos parasitas necrotróficos da cultura do trigo tais como: *Drechslera tritici-repentis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Septoria nodorum*, *S. tritici* e *Xanthomonas campestris* pv *undulosa* (11).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKER, R. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., 6: 263-94, 1968.
2. BAKER, K.F. Envolving concepts of biological control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., 25: 67-85, 1987.
3. BAKER, K.F. and COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. San Francisco, W.H. Freeman and Company, 1974. 433p.

4. BROWN, M.E. Seed and root bacterization. Ann. Rev. Phytopathol., 12: 181-197, 1974.
5. COOK, R.J. Use of pathogen-suppressive soils for disease control. In: SCHNEIDER, R.W. (ed.). Suppressive soils and plant disease. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1984. p.51-65.
6. COOK, J.J. and BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983. 539p.
7. HORNBY, D. Take-all decline: a theorist's paradise. In: SCHIPPERS, B. and GAMS, W. (eds.). Soil-borne plant pathogens. London, Academic Press, 1979. cap. 11, p.133-56.
8. HORNBY, D. Suppressive soils. Ann. Rev. Phytopathol., 21: 65-85, 1983.
9. REIS, E.M. Doenças do trigo. III - Mal-do-pé. São Paulo, Ciba Geigy, 1989. 15p.
10. REIS, E.M.; SANTOS, H.P. and LHAMBY, J.C.B. Rotação de culturas I. Efeito sobre podridões radiculares do trigo em 1981 e 1982. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 8: 431-37, 1983.
11. REIS, E.M.; FERNANDES, J.M.C. and PICININI, E.C. Estratégias para o controle de doenças do trigo. Passo Fundo, EMBRAPA/CNPT, 1988. 50p. (EMBRAPA/CNPT. Documentos 7).
12. ROVIRA, A.D. Organisms and mechanisms involved in some soils suppressive to soilborne plant diseases. In: SCHNEIDER, R.W. (ed.) Suppressive soils and plant disease. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1984. p.23-33.
13. SANTOS, H.P. dos; REIS, E.M.; VIEIRA, S.A. and PEREIRA, L.R. Rotação de culturas e produtividade do trigo no RS. Passo Fundo, EMBRAPA/CNPT, 1987. 32p. (EMBRAPA/CNPT. Documentos, 8).
14. SHIPTON, P.J. Take-all decline during cereal monoculture. In: BRUEHL, G.W. (ed.). Biology and control of soil-borne plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1975. p.137-44.

15. WELLER, D.M. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonas suppressive to take-all. Phytopathology, 73: 1548-53, 1983.
16. WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol., 26: 379-407, 1988.
17. WELLER, D.M. and COOK, R.J. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonas. Phytopathology, 73: 463-69, 1983.

Tabela 1. Efeito de rotação de culturas na intensidade de doenças radiculares e no rendimento do trigo. CNPT-EMBRAPA, 1981.

Tratamentos			Grau de infecção ^x		Rendimento	
Anos de cultivo		Anos sem trigo	Não transformado (%)	Transformado arco seno (%)	kg/ha	%
1979	1980					
CTC	trigo	trigo	0	68	55,6a ^Y	2.236c 100
C/T	trevo	trigo	1	31	33,7b	2.686b 120
C/T	tremoço	trigo	1	30	32,9b	2.976a 133
C/T	pousio	trigo	1	28	31,9b	2.766ab 124
Aveia	linho	trigo	2	20	25,9b	2.430c 109
Tremoço	colza	trigo	2	22	27,6b	2.826ab 126
C.V. (%)			-	-	15,08	5,2 -

^x Determinado segundo a fórmula de McKinney modificado em que plantas sa dias: 0 = traço; 1: 25% do sistema radicular necrosado; = infecção leve; 25; % = moderada; > 50%: severa. Os valores englobam o mal-do-pé e a podridão comum de raízes.

^y As médias em colunas, seguidas pela mesma letra, não diferem entre si de acordo com o teste de Duncan a 5%.

C/T = cultivo de cevada ou trigo

Fonte: REIS et al. (10).

Tabela 2. Efeito de rotação de culturas na intensidade de doenças radiculares e no rendimento do trigo. CNPT-EMBRAPA, 1982.

Tratamentos				Grau de infecção ^x			Rendimento	
Anos de cultivo				Anos sem trigo	Não transformado (%)	Transformado arco seno (%)	kg/ha	%
1979	1980	1981	1982					
C/T	trigo	trigo	trigo	0	92	74,7a ^y	377c	100
C/T	trigo	trigo	trigo	1	67	54,9b	1.045b	277
Trigo	aveia	trigo	trigo	2	20	25,7c	2.184a	579
trigo	tremoço	colza	trigo	2	17	23,4cd	2.320a	615
C/T	trevo	trevo	trigo	2	12	20,2cd	2.044a	542
Trigo	pousio	tremoço	trigo	2	8	16,3d	2.117a	562

^x Determinado segundo a fórmula de McKinney em que plantas sadias = 0 - traço; 1; 25% do sistema radicular necrosado = infecção leve; 25-50% = moderada; > 50% = severa. Os valores englobam conjuntamente o mal-do-pé e a podridão comum de raízes.

^y As médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Duncan a 5%.

C/T = Cultivo de cevada ou trigo

Fonte: REIS et al. (10).

BIOCONTROLE DE *Catacauma torrendiella* E *Coccostroma palmicola*,
 AGENIES CAUSADORES DA LIXA PRETA NO COQUEIRO

Shinobu Sudo

Cia. de Cigarros Souza Cruz
 Depto de Pesquisas e Desenvolvi-
 mento.
 Av. Suburbana, 2066
 21050 - Rio de Janeiro-RJ.

Os plantios de coqueiro da Fazenda Mangereba, no Município de Lucena, Estado da Paraíba, pertence a Cia. Alimentícia Maguary S/A, foram iniciados em 1981, utilizando-se principalmente os híbridos PB (Port Bouet) 111 e PB 121, oriundos da Costa de Marfim, na África.

Em meados de 1984, quando os primeiros talhões plantados estavam com mais de três anos de idade, surgiu o primeiro problema fitossanitário sério com a incidência dos fungos *Catacauma torrendiella* Batista e *Coccostroma palmicola* (Speg.) Arx & Muller, respectivamente agentes da lixa pequena e da lixa grande das folhas de coqueiro.

A intensidade de ataque da doença foi muito forte fazendo com que a maioria das plantas perdessem de 8 a 10 folhas mais velhas.

Assim que surgiu a doença e no ano seguinte, vários fungicidas foram testados na tentativa de minimizar os danos da lixa sem que, no entanto, nenhum resultado prático e econômico fosse conseguido.

Em abril de 1985, durante uma inspeção de campo para avaliação do estado das plantas, verificamos algumas minúsculas manchas brancas incidindo sobre os estromas de *C. palmicola*, aparentando um hiperparasitismo causado por um outro fungo.

Através de exames e trabalhos laboratoriais, constatamos e isolamos um fungo de micélio branco o qual foi identificado pelo CAB International Mycological Institute como sendo *Acremonium alternatum* Link. Mais tarde, na rotina dos trabalhos de laboratório, deparamos com um outro fungo, morfológicamente semelhante ao primeiro, mas que produzia pigmentos vermelhos no meio de cultura. A identificação deste isolado foi confirmada como sendo *A. persicinum* (Nicot.) W. Gams.

Após a obtenção desses fungos "in vitro", vários testes de campo foram realizados e em todos eles obtivemos resultados altamente positivos pela colonização e destruição dos estromas, tanto da lixa pequena como lixa grande das folhas de coqueiro.

A partir dos resultados obtidos, temos feito, multiplicações anuais, tanto de *A. alternatum* como de *A. persicinum*, para serem pulverizados nos talhões de coqueiros, que estejam bastante afetados pela lixa, nos quais a reinfestação natural dos hiperparasitas esteja demorando. De uma maneira geral, a necessidade de reaplicação dos fungos tem sido pequena e os nossos esforços têm sido concentrados nas aplicações em áreas de plantas no início de frutificação, quando a lixa começar a ser efetivamente prejudicial e o *Actenonium* ainda não está presente.

Para satisfação nossa, podemos afirmar que a eficiência do *Actenonium* no controle biológico da lixa pequena e lixa grande da folha de coqueiro tem sido muito boa, permitindo colher-se normalmente frutos de alto valor comercial sem a necessidade de usar-se qualquer fungicida químico de alto custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manoel, 1986. 407p.
- BEZERRA, J.L.; OLIVEIRA, D.P. de & ATTIAS, M. Microscopia eletrônica de varredura de *Catacauma terrendiella* e *Coccestroma palmicola*, agentes de lixa de coqueiro. Fitopatologia Brasileira, 12: 155 (Resumo 216). 1987.
- FRANCO, E. A lixa preta das folhas de coqueiro. Boletim Fitossanitário, 6: 57-65, 1965.
- RESENDE, M.L.V. de & BEZERRA, J.L. Seleção de fungicidas para controle da lixa pequena do coqueiro. Fitopatologia Brasileira, 12: 127 (Resumo 046). 1987.

RESENDE, M.L.V. de & BEZERRA, J.L. Controle integrado da pixa pequena do coqueiro causada por *Cafacauma textricella*. Resultados preliminares. Fitopatologia Brasileira, 12: 127 (Resumo 047). 1987.

SOUZA FILHO, B.F.de; SANTOS, H.P.; ROBBS, C.F.; DOS SANTOS, Z.C. & OLIVEIRA, E.M. de. Epidemiologia e controle da "queima das folhas" do coqueiro. Comunicado Técnico da EMBRAPA, 1979.

INTEGRATED CONTROL OF THE MOST SEVERE DISEASES OF SOME PROTECTED VEGETABLE CROPS IN ITALY*

A. Garibaldi

Istituto di Patologia Vegetale
Università di Torino

Protected vegetable crops are of great important in Italy. It has been estimated (data refered to 1982) that they cover an area of about 30,000 ha, of which about 16,000 in greenhouse or large tunnels and 14,000 in medium and small tunnels.

It is well known that disease control of protected crops presents several differences in comparison to the methods adapted in open field. Several are the factors determining these differences:

- **some positive:** among these, the possibility of exerting some control over the environmental conditions (expecially on air and soil temperatures, relative humidity and soil water content) in order to obtain a reduced development of the diseases and the use of soilless systems or raised benches, which reduce the risk of contamination or recontamination by pathogens surviving in deep not desinfected soil;
- **some negative:** such as great density of plantation, close rotations, etc. mainly related to the need of obtaining very high yield to cover the cost of the expensive equipments utilized in protected crops.

For these reasons in protected crops until recently, chemical control was largely used; nevertheless, the hazards of chemical control, together with the high cost of developing, registering and manufacturing crop protective chemicals, will result in fewer chemicals being available for vegetable crops in the future. Consequently, control by resistance

* Palestra proferida na II Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas. Piracicaba, outubro, 1987.

will become even more important, as well the still little understood forms of cultural methods of controlling diseases (2).

The most convenient of controlling plant pathogens is through the use of resistant varieties; nevertheless many problems have been associated with the use of resistance, especially where specific monogenic resistances have been utilized in back-crossing programmes in an attempt to control air-borne pathogens. When this control system is absent or unsatisfactory, other methods are required: cultural methods are those most likely to be under the control of the grower and often these are practised in advance of a full scientific explanation for their effectiveness. Indeed the higher the standard of crop husbandry the lower is the probability that disease will be a problem in the crop. To rely only on cultural methods may however prevent the grower from maximising yield by for example, shortening the growing season or requiring very extended rotations (which in protected crops are often economically not feasible).

We are now considering some of the most severe pathogens attacking the most common vegetable crops under protection in Italy; for each disease a brief description of non chemical control methods will be given.

Lettuce

Downy mildew (*Bremia lactucae*), gray mould (*Botrytis cinerea*) and basal rot (*Sclerotinia* spp. and *Rhizoctonia solani*) are major problems for the growers producing lettuce crops under protection.

Downy mildew - Over the last 20 years *B. lactucae* has become the most damaging pathogen of protected lettuce crops in Italy. Reasons for the increased incidence are: 1. the use in all areas of production of varieties with similar genetic background; 2. the close rotation and the great density of plantation; 3. the lack of any really effective chemical (2) (*).

* The recently developed acylalanines which are highly active against this disease have not yet been approved for use on lettuce, in Italy.

The control of *B. lactucae* is largely based on the use of resistant varieties: unfortunately in Italy it seems that there are virulence factors compatible with the resistance used in most breeding programme, especially in Netherlands.

Control of this disease by environmental manipulation relies on the maintenance of low relative humidity in greenhouse; it is essential to remove moisture from the crop at the end of the day, by aeration or, where it is possible, by raising temperatures to decrease relative humidity. Since oospores have been shown to be an important mean of perennation of the pathogen it is advisable to remove all debris after the crop.

Fungicides such as chlortalonil, thiram, captan and folpet are used, especially during the seedling stage.

Gray mould - Control of *Botrytis cinerea* in lettuce as in other vegetable crops is largely based on the use of chemical and cultural methods. Chemicals are the most effective method of control: the main materials used over the last years have been benzimidazoles and dicarboximides. But recently, in Italy like in other countries, resistance to these fungicides appeared (4). For this reason to be successful a spray programme should be composed of a mixture of the before mentioned fungicides with other materials such as captan, captafol and thiram.

Maintenance of a relative dry atmosphere through skilful use of heating systems and ventilation prevents *B. cinerea* from becoming a problem. This is increasingly difficult to achieve because, as fuel costs rise, the grower is tempted to keep the ventilators closed and pipe temperature low to conserve fuel. This is giving rise to considerable problems with *B. cinerea*.

Control can be also achieved by avoiding damage or poor growth which leads to senescent tissues. At planting it is essential to prevent mechanical damage when handling the seedling or block-raised plants: this is best achieved by transplanting before the plants are too large. Similarly other cultural conditions such as waterlogging, drought, very low and very high humidity can all result in poor growth and be predisposing factors.

Sclerotinia and Rhizoctonia basal rot. - Control of *Sclerotinia* and *Rhizoctonia* basal root is extremely difficult because of their wide host range and persistent sclerotia. Dicarboximide fungicides proved a mean of limiting these pathogens, but resistant strains are likely to develop and, at the same time, the problem of residues must be kept in mind. Cultural controls such as removal of all diseased tissues, soil cultivation to kill sclerotia or flooding infected land are among the most effective techniques. Encouraging results have been obtained for the biological control of *S. sclerotiorum* using *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* spp., which parasitize the sclerotia. Also solar heating is reducing the incidence of basal rot in central Italy: recent trials demonstrated that solarization can reduce the attacks of *Sclerotinia* and *Rhizoctonia* by 70-80%.

Solanaceous crops (tomato, pepper and eggplant)

Among the pathogens of this group of plants, wilt-causing fungi (*Fusarium* and *Verticillium* spp.), *Pyrenochaeta lycopersici*, agent of corky root, *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) cause of leaf mould, and *Phytophthora infestans*, causing late blight, are those giving major problems to the growers producing tomato, pepper and eggplant under protection.

Verticillium and Fusarium wilt. - These two pathogens are very common in many greenhouse and tunnels in Italy. In tomato, sources of resistance have been found against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Verticillium dahliae* and varieties resistant to this last pathogen are largely grown in Italian protected areas.

Other techniques for control of *Verticillium* and *Fusarium* are as follows:

- soil disinfection by steam, methyl bromide or MIT releasing fumigants;
- use of systematic fungicides soil drenches to control *Verticillium* wilt (6).

Forms of biological control could be developed in the future, since the severity of wilt symptoms caused by *V. dahliae* is suppressed in

glasshouse-grown tomato plants, by prior inoculation with a range of **formae speciales** of *Fusarium oxysporum* (7). Also the use of suppressive soils or soil contamination with antagonistic organisms isolated from suppressive soil could be used in the future to control *Fusarium* wilt.

Greenhouse-grown eggplant can only be protected from the attacks of *V. dahliae* by soil desinfection or by grafting on resistant rootstocks.

Corky root. - This disease, caused by *Pyrenochaeta lycopersici*, is difficult to control because so far only limited sources of resistance to this pathogen have been identified and tomato cultivars adapted to cultivation under protection have not yet been developed.

In the past a careful technique for avoiding this disease was the use of resistant rootstocks for greenhouse tomato crops, using an interspecific F1 hybrid rootstock: *L. esculentum* x *L. hirsutum*. This technique is now considered to be too expensive and it is largely superseded by soil desinfection and by soilless growing methods, where there is less risk of infection from soil-borne pathogens.

Solar heating desinfection has been largely tested with good results in Italy against corky root and *Verticillium* wilt: its use in the practice is still very limited.

Leaf mould. - This disease, caused by *Cladosporium fulvum*, is the most severe foliar disease of protected tomato crops. Its control was based in the past on the use of resistant varieties: since the pathogen is capable of rapidly evolving new races in response to new resistance genes this method of disease control has proved less than satisfactory. Fortunately a range of fungicides are available to reinforce genetic control: benzimidazoles and phthalimidic compounds are active against *C. fulvum*.

Reducing relative humidity during the night is another interesting method to control this disease. As much ventilation as possible should be given, and the lower old leaves taken off the plants as soon as possible. To keep the humidity as low as possible, overhead watering and pesticide sprays must be applied early in the day. Greenhouse with drip or trickle system of irrigation often have lower humidity than those with overhead irrigation.

Late blight. - This disease is generally more severe in plastic houses than in glasshouses. Two races of *Phytophthora infestans* have been differentiated in tomato and resistant varieties have been developed for field crops. In the case of protected cultivations, control of *P. infestans* on tomato largely rests with the use of fungicides. Systemic materials (acylalanines, phosethyl-Al and cymoxanil) gave excellent control as 10-15 days intervals (10): the results are better than those obtained with protective copper compounds, active also against bacterial diseases. The same methods advised to reduce leaf mould are useful also against late blight.

Curcubit crops (zucchini squash, cucumber, melon and watermelon)

Among the pathogens of this group of plants, powdery mildews, scab and vascular wilts are those producing severe damages in italian protected crops.

Powdery mildews. - It is thought that the two most important agents of powdery mildew of curcubits are *Erysiphe cichoracearum* and *Sphaerotheca fuliginea*.

Control techniques are largely directed to the use of resistant varieties or chemicals. Considerable efforts have been put into breeding resistant melons and cucumbers. A range of eradicant fungicides is used to control powdery mildews. Sulphur and dinocap were the most widely used in the past: recently the development of morpholines and triazoles systemic fungicides has given a better degree of control for longer periods of time but has led, sometimes, to the selection of chemically resistant pathogen strains.

If biological control is being used against red spider mite and whiterfly (*Trialeurodes vaporariorum*) it is important to use fungicides which are known to have no effect on the predators population: for example bupirimate and dinocap.

A recent suggestion for cultural control, in the case of zucchini squash, is to utilize irrigation water to increase the relative humidity, thereby adversely affecting the growth of *S. fuliginea*. Such a technique could give rise to unwanted side effect, because the most envi-

ronment would be conducive to development of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) another pathogen of melon and cucumber.

The fungus *Ampelomyces quisqualis* which is known to be a parasite of *Sphaerotheca fuliginea* has been tried recently also in Italy; at the moment this biological control is not advisable for the growers.

Scab. - It is a quite frequent disease, caused by *Cladosporium cucumerinum*. Short period (3-4 hours) of relative humidity at 80-90% and temperature below 25°C (conditions these that likely can occur during the night under protection) can favour the infection.

The disease may be controlled by a accurate aeration which decrease the relative humidity and, if the greenhouse is heated, be keeping the temperature above 25°C. In order to prevent the infection, seed dressing with thiram or better with benzimidazole compounds, is suggested. Rotation, for at least two years, are also recommended.

For cucumber, resistant varieties are used.

When fungicide treatments are needed, chlortalonil, folpet or captan are used.

Vascular wilts. - *Fusarium* wilt of melon (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*) and of watermelon (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*) and *Verticillium* wilt of cucumber and melon, caused by *Verticillium dahliae*, are present and dangerous in Italy.

All affected soils should be thoroughly disinfected and great care taken in the preparation for the new crop, especially of the propagating compost and in the cleaning of pots and benches.

A successful but expensive way to control *Fusarium* wilt is to graft melon or cucumber on *Cucurbita ficifolia* or on *Benincasa cerifera* rootstocks. Melon varieties resistant to some of the races of *F. melonis* have been recently put on the market.

Potential lines for the biological control of these pathogens are beginning to emerge: for instance the use of non-compatible races to give cross-protection against compatible ones (8) or the use of suppressive

soils (9). In nurseries soil contamination with antagonistic microorganisms before sowing or transplanting could reduce plant infections in protected crops.

Other indications for the control of wilt diseases are mentioned for the similar diseases of solanaceous crops.

Strawberry

The diseases most commonly found on strawberry in Italy are: gray mould, powdery mildew and a soilborne root-rot complex.

Gray mould. - This disease, caused by *Botrytis cinerea*, is, usually, less important in protected than in field crops, because the dangerous wetting caused by rain and dew are avoided under protection; besides a careful aeration, normally used by the clever growers, reduces the relative humidity. At the production time, aeration must start early in the morning, before temperature rises, to dry the fruits from the night condensation in order to prevent the *B. cinerea* infections. Also mulching with plastic films, which isolated the fruits from direct contact with the ground, helps reducing the incidence of the disease.

By adopting the above mentioned criteria, the number of fungicidal sprays is greatly reduced, with evident economic and hygienic advantages. This last aspect is very interesting considering the relatively long pre-harvest intervals (14-21 days) of the most specific fungicides used against this disease. In Italy the compounds more commonly sprayed are the dicarboximides (iprodione, procymidone and vinclozolin) other than folpet, captan, dichlofluanid and chlortalonil.

Avoiding the cultivation of the most susceptible varieties (i. e. "Belburi") is highly advisable.

Trials of biological control with *Trichoderma viride* have been carried out (5), but with variable results.

Powdery mildew. - This disease, caused by *Sphaerotheca maculata*, which is of scanty interest in open-air cultivations, is of great im-

portance in protected crops. Aeration of the greenhouses, which is normally carried out to reduce the gray mould attacks, favours the spreading and development of this pathogen characterized by moderate hygrometric and thermal needs. Among the most important strawberry varieties cultivated in protected environment, 'Pocahontas' appear to be the most susceptible to powdery mildew, whilst 'Gorella' and 'Belrubi' are fairly resistant.

In the absence of alternative methods, the control of this disease is still mainly based on the use of specific fungicides. During the production period the most advisable products are the wettable sulphurs and pyrazophos, respectively with 5 and 7 days of pre-harvest interval. During the first phase of the crop also dinocap (20 days of pre-harvest interval) and, until the first blooming, fenarimol are recommended.

Soilborne diseases. - Among the soilborne diseases attacking strawberry, the most common in Italy is the black root-rot complex called "deperimento progressivo" affecting, chiefly, the highly yielding varieties, such as 'Gorella' and 'Pocahontas'.

The infected plants show a poor growth and reduced vigour and productivity. From the rotted roots several fungi, such as *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp. and *Cylindrocarpum* spp., can be isolated.

Control measures adopted by the growers are the followings: an adequate rotation, or soil disinfection, use of healthy propagative materials and employ of adequate cultural techniques to improve vigour of the plants. Biological control tests with several species of *Trichoderma* (*T. viride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*) against *Rhizoctonia fragariae*, *Fusarium solani* and *Cylindrocarpon destructans*, which are the most important agents of the "deperimento progressivo" of strawberry in Southern Italy have been carried out, with interesting results (1).

Solar heating seems a very interesting method to control this disease.

Conclusions

Control of diseases of vegetables grown under protection in Italy is still based mainly on the large use of fungicides and soil disin-

fection with fumigants or steam. At the moment the alternative methods are limited to the use of resistant varieties and to the manipulation of environmental conditions by adopting the most appropriate cultural techniques.

In the future it would be advisable to reduce the dependence of the growers on the chemical compounds with the aim of diminishing residues on crops and negative side effects of fungicides. This objective can be reached if the researchers will put major efforts to find adequate integrated control programmes.

Lines of research which could give interesting results in a short time are:

1. the utilization of solar heating;
2. the exploitation and the practical use of soils suppressive against the most damaging soil-borne pathogens;
3. the search of antagonistic microorganisms, active against pathogens, to be used for seed dressing and for colonization of disinfected soils;
4. the utilization of soilless systems well adapted to the mediterranean environmental conditions;
5. the larger employ of varieties resistant to the most common pathogens;
6. the implementation of hygienic measures by nurseries to produce healthy materials. As a matter of fact seeds and young plants of several greenhouse crops are a serious potential source of pathogens. To reduce this risk the inspection of propagators greenhouses should be intensified and, if necessary, backed up by a random test of the propagating materials.

References

1. CICCARESE, F., FRISULLO, S. and CIRULLI, M. (1985). Impiego di *Trichoderma* spp. nella lotta biologica di malattie radicali da funghi della fragola. La Difesa delle Piante, 147-156.

2. DIXON, G.R. (1981). Vegetable crop diseases. MacMillan Publishers Ltd., London.
3. GARIBALDI, A. and Tamietti, G. (1984). Attempts to use soil solarization in closed glasshouses in Northern Italy for controlling corky root of tomato. *Acta Horticulturae*. Vol. 152: 237-243.
4. GULLINO, M.L. and GARIBALDI, A. (1984). Fungicide resistance on tomatoes in Italian greenhouses. British Crop Protection Conference. 447-451.
5. JALONGO, M.T. and DEL SERRONE, P. (1985). Prove di antagonismo tra *Trichoderma viride* e *Botrytes cinerea* della fragola. *La Difesa delle Piante*, 157-162.
6. MATTA, A. and GARIBALDI, A. (1970). Attività di fungicidi sistemici contro la verticilliosi del pomodoro e della melanzana. *L'Agricoltura Italiana*. Vol. 70: 331-340.
7. MATTA, A. and GARIBALDI, A. (1977). Control of *Verticillium* wilt of tomato by preinoculation with avirulent fungi. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. Vol. 83: 457-462.
8. MAS, P.M. and MOLOT, P.M. (1974). Atténuation de la sensibilité du melon (*Cucumis melo*) su *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Annales de Phytopathologie*. Vol. 6: 237-244.
9. ROUXEL, F., ALABOUVETTE, C. and LOUVET, J. (1977). Recherches sur la résistance des sols aux maladies. II. Incidence de traitements thermiques sur la résistance microbiologique d'un sol à la fusariose vasculaire du melon. *Annales de Phytopathologie*. Vol. 9:183-192.
10. TAMIIETTI, G. and GARIBALDI, A. (1984). Ulteriori prove di lotte contro la peronospora del pomodoro in serra mediante formulati contenenti fungicidi sistemici. *Atti Giornate Fitopatologiche*. 417-425.
11. TRIOLO, E., VANNACCI, G. and SCARAMUZZI, G. (1985). Possibilità di applicazione della solarizzazione del terreno in Italia: indagini sul binomo lattuga - *Sclerotinia minor*. *La Difesa delle Piante*, 8: 127-140.

BACTÉRIAS PARA NUCLEAÇÃO DE GELO: SEU BIOCONTROLE E IMPLICAÇÕES NA AGRICULTURA BRASILEIRA

R.P. Leite Jr.

Engº Agrº, MSc., Pesquisador da
Área de Fitopatologia da Funda-
ção IAPAR. Caixa Postal 1331
86001 - Londrina-PR

A superfície aérea das plantas normalmente possui uma microflo-
ra epifítica característica, composta por uma grande diversidade de mi-
croorganismos (Last & Deighton, 1965; Leben, 1965; Ruinen, 1961). Diver-
sas espécies de bactérias, leveduras, fungos e algas têm sido encontradas
no filoplano de muitas plantas. As bactérias estão entre os microorganismos
mais frequentes nesta comunidade microbiana de filoplano (Last & Deigh-
ton, 1965). Esses microorganismos normalmente são os primeiros coloniza-
dores de tecidos jovens das plantas, quando condições ambientais favorá-
veis prevalecem para seu estabelecimento (Lehen, 1965; Ruinen, 1961). As
bactérias comumente encontradas na superfície aérea das plantas pertencem
às espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Aerobacter*, *Co-
rynebacterium*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Beijerinchia*, *Ba-
cillus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus* (Crosse, 1971; Ruinen, 1961). Diver-
sas espécies e patovares de bactérias patogênicas de plantas também pos-
suem uma fase epifítica na parte aérea de plantas hospedeiras e mesmo não
hospedeiras (Hirano & Upper, 1983; Leben, 1965).

Na comunidade bacteriana do filoplano existem algumas bacté-
rias que são agentes ativos na nucleação de gelo. Essas bactérias com-
preendem estirpes de *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye, *Pseudomonas fluores-
cens* Migula, *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson, *Erwinia ananas*
Serrano e patovares de *Pseudomonas syringae* van Hall e de *Xanthomonas cam-
pestris* (Pammel) Dowson (Hirano et al., 1978; Lindow, 1983; Warren, 1987).
Diversos patovares de *P. syringae* são as mais comuns e ativas bactérias
nucleadoras de gelo encontradas sobre plantas nos Estados Unidos (Lindow,
1983; Lindow et al., 1978). Nesta breve revisão é discutido alguns aspec-
tos dos danos de geada causado por bactérias nucleadoras de gelo e as pos-
sibilidades desses danos ocorrem na região Centro Sul do Brasil.

MECANISMOS DE SUBCONGELAMENTO DE ÁGUA E DANOS CAUSADOS POR GEADA EM PLANTAS

A água pode permanecer em estado líquido em temperaturas inferiores a 0°C . Mesmo em grandes quantidades, a água pode ser esfriada entre -10°C e -20°C sem ocorrer formação de gelo. Espontaneamente ou pela adição de um agente catalizador haverá a formação de gelo nessa água super-resfriada. Entre os agentes catalizadores de gelo não biológicos, ativos a temperatura próximo de 0°C , estão muitos materiais orgânicos e não orgânicos que são ativos a temperatura entre -10°C e -15°C . Materiais de plantas são normalmente ineficientes como nucleadores de gelo, e a atividade de nucleação de gelo em plantas produzidas em condições assépticas é muito rara para temperaturas acima de -5°C (Lindow, 1983; Warren, 1987). Por outro lado, muitas estirpes de *P. syringae*, *P. fluorescens* e *E. herbicola* são ativas em nucleação de gelo a temperaturas superiores a -2°C (Hirano et al., 1978; Lindow, 1983, 1985; Warren, 1987). Como muitas plantas são colonizadas epifiticamente por bactérias nucleadoras de gelo, esses microorganismos têm sido reconhecidos como responsáveis por danos de geada causado em plantas em temperaturas pouco abaixo de 0°C (Lindow, 1983, 1985; Warren, 1987). Essas bactérias nucleadoras de gelo iniciam a formação de gelo que causam danos em plantas sensíveis à geadas em temperaturas pouco abaixo de 0°C . O gelo formado sobre ou dentro de plantas sensíveis disseminam rapidamente intracelularmente e intercelularmente, causando a ruptura mecânica da membrana celular (Lindow 1983, 1987; Warren, 1987).

CONTROLE BIOLÓGICO DE BACTÉRIAS NUCLEADORAS DE GELO E DE DANOS POR GEADAS

Devido a importância que as bactérias nucleadoras de gelo representam nos danos causados por geadas em plantas, diversos estudos têm sido conduzidos para controle desses microorganismos e, desta forma, aumentar a capacidade natural de resistência das plantas à geadas. Entre as diversas medidas em estudo, o controle biológico empregando bactérias antagonísticas tem recebido grande atenção (Lindow, 1983, 1985, 1987; Lindow et al., 1983a,b). Somente em torno de 0,02% a 20% do total de bactérias encontradas na comunidade microbiana do filoplano são nucleadoras ativas de gelo e estão diretamente envolvidas em danos causados por geadas em plantas (Lindow, 1985). Na natureza, algum nível de interação entre organismos normalmente ocorre e a ausência de interação pode ocorrer

somente se as populações dos organismos estão muito distantes ou porque eles são muito diferentes em requerimentos de recursos nutricionais ou ambientais. Portanto, provavelmente deve ocorrer um elevado nível de competição entre os componentes da comunidade bacteriana do filoplano. De fato, o tamanho das populações de bactérias nucleadoras ativas de gelo em plantas tem sido correlacionada negativamente com o tamanho da população de bactérias epifíticas antagonísticas que colonizam essas plantas (Lindow, 1987; Lindow et al., 1983a,b).

A população de bactérias nucleadoras ativas de gelo tem sido reduzidas em 10 a 100 vezes em plantas tratadas com bactérias antagonísticas, quando comparado com plantas não tratadas (Lindow, 1983, 1985, 1987). Os danos causados por geada em plantas tratadas com bactérias antagonísticas não nucleadoras ativas de gelo tem sido reduzidos de 30% a 95%, em relação às plantas não tratadas (Lindow, 1985, 1987).

MECANISMOS DO CONTROLE BIOLÓGICO DE BACTÉRIAS NUCLEADORAS DE GELO

Os mecanismos envolvidos no controle biológico de danos causados por geada em plantas não estão bem esclarecidos. De modo geral, os mecanismos de interação entre microorganismos que levam ao controle biológico podem envolver as seguintes estratégias: competição por recursos físicos e/ou nutricionais, antibiose e parasitismo/predação. Lindow (1985, 1987) tem sugerido que a competição por locais para colonização ou por certos nutrientes provavelmente é o principal mecanismo responsável pelo controle biológico obtido com bactérias não nucleadoras ativas de gelo nos danos causados por geada em plantas.

A capacidade de suporte da superfície foliar de folhas para bactérias epifíticas está em torno de 10^7 células/g (peso fresco), o qual é inferior a outros habitats, como por exemplo, a superfície de raízes (Lindow, 1987). Além disso, a superfície foliar está sujeita a variações bruscas e extremas das suas condições microclimáticas. Além disso, a hipótese de exclusão competitiva pode ser reforçada pelas evidências de que o controle biológico no filoplano por bactérias não nucleadoras ativas de gelo requer o estabelecimento de populações grandes de bactérias antagonísticas antes do estabelecimento do organismo objeto (Lindow, 1985, 1987). O controle biológico de algumas doenças de plantas com bactérias antagonísticas foi possível somente quando o organismo antagonístico foi aplica

do antes do estabelecimento do patógeno (Leite & Rouse, 1986; Spurr, 1981).

IMPLICAÇÕES DE DANOS DE GEADAS CAUSADOS POR BACTÉRIA NUCLEADORAS DE GELO PARA A AGRICULTURA BRASILEIRA

Os danos de geadas causados por bactérias nucleadoras ativas de gelo tem reconhecidamente causado sérios prejuízos para a agricultura em diversas regiões em vários países, quando ocorrem condições ambientais favoráveis (Lindow, 1983; Warren, 1987). As condições climáticas prevalentes no Centro Sul do Brasil proporcionam normalmente a possibilidade de ocorrência de temperaturas inferiores a 0°C no outono, inverno e primavera em diversas localidades dessa região. Culturas perenes como café, citros, e diversas frutíferas de clima tropical, subtropical e temperado, e também diversas culturas anuais estão certamente sujeitas a danos causados por geadas na região Centro Sul do Brasil. Além disso, espécies de bactérias reportadas como nucleadoras ativas de gelo ocorrem em nossas condições. Entretanto, até o presente momento não foram realizados estudos de talhados sobre o possível envolvimento de bactérias nucleadoras ativas de gelo nos danos causados por geadas no Centro Sul do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CROSSE, J.E., 1971. Interaction between saprophytic and pathogenic bacteria in plant disease. In: PEERCE, T.F. & DICKSON, H. (ed.). Ecology of leaf surface micro-organisms. New York, Academic Press. p.283-290.
- HIRANO, S.S. & UPPER, C.D., 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., 21: 243-269.
- HIRANO, S.S.; MAHER, E.A.; KELMAN, A. & UPPER, C.D., 1978. Ice nucleation activity of fluorescent plant pathogenic pseudomonads. In: Int. Conf. Plant Path. Bact. Isnt. Natl. Rech., Angers. Proceedings. p. 717-724.
- LAST, F.T. & DEIGHTON, F.C., 1965. The non-parasitic microflora on the surfaces of living leaves. Trans. Brit. Mycol. Soc., 48: 83-99.

- LEBEN, C., 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. Ann. Rev. Phytopathol., 3: 209-230.
- LEITE, Jr., R.P. & ROUSE, D.I., 1986. The relationship between pathogenic and nonpathogenic strains of *Pseudomonas syringae* and bacterial brown spot disease in beans. Phytopathology, 76: 1069 (Abstr.).
- LINDOW, S.E., 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Ann. Rev. Phytopathol., 21: 363-384.
- LINDOW, S.E., 1985. Integrated control and role of antibiosis in biological control of fireblight and frost injury. In: WINDELS, C. & LINDOW, S.E. (ed.). Biological control on the phylloplane. Minneapolis, American Phytopathological Society Press. 169p.
- LINDOW, S.E., 1987. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by ice-*Pseudomonas syringae* mutants. Appl. Environ. Microbiol., 53: 2520-2527.
- LINDOW, S.E.; ARNY, D.C. & UPPER, C.D., 1978. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. Appl. Environ. Microbiol., 36: 831-838.
- LINDOW, S.E.; ARNY, D.C. & UPPER, C.D., 1983a. Biological control of frost injury. I. An isolate of *Erwinia herbicola* antagonistic to ice nucleation active bacteria. Phytopathology, 73: 1097-1102.
- LINDOW, S.E.; ARNY, D.C. & UPPER, C.D., 1983b. Biological control of frost injury. II. Establishment and effects of an antagonistic *Erwinia herbicola* isolate on corn in the field. Phytopathology, 73: 1102-1106.
- PUINEN, J., 1961. The phylloplane. I. An ecologically neglected milieu. Plant and Soil, 15: 81-109.
- SPURR, Jr., H.W., 1981. Experiments on foliar disease control using bacterial antagonists. In: BLACKEMAN, J.P. (ed.). Microbial ecology of the phylloplane. London, Academic Press. p.369-381.
- WARREN, G.J., 1987. Bacterial ice nucleation: molecular biology and applications. Biotec. Genetic Eng. Rev., 5: 107-135.

PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO SOLO NO BIOCONTROLE DE NEMATÓIDES DE GÊNERO *Meloidogyne*; INFLUÊNCIA DO TIPO DE SOLO E FONTES DE MATÉRIA ORGÂNICA

Dra. Regina Gomes Carneiro

UEL - Londrina-PR.

Dentre os inimigos naturais frequentemente assinalados, como agentes de controle biológico em relação a nematóides fitoparasitos, os fungos têm sido os mais estudados a nível de controle efetivo em agricultura.

Embora existam centenas de fungos nematófagos registrados (Dollfus, 1946), apenas alguns grupos têm sido objeto de estudos, nos últimos anos, sugerindo perspectivas encorajadoras de utilização em controle biológico.

Os fungos nematófagos podem ser agrupados em três categorias segundo as modalidades de parasitismo (Cayrol & Ritter, 1984):

- Os hifomicetos predadores, se caracterizam por apresentar estruturas de captura especializadas (armadilhas) que secretam substâncias colantes que prendem os nematóides quando estes entram em contacto com elas. Essas estruturas podem ser de vários tipos: rede ou anéis adesivos ou constritores (*Athrobolus*, *Dactylaria*, *Dactylella*, *Trichothecium*, *Trichothecium*, *Monacrosporium*, *Candelabrella*), botões adesivos (*Nematocotonus*), micélio adesivo (*Stylophaga*, *Cystophaga*).
- Os parasitos de formas ativas (gênero *Hirsutiella*) cujos esporos se fixam à cutícula do nematóide antes de germinar.
- Os parasitos de ovos, observados em cistos de *Heterodera* ou ootecas de *Meloidogyne*, que pertencem a gêneros diversos: *Phialophora*, *Metarrhizium*, *Verticillium*, *Nematophthora*, *Paecilomyces*.

Para que um fungo dentro de um determinado solo ou substrato agrícola possa ser eficaz contra uma determinada espécie de nematóide, é

necessário que ele encontre nesse meio, condições adequadas às suas necessidades ecológicas e tróficas (pH, relação C/N; umidade, temperatura, etc.) que permitam um bom desenvolvimento da sua fase saprofítica neste solo. Estudos desse gênero permitiram a seleção de uma linhagem de *Arthrobotrys robusta* capaz de controlar a proliferação do nematóide *Ditylenchus myceliophagus*, problema bastante sério para o cultivo do "Champignon de Paris", no composto orgânico utilizado como substrato para esse fim (Cayrol et al., 1972). Uma outra linhagem de *Arthrobotrys irregularis*, mostrou-se eficaz em solos olerícolas no controle de larvas pré-parasitas de *Meloidogyne* spp. (Cayrol & Frankowski, 1979). Estas duas linhagens são encontradas atualmente no comércio sob a respectiva designação de Royal 300 et Royal 350).

A utilização prática desses dois hifomicetos é dificultada pelas condições atuais de formulação (suporte nutritivo à base de cereais cozidos), que exige um armazenamento e transporte do produto em condições refrigeradas e o emprego de uma quantidade bastante grande do produto, 1.400 kg/ha (14×10^7 germes/m²) o que dificulta a sua comercialização (Cayrol & Ritter, 1984).

Inúmeras tentativas de utilização de fungos predadores, no controle biológico não tiveram muito sucesso, devido sobretudo ao fato de se negligenciou a especificidade do fungo em relação ao nematóide.

Nordbring-Hertz (1973) mostrou que esta especificidade é de natureza bioquímica. Ao nível dos órgãos de captura o fungo secreta lecitinas que se associam a açúcares situados na cutícula dos nematóides. Se houver correlação entre a lecitina e o açúcar do nematóide, estabelece-se uma ligação covalente praticamente indestrutível entre os dois organismos.

É necessário, portanto, escolher a linhagem de fungos adaptada à espécie de nematóide que se pretende controlar.

Vários autores indicam que o aparecimento de estruturas de captura em hifomicetos predadores era estimulado pela presença de nematóides. Em 1959, Pramer & Stoll demonstraram que uma substância chamada "nemin" induzia a formação de armadilhas. Mais tarde, Feder et al. (1963) indicaram que um só nematóide se locomovendo em uma cultura de hifomicetos predadores era capaz de induzir a formação de estruturas de captura. Eles

deduziram que a substância indutiva deveria ser um produto do metabolismo dos nematóides capaz de agir em doses mínimas. Para o conjunto desses trabalhos, os pesquisadores utilizaram sempre nematóides bacteriófagos, pertencentes à Ordem Rhabditida, que são fáceis de serem criados em meios de cultura.

Recentemente Cayrol e colaboradores (1984) mostraram que essa indução resulta de uma relação complexa entre os fungos e as bactérias associadas aos nematóides bacteriófagos. Não foi possível até o momento esclarecer as reações bioquímicas que determinam esse mecanismo, mas pode-se suspeitar que no solo existem inteirações muito complexas que possibilitam uma maior ou menor eficiência do produto biológico aí introduzido.

Outros estudos realizados por Cayrol (1984), mostraram que a introdução de adubos orgânicos pode modificar de maneira determinante a atividade predadora dos fungos nematófagos, uma vez que alteram a microflora existente naquele solo.

Com o conhecimento que dispomos até o momento, é praticamente impossível precisar a natureza dos mecanismos que estão interagindo e caracterizar com exatidão os fatores determinantes em uma certa situação.

Os fungos parasitas de formas ativas são sobretudo os do gênero *Hirsutella*, cuja espécie, *H. thompsonii* vem sendo utilizada nos EUA, como método de controle do ácaro do citrus *Phyllocoptruta oleivora*. Muitas outras espécies de *Hirsutella* foram observadas recentemente em larvas de *Heterodera* e de *Meloidogyne*. O estudo de alguns sistemas enzimáticos de diferentes isolados de *Hirsutella* conservados em coleção e estudados através de métodos eletroforéticos ou de isoeletrofocalização confirmaram a existência de várias espécies parasitas de nematóides, que parecem constituir um grupo bastante distinto dos parasitos de insetos e ácaros (Castet, 1983). Por outro lado, *Hirsutella rhossilienses* isolado a partir de *Criconemella xenoplax* mostrou-se ser ativa sobre larvas de *Meloidogyne incognita*, bastando um só esporo para causar sua morte e proporcionalmente um efeito mais rápido quando o número de esporos fixados (variação de 0 a 20) aumentaram. Os esporos desse fungo ficam fortemente aderidos e penetram através de um tubo germinativo que coloniza o corpo do nematóide, sendo este destruído em doze horas. Trabalhos de laborató-

rio e campo vêm sendo conduzidos no sentido de precisar possibilidades de emprego desses fungos.

Os fungos parasitas de ovos podem desempenhar um papel importante na dinâmica de populações de espécies de nematóides que colocam ovos reunidos em massas e que permanecem por um período de tempo não negligível em contato com a terra. Este é o caso do *Verticillium chlamidosporium* e do *Nematophora gynecphila* para diversos *Heterodera* na Grã-Bretanha (Kerry & Grump, 1980). Estudos realizados por Kerry e colaboradores (1981), mostraram que a eficiência do fungo *V. chlamidosporium* está ligada à sua instalação em biótipos que apresentam características bem precisas.

Um outro fungo *Paezilomyces lilacinus* foi observado por Jatala et al. (1979) em ovos de *Meloidogyne incognita* presentes em raízes de batata. Um primeiro ensaio de inoculação realizado por esses autores mostrou que o fungo parasitava as fêmeas e os ovos de *Meloidogyne incognita*, assim como os cistos de *Globodera pallida* (Stone) Behrens e destruiu 80 a 90% dos ovos da primeira geração, após 10 ou 12 dias de incubação.

Ensaio conduzidos em campo em 1980, 1981, 1983, 1984 e 1985 corroboraram sua eficiência como agente de controle biológico, em campos infestados por *M. incognita* na Malásia, Panamá, Peru, Filipinas, Porto Rico, USA, etc., o que justifica a extensão de seu emprego como nematocida. Este produto está sendo produzido comercialmente com o nome de "Biocon" tendo como substrato grão de arroz (Jatala, 1985).

Por ocasião do desenvolvimento de minha tese de Doutorado (Carneiro, 1986), realizada no "INRA-Station de Recherches sur les Nématodes" (Antibes - França) tivemos a ocasião de trabalhar com duas formulações do fungo *P. lilacinus* (peso seco e pellet). Estas duas formulações mostraram-se bem mais adequadas pois possibilitam armazenagem em condições de temperatura ambiente e transporte de pequenas quantidades para tratamento de grandes áreas.

Neste trabalho tivemos a possibilidade de determinar o intervalo de eficiência (10^3 a 10^6 esporos/m²) do fungo e a dose a ser recomendada, 5 gramas do produto comercial/m². Estabelecemos uma correlação direta entre a porcentagem de parasitismo dos ovos e quantidade de inóculo presente no solo, o que nos mostrou que a instalação do fungo em um determinado tipo de solo implica no êxito do controle realizado.

Acompanhando durante um ano as curvas de desenvolvimento de diferentes doses do fungo no solo, em ensaios de casa de vegetação e campo, pudemos observar o decréscimo progressivo da densidade de inóculo, à medida que o tempo foi passando.

O mesmo tipo de estudo, realizado em diferentes tipos de solo, mostrou que a instalação e eficiência de controle está relacionada com as características físicas, químicas e microbiológicas do solo, o que definimos como "grau de receptividade à colonização pelo fungo". Desta maneira, observamos que existiam solos onde o controle foi efetivo e duradouro, e outros onde aplicações periódicas do fungo seriam necessárias.

Observamos ainda em ensaios com diferentes compostos orgânicos que a receptividade de um solo poderia ser melhorada, possibilitando assim um controle biológico bastante eficiente e duradouro.

Não fizemos alusão neste breve resumo aos estudos que realizamos "in vitro" onde investigamos em detalhe os fatores físicos, químicos e nutricionais que interferem no desenvolvimento do fungo, assim como, os estudos de toxinas e produção de substâncias fungistáticas e de antibióticos que conferem a este microorganismo a característica de um excelente antagonista.

É importante ressaltar que os fungos mencionados nesta revisão ocorrem naturalmente em nossos solos. Já tivemos a possibilidade de isolar em 1987 nas proximidades de Londrina-PR, linhagens de *P. lilacinus*, *V. chlamidosporium* e *Nematophthora* sp. a partir de ootecas de *M. incognita*, que serão estudados em um projeto a ser desenvolvido na Universidade Estadual de Londrina.

Sabendo que os nematóides do gênero *Meloidogyne*, constituem sério problema em nossa região em solos degradados, com baixíssimo teor de Matéria Orgânica, seria ilusório considerar o controle biológico com uma medida exclusiva que viria a solucionar este problema.

Dessa maneira, estimando o teor das pesquisas realizadas até o momento, podemos considerar a luta biológica através de fungos nematófagos como uma maneira não negligível de controlar, mas que deve ser encarada dentro de um contexto de medidas integradas que visem o reestabelecimento dos equilíbrios naturais do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTET, R., 1983. Etude de la variabilité inter et intraspécifique de quelques caractères dans le genre *Hirsutiella* (Hyphomycètes). D.E.A. U.S.T.L. 45p.
- CAYROL, J.C. & FRANKOWSKI, J.P., 1979. Une méthode de lutte biologique contre les nématodes à galles des racines appartenant au genre *Meloidogyne*. P.H.M. Revue Horticole, 193: 15-23.
- CAYROL, J.C.; ROUDEILLAC, P.H. & B'CHIR, M.M., 1972. Etude préliminaires sur les possibilités d'utilisation des champignons nématophages comme moyen de lutte biologique en champignonnière. Rev. Zool. Agric. Path. Veg., 4: 119-138.
- CAYROL, J.C. & RITTER, M., 1984. Données récentes sur l'utilisation de champignons du sol comme antagonistes de nématodes. Bul. Soc. Franc. Parasitol., 2: 53-56.
- CAYROL, J.C.; COMBETTES, S. & QUILES, C., 1984. Influence de l'association nématodes-bactéries sur la formation des pièges chez l'hiphomycète predacteur *Arthrobotrys oxiformis*. Cryptog. Mycol., 5: 21-32.
- CARNEIRO, R.M.D.G., 1986. Etude des possibilités d'utilisation du champignon nématophage *Paecilomyces lilacinus* comme agent de lutte biologique contre *Meloidogyne arenaria*. Thèse Docteur USTL. 119p.
- DOLLFUS, R. PH., 1946. Parasites (animaux et végétaux) des helminthes. Encyclopédie Biologique, 27: 48lp.
- JATALA, P.; KALTENBACH, R.; BOCANGEL, M.; DEVAUX, A.J. & CAMPOS, R., 1980. Field application of *Paecilomyces lilacinus* from controlling *Meloidogyne incognita* on potatoes. J. Nematol., 4: 226-227.
- JATALA, P., 1985. Biological control of nematodes. In: SASSER, J.N. & CARTER, C.C. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Dept. Plant. Pathol. & U.S. Agency Int. Dev., 1 Biology and Control. p.303-308.

- KERRY, B.R. & CRUMP, D.H., 1980. Two fungi parasitic on females of cyst-nematodes (*Heterodera* spp.). Transactions of the British Mycological Society, 74: 119-125.
- KERRY, B.R., 1981. Progress in the use of biological agents for control nematodes. In: Biological Control in Crop Production, 5: 79-90.
- LYSEK, H., 1968. Biological liquidation of Ascarid eggs in spring pasture soil. Acta Parasitologica Polonica, 15: 263-267.
- NORDBRING-HERTZ, B., 1973. Peptide-induced morphogenesis in the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Physiol. Plant, 29: 223-253.
- PRAMER, D. & STOLL, N.R., 1959. Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. Science, New York, 129: 966-967.

RESUMO DE TRABALHOS

SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS ANTAGÔNICOS A FITOPATÓGENOS. BETTIOL, W. (CNPDA/ EMBRAPA, Caixa Postal 69. 13820-Jaguariúna-SP).

O isolamento e a seleção de microrganismos antagonísticos sustentam virtualmente todos os programas de controle biológico, determinando as chances de sucesso. Muitos microrganismos valiosos para a fitopatologia e medicina animal e humana foram descobertos acidentalmente. No entanto, pode ser usada uma sistemática pesquisa de seleção.

Inicialmente, há necessidade de escolher locais apropriados para isolamento de antagonistas, reduzindo as tentativas inúteis. Para cada patossistema existem locais mais apropriados para a obtenção de antagonistas, podendo ser o próprio hospedeiro ou o substrato, onde este se desenvolve, ou as estruturas do patógeno.

A seleção pode ser realizada utilizando testes "in vitro" e "in vivo". Entretanto, o mais importante e indispensável é aquele que expõe o antagonista às condições ambientais prevalentes nos locais em que será empregado. Usualmente, não há correlação significativa entre antagonismo demonstrável em cultura e efetividade nas condições em que será utilizado. Assim, muitos antagonistas eficientes "in vitro" e "in vivo", sob condições controladas, não passam por este teste final. Esta disparidade pode representar as diferenças de sobrevivência nos dois ambientes.

Em teoria, sugere-se como sequência adequada para seleção de antagonistas, inicialmente, a realização de testes "in vitro" e posteriormente "in vivo" (testes de placas de Petri ou lâminas para "in vivo" controlado, e deste para "in vivo" com condições não controladas).

Uma característica recomendável, mas não indispensável, é que o antagonista atue através de mais de um mecanismo de antagonismo. No entanto, pode ser que o caminho seja a utilização de agentes portadores de diferentes mecanismos de antagonismo.

Antes da liberação de um antagonista para uso em larga escala, há necessidade da realização de estudos toxicológicos. Este estudo deverá ser contemplado num amplo programa de seleção.

EFEITO DE *Bacillus subtilis* NO CONTROLE DO MOFO CINZENTO (*Botrytis cinerea*) DO MORANGO. BETTIOL, W.; GHINI, R.; MOSCA, J.L. & VITTI, A.J. (EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, C. Postal 69, 13820-Jaguariúna-SP).

EFFECT OF *Bacillus subtilis* on *Botrytis cinerea*, CAUSAL AGENT OF STRAWBERRY GRAY MOLD.

O tratamento de frutos de morango var. Campinas com suspensão de células de *B. subtilis*: isolado AP-85 (diluição 1:20, T (transmitância) = 61,1%) e mistura contendo os isolados AP-3, AP-51, AP-85, AP-105, AP-323, AP-332, AP-365 e AP-471 (diluição 1:20, T = 56,4%), 24 horas antes da inoculação de 10 µl de suspensão de 1×10^5 conídios/ml de *B. cinerea*, em um ferimento de 3 mm de profundidade feito com agulha histológica, apresentou controle da doença similar a iprodione (150 g/100 l) quando da avaliação 5 dias após a inoculação do patógeno.

EFEITO DE PROTEÇÃO À FERRUGEM DO CAFEIEIRO DETERMINADO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus*. ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.A.R.; SEIXAS, C.A.; MORAES, W.B.C. (Seção de Bioquímica Fitopatológica - Instituto Biológico. C. P. 7119. São Paulo-SP).

Foi verificado que produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* podem proteger plantas de café contra o fungo *Hemileia vastatrix*. O objetivo do presente trabalho foi o de verificar o efeito de proteção local e sistêmico à ferrugem determinado por 5 diferentes bacilos: *B. thuringiensis* isolado 998, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* e *B. subtilis* isolado B50. Para tanto, plantas de café de um ano de idade tiveram as folhas do 3º par aspergidas com uma suspensão de células das bactérias 72 horas antes das folhas do 2º, 3º e 4º pares serem inoculadas com o patógeno. O efeito do tratamento com as bactérias sobre a germinação "in vitro", "in vivo", formação de apressórios e persistência dos uredíniosporos do patógeno na superfície das folhas de café, foi observado por microscopia óptica ou de fluorescência. Os resultados mostraram que todas as bactérias testadas de terminaram uma proteção local à ferrugem que varia entre 70 a 98%. Porém, com exceção do *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, um efeito bastante significativo de proteção sistêmica também foi observado tanto acima como abaixo do par de folhas tratado. Além disso, as bactérias atuam inibindo a germinação dos uredíniosporos de *H. vastatrix* tanto "in vitro" como "in vivo", bem como interferem com a permanência dos uredíniosporos na superfície das folhas. Com exceção do *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, nenhum dos outros bacilos usados mostrou efeito na formação de apressórios. Sendo assim, pode-se concluir que os bacilos testados exercem um efeito local de proteção atuando diretamente sobre o patógeno, embora um efeito sobre a planta hospedeira também tenha sido observado uma vez que a proteção se manifesta sistemicamente.

PROTECTIVE EFFECT OF DIFFERENT *Bacillus* AGAINST COFFEE LEAF RUST. ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.A.R.; SEIXAS, C.A.; MORAES, W.B.C. (Seção de Bioquímica Fitopatológica - Instituto Biológico, C.P. 7119. São Paulo-SP-Brazil).

Commercial products containing *Bacillus thuringiensis* protected coffee plants against the fungus *Hemileia vastatrix*. The present work deals with local and systemic protection induced in coffee plants by 5 different bacteria: *B. thuringiensis* strain 998, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* and *B. subtilis* strain B50.

For this third pairs of leaves of coffee plants were sprayed with a bacterial cell suspension 72 hr before the 2nd, 3rd and 4th pairs of leaves had been inoculated with the pathogen. The effect of the treatment on the "in vivo" and "in vitro" germination and appressoria formation of the uredíniospores of the pathogen, as well as their persistence on the leaf surface was observed by optical and epifluorescence microscopy. Results showed that all tested bacteria induced a local protection between 70% and 98% in coffee plants.

Except for *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, a significant systemic protection was observed in both leaf pairs above and below the treated ones. Besides of this, the 5 bacteria inhibited both "in vivo" and "in vi

tro" the germination of urediniospores of *H. vastatrix*, as well as they interfered with their persistence on the leaf surface. Except for *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, all the other bacteria had no effect on the appressoria formation. Thus, data suggest that all the 5 bacteria were effective in locally protecting coffee plants, through a direct action on the pathogen, although a systemic protective effect had been also observed in host plants, except for *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

SENSIBILIDADE DE *Agrobacterium tumefaciens* A ALGUNS ANTAGONISTAS. BERIAM, L.O.S.¹; ALMEIDA, I.M.G.¹; MALAVOLTA Jr., V.A.¹; ROBBS, C.F.²; RODRIGUES NETO, J.¹ (¹SBF/IB - C.P. 70, 13001-Campinas-SP; ²CNPDA/EMBRAPA, C.P. 69, 13820 - Jaguariúna-SP).

Dez isolados de *Agrobacterium tumefaciens*, originários de alface (1), ingã (2), framboesa (1) e crisântemo (6) foram testados "in vitro" para averiguar a sensibilidade à estirpe K.84 de *Agrobacterium radiobacter* e a duas *Pseudomonas* spp. (Ps. 1, fluorescente e Ps. 2, não fluorescente). De acordo com a metodologia empregada, os resultados indicaram que quatro isolados foram sensíveis ao K.84; um isolado foi sensível a Ps. 2; seis isolados foram sensíveis a Ps. 1; um isolado foi sensível aos três antagonistas testados e um isolado foi sensível a nenhum dos três antagonistas testados.

SENSITIVITY OF *Agrobacterium tumefaciens* STRAINS TO SOME ANTAGONISTS. BERIAM, L.O.S.¹; ALMEIDA, I.M.G.¹; MALAVOLTA Jr., V.A.¹; ROBBS, C.F.²; RODRIGUES NETO, J.¹ (¹SBF/IB - C.P. 70, 13001-Campinas-SP; ²CNPDA/EMBRAPA, C.P. 69, 13820-Jaguariúna-SP).

Isolates of *Agrobacterium tumefaciens* from lettuce (1), Inga sp. (1), raspberry (1) and chrysanthemum (6) were tested "in vitro" in order to determine the sensitivity to strain K.84 of *Agrobacterium radiobacter* and to *Pseudomonas* species (Ps.1, fluorescent and Ps.2, non-fluorescent). The results obtained with the methodology employed were: four isolates were inhibited by K.84; one isolate was sensitive to Ps.2; six isolates were sensitive to Ps.1; only one isolate was sensitive to the three antagonists, whereas one isolate was not affected by some of the antagonists.

SELEÇÃO DE *Streptomyces* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae*. ALMEIDA, O.C.¹; FIGUEREDO, J.M.¹; ALMEIDA, L.C.C.¹; SILVA, E.C.² (¹ CEPLAC/ Fitopatologia, C.P. 7, 45600-Itabuna-BA, ² Departamento de Antibiótico, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária Recife-PE).

Streptomyces codificados sob números 12530, 12431, 12539 e 12472 foram inoculados em dois pontos equidistantes a 1,5 cm dos bordos das placas de Petri contendo meio de extrato de malte, e no centro das mesmas, inoculou-se discos com 7 mm de diâmetro contendo micélio de *Verticillium dahliae* isolado de cacauzeiro. Estas placas foram incubadas a 22°C e mantidas em escuridão total. Após 15 dias mediu-se o crescimento radial das colônias de *V. dahliae*, havendo uma inibição de 39,58% por efeito dos isolados 12539 e 12472 quando comparados com a testemunha.

SCREENING OF *Streptomyces* spp. FOR BIOLOGICAL CONTROL OF *Verticillium dahliae*. ALMEIDA, O.C.¹; FIGUEREDO, J.M.¹; ALMEIDA, L.C.C.¹; SILVA, E.C.² (¹CEPLAC/ Fitopatologia, C.P. 7, 45600-Itabuna-BA; ² Departamento de Antibiótico, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária Recife-PE).

Streptomyces spp. coded under numbers 12530, 12431, 12539 and 12472 were inoculated on Petri plates containing malt extract at two points 1.5 cm away from the borders and, on the center of the plates, disks 7mm broad, containing mycelium of *Verticillium dahliae* isolated from cacao were inoculated.

These plates were incubated at 22°C and total darkness. After 15 days the radial growth of *V. dahliae* colonies were measured. An inhibition of *V. dahliae* growth in the order of 39.58% detected due to the action of isolates 12539 and 12472 when compared to the control.

EFEITO DE *Saccharomyces cerevisiae* NA REDUÇÃO DA ANTRACNOSE EM PLANTAS DE MILHO MANTIDAS EM CASA-DE-VEGETAÇÃO. SILVA, S.R.¹; PASCHOLATI, S.F.^{2,3}; MORAES, W.B.C.³ (Seção de Bioquímica Fitopatológica, Instituto Biológico, C.P. 7119. 01053-São Paulo-SP).

O trabalho visa o possível uso da levedura *S. cerevisiae* no controle alternativo da antracnose. Suspensões (SU) ou filtrados de células (FC) de levedura (0,005 a 25 mg/ml), preparadas a partir do "Fermento Biológico Fleischmann", foram aspergidas sobre folhas de plantas jovens de milho. Simultaneamente ou em diferentes intervalos de tempo após a aspersão, as mesmas folhas foram inoculadas com *Colletotrichum graminicola* (500.000 conídios/ml). As avaliações efetuadas após as inoculações, evidenciaram o efeito inibidor de SU e FC, dependendo da concentração, na germinação e na formação de apressórios pelos conídios de *C. graminicola*, bem como na redução da área foliar lesionada, do número de lesões e da esporulação do fungo. Essa inibição não ocorreu quando SU e FC foram inativados termicamente ou quando *C. graminicola* foi inoculado 48 horas após o tratamento com SU. Suspensões e filtrados de células leveduriformes isoladas do fermento e cultivadas em BDA também induziram efeitos similares aos de SU e FC obtidos diretamente do fermento, quando aplicados antes da inoculação com o patógeno. Da mesma forma, os efeitos inibitórios não ocorreram quando o material foi inativado termicamente. Por outro lado, não houve efeito inibitório de SU e FC, independentemente da origem, quando esses materiais foram aspergidos à distância do ponto de inoculação do fungo. Experimentos "in vitro" demonstraram a capacidade de SU e FC, não inativados termicamente, em reduzir a germinação dos conídios de *C. graminicola*. Os resultados do trabalho evidenciam o efeito direto da levedura sobre *C. graminicola*, possivelmente através da produção de algum(ns) metabolito(s), não descartando porém a possibilidade da ativação de mecanismo(s) de resistência nas plantas de milho devido a aplicação de *S. cerevisiae*.

EFFECT OF *Saccharomyces cerevisiae* ON CORN ANTHRACNOSE UNDER GREENHOUSE CONDITIONS. SILVA, S.R.¹; PASCHOLATI, S.F.^{2,3}; MORAES, W.B.C.³ (Seção de Bioquímica Fitopatológica, Instituto Biológico, C.P. 7119. 01053 - São Paulo-SP).

The research work has a objective the possible use of *S. cerevisiae* in the alternative control of anthracnose. Suspensions (SU) ou filtrates of yeast cells (FC) (0.005 to 25 mg/ml), obtained from "Fermento Biológico Fleischmann", were sprayed onto young leaves of corn plants. Simultaneously or at different time intervals after spraying, the same leaves were inoculated with *Colletotrichum graminicola* (500.000 conidia/ml). Evaluations carried out after the inoculations, showed that SU and FC exhibited an inhibitory effect, depending upon concentration, on germination and appressorium formation by *C. graminicola* conidia as well as on the reduction of the lesioned leaf area, number of lesions and fungal sporulation. The inhibition did not occur when SU and FC were termically inactivated or when *C. graminicola* was inoculated 48 h after the treatment with SU. Suspensions and filtrates of yeast cells isolated from "Fermento Bio-

¹ Bolsista FAPESP

² Endereço atual: Depto Fitopatologia - ESALQ/USP, Piracicaba-SP

³ Bolsista CNPq

logico" and grown on PDA also exhibited similar effects to SU and FC obtained directly from "Fermento Biológico", when applied before the inoculation with the pathogen. In the same way, the inhibitory effects did not occur when the material was thermically treated. On the other hand, the inhibitory effect of SU and FC was not observed, independently of the source, when these materials were sprayed at a distance from the site of pathogen inoculation. "In vitro" experiments showed the capacity of SU and FC, not thermically treated, in reducing the germination of *C. graminicola* conidia. Finally, the results of the present work show that *S. cerevisiae* can interfere directly on *C. graminicola* growth, probably by the production of some metabolite(s), but the activation of resistance mechanisms in the corn plants by the yeast treatment can not be ruled out.

ISOLAMENTO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *Talaromyces flavus*: UM AGENTE DE BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS. SANTOS, T.M.C. & MELO, I.S. (Departamento de Genética - ESALQ/USP, C.P. 83, 13400-Piracicaba-SP. CNPDA/EMBRAPA - C. Postal 69, 13820-Jaguariúna-SP).

Com o objetivo de otimizar o isolamento e a regeneração de protoplastos de *T. flavus*, foram feitos ensaios para determinar qual o melhor meio para produção de micélio, a melhor enzima lítica e o estabilizador osmótico mais eficiente.

Os meios de cultura testados foram BD (extrato de batata e dextrose), GVEC (glucose, extrato de levedura e caseína) meio completo, meio de extrato de malte e meio de extrato de levedura, peptona e dextrose. Foram testados estabilizadores: glucose 0,5M; KCl 0,6M; $(NH_4)_2SO_4$, 0,6M e NaCl 0,6M; e as enzimas celulase biobrãs 2%, celulase onuzaku 2%, novozim 2% e as combinações, novozim 1% + onuzaku 1% + celulase onuzaku 1% + drisilase 1% + novozim 1%.

Dos meios de culturas testados o meio de malte foi o mais eficiente para produção de micélio em um menor período de tempo. Um maior número de protoplastos foi obtido com a combinação celulae onuzaku 1% + drisilase 1% + novozim 1%. A frequência de protoplastos regenerados foi maior na presença de KCl.

RESISTÊNCIA A BENOMYL E OXICLORETO DE COBRE DE *Verticillium lecanii*, AGENTE DE BIOCONTROLE DE *Hemileia vastatrix*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DO CAFÉ. CONUS, G.A.*; MELO, I.S. (Departamento de Genética - ESALQ/USP, C.P.83, 13400 - Piracicaba-SP, CNPDA/EMBRAPA, C.P. 69. 13280-Jaguariúna-SP).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de quatro isolados de *V. lecanii* aos fungicidas Benomyl nas doses de 0,0; 0,1; 1,0; 10,0 e 100 ppm e oxicloreto de cobre nas doses de 0,0; 1,0; 10,0; 100,0 e 500,0 ppm. A avaliação da resistência foi feita medindo-se o crescimento radial das colônias. Os isolados mostraram-se sensíveis às doses maiores que 1,0 ppm em benomyl.

Posteriormente, um dos isolados (C-293) foi irradiado com luz ultra violeta na dose capaz de causar 2% de sobrevivência e semeado em meio BDA contendo 10 ppm de Benomyl. Dezesesseis colônias, supostamente resistentes, foram isoladas.

* Bolsista da FAPESP.

OBTENÇÃO DE BIÓTIPOS DE *Verticillium lecanii* RESISTENTES À LUZ ULTRAVIOLETA E AVALIAÇÃO DE SUA CAPACIDADE DE CONTROLE DE *Hemileia vastatrix*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DO CAFEEIRO. CONUS, G.A.* & MELO, I.S. (Deptº de Genética - ESALQ/USP, C.P. 83. 13400-Piracicaba-SP; CNPDA/EMBRAPA, C.P. 69. 13820 - Jaguariúna-SP).

A resistência à luz ultravioleta em fungos foliares é um fator consideravelmente importante para a sua eficiência no controle biológico.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a resistência à luz ultravioleta de três biótipos, obtidos através de irradiações, juntamente com a sua linhagem selvagem, como também a sua capacidade de inibir a germinação de uredosporos de *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do caféiro.

Uma suspensão de 10^7 conídios/ml de um isolado selvagem de *V. lecanii* foi submetida a uma superdose de 10 minutos de exposição à luz U.V., diluída e plaqueada em meio BDA. As colônias sobreviventes consideradas resistentes, foram submetidas a uma nova irradiação por 10 minutos e reisolados. Três dessas colônias foram submetidas à curva de sobrevivência juntamente com a linhagem selvagem. Posteriormente, foram multiplicadas em meio Czapeck e Czapeck líquido, de onde foram tiradas suspensões de conídios e/ou micélio e filtrado de cada biotipo, respectivamente. Gotas dessas suspensões e filtrados foram colocados sobre lâmina de microscopia, separadamente e, adicionou-se determinada quantidade de uredosporos de *H. vastatrix*. Após 6 horas de incubação, sob umidade relativa de aproximadamente 100% e escuro, foi efetuada a avaliação através da contagem de uredosporos germinados.

Os biótipos resistentes a ultra-violeta mostraram-se tão eficientes quanto à linhagem selvagem quanto à capacidade de inibição de uredosporos de *H. vastatrix*.

* Bolsista da FAPESP.

TEMPERATURAS EM CAMPO SOLARIZADO E DETERMINAÇÃO DE TEMPERATURAS LETAIS PARA FITOPATÓGENOS DE SOLO*. LEFEVRE, A.F.V. & SOUZA, N.L. (Deptº de Defesa Fitossanitária, FCA-UNESP. C.P. 237, 18600-Botucatu-SP).

Foram determinadas as temperaturas letais para *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Fusarium solani phaseoli* aos 15, 35 e 70 dias de cultivo em substrato. Os testes foram feitos por imersão de tubos de cultura contendo o substrato colonizado, em banho térmico, durante 30 min., em temperaturas com variação de 2,5°C ou 5,0°C. A sobrevivência dos fungos foi verificada pelo plaqueamento de fragmentos ou de diluições em série do substrato tratado termicamente, em BDA com oxitetraciclina. Para os dois primeiros patógenos, a temperatura letal mostrou-se em torno de 50°C, e para *F. solani phaseoli* os resultados apresentaram grande variação. Foram monitoradas as temperaturas em diversas profundidades do solo de canteiros solarizados, que apresentaram temperaturas de até 16°C maior que canteiro testemunha (não solarizado), a 10 cm de profundidade. Estes dados sugerem a viabilidade da solarização no controle de determinados fitopatógenos do solo; principalmente considerando-se que fungos cultivados em substrato autoclavado suportam maiores temperaturas que os mesmos organismos em condições de campo.

TEMPERATURES IN SOLARIZED SOIL AND LETHAL TEMPERATURES TO SOILBORNE PLANT PATHOGENS. LEFEVRE, A.F.V. & SOUZA, N.L. (Depto de Defesa Fitossanitária, FCA-UNESP. C.P. 237, 18600-Botucatu-SP).

It has been determined lethal temperatures of *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium solani phaseoli* grown during 15, 35 and 70 days in steamed soil meal. Soil culture in test tubes were immersed in thermostatically controlled water bath adjusted at intervals of 2.5°C or 5.0°C. Survival of fungi grown in soil culture was tested by planting out soil particles or soil dilutions on PDA amended with oxytetracycline. Lethal temperature of *R. solani* and *S. rolfsii* were about 50°C. *F. solani phaseoli* results were variable. Soil temperatures were monitored at several depths in mulched soils presenting temperatures up to 16°C higher than untreated plots at 10 cm depth. This results suggests the viability of soil solarization as a control method for some pathogenic soil fungi, mainly considering that killing the fungi in soil culture requires higher temperatures than that to eliminate the pathogen from infested soil.

* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor; Projeto financiado pela FAPESP.

FUNGOS ENDOFÍTICOS DA GRAMÍNEA *Digitaria insularis* ("CAPIM AMARGOSO").
 BAGALHI, E. & PAGLIARINI, A.C. (Deptº de Microbiologia e Imunologia, IB,
 UNESP, 18160-Botucatu-SP).

FUNGAL ENDOPHYTES OF THE GRASS *Digitaria insularis* ("sour grass").

Fungos endofíticos são organismos que vivem no interior do tecido vegetal, normalmente partes aéreas, sem, no entanto, desenvolver um quadro de doença. A associação fungo/planta normalmente é simbiótica, podendo con-
 ferir maior resistência à herbivoria e maior crescimento vegetativo da plan-
 ta devido a alcalóides e substâncias auxínicas produzidas pelo fungo.

D. insularis é uma gramínea invasora de larga ocorrência em nosso meio. Frequentemente encontrada em campos de pastagens, esta permanece in-
 tocada, mesmo em condições superpastoreio. Já creditou-se a esta planta,
 um possível papel como vetor de paracoccidioidomicose ("micose do capim"),
 doença esta causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

No presente trabalho, fragmentos de folhas, colmo apical e basal do
 pendão flora, de *D. insularis*, provenientes de Botucatu e Rubião Júnior
 (Estado de São Paulo), foram avaliados com relação à presença de fungos en-
 dofíticos. Os fragmentos (+ 10 mm²) foram previamente esterilizados com
 NaOCl 0,5% por 5 minutos e a seguir semeados em placas contendo meios de
 BDA e PYEA, mantidas a 25 e 35°C. Observou-se crescimento de várias espé-
 cies fúngicas, em ambos os meios e temperaturas. Algumas formas filamento-
 sas desenvolveram pigmentação vermelha ou preta. Observou-se também a pre-
 sença de fungos dimórficos (levedura e micélio) com capacidade de cresci-
 mento a 25 e 35°C, porém com características diferentes de *P. brasiliensis*.

Uma caracterização mais precisa destes organismos deverá proporcio-
 nar melhor entendimento do papel destes endófitos tanto na adaptação da
 planta como para uma possível fonte de agentes patogênicos e ou tóxicos ao
 homem e animais.

PURIFICAÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ARCELINA EM ESPÉCIES DE FEIJÃO SUSCEPTÍVEIS AO ATAQUE DE CARUNCHOS: ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO OBTIDA ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE RETROCruzAMENTO E ENGENHARIA GENÉTICA. SOUZA, C. R.¹; DE ALMEIDA, E.R.¹; SAMPAIO, M.J.¹; PEREIRA, P.²; GROSSI DE SÁ, M.F.¹. (1) CENARGEN/EMBRAPA. C.P. 10.2372. Brasília-DF; (2) CNPAF/EMBRAPA. C.P. 179. Goiânia-GO).

Sementes de feijão *Phaseolus vulgaris* L. contêm três principais tipos de proteína: a) phaseolina responsável por até 50% do nitrogênio total do grão; b) a lectina; c) a arcelina, que confere resistência ao ataque de carunchos (1).

A arcelina, descoberta apenas em feijões selvagens, apresenta quatro variantes quando analisados em eletroforese (ARC 1, ARC 2, ARC 3, ARC 4) com peso molecular variando de 35,000-42,000 daltons. Cada variante confere diferente grau de resistência às duas espécies de carunchos que atacam grãos de feijão, *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* (2).

O efeito da arcelina sobre a biologia do inseto é observado através de três parâmetros: taxa de emergência, duração do ciclo de vida e peso dos adultos emergidos (2, 3).

A arcelina-1 confere maior resistência, sendo responsável por mais de 80% de decréscimo da emergência da ambas espécies de carunchos. Todavia, quando se transfere a arcelina do feijão selvagem para o feijão cultivado, via retrocruzamento, a resistência ao *Zabrotes* é bem maior que ao *Acanthoscelides*. O nível de resistência ao *Zabrotes* está relacionado com a quantidade de arcelina 1 (2).

A presença da arcelina na semente do feijão cultivado é acompanhada pelo decréscimo acentuado da phaseolina (4).

Nós propomos clonar o gene da arcelina com o objetivo principal de introduzir este gene em espécies de feijão comercial susceptíveis ao ataque de carunchos; comparando-se a expressões obtidas através de técnicas de retrocruzamento e engenharia genética. Analisar o efeito da arcelina pura nas espécies de carunchos que atacam gramíneas, como milho, trigo e arroz, e outras leguminosas como o caupi. Utilizar diferentes promotores na tentativa de aumentar a quantidade de arcelina, aumentando assim a resistência.

BIBLIOGRAFIA

1. OSBORN, T.C. et al., 1988. *Science*, **240**: 207-210.
2. HARNSEN, R. et al., 1988. *Ann. Rept. Bean Imp. Coop.*, **31**: 54-55.
3. CARDONA, C. y POSSO, C.G. 1987. Resistencia de variedades de fryjol a los gorgojos del grano almacenado. Fuentes, mecanismos y factores responsables. *Boletín Informativo del Programa de Fryjol de CIAT*, Vol. 19, nº 2.
4. OSBORN, T.C. et al. 1986. *Theor. Appl. Genet.*, **71**: 847-855.

PURIFICATION, CLONING AND EXPRESSION OF ARCELIN PROTEIN FROM WILD TO CULTIVATED *Phaseolus vulgaris* THAT ARE SUSCEPTIBLE TO BRUCHIDES: COMPARATIVE STUDY OF THE EXPRESSION LEVELS OF ARCELIN OF BENAS TRANSFORMED BY BACKCROSSING AND GENETIC ENGINEERING. SOUZA, C.R.¹; SAMPAIO, M.J.¹; PEREIRA, P.²; GROSSI DE SÁ, M.F.¹ (¹CENARGEN/EMBRAPA. C.P. 10.2372, Brasília - DF; ² CNPDA/EMBRAPA. C.P. 179, Goiânia-GO).

Three major types of protein are being found in *Phaseolus vulgaris* L. seeds α -phaseolin that supplies with 50% of the total N. b-lectin and c-arcelin that confers resistance to bruchids.

The arcelin was originally reported only in wild beans four different arcelin types (ARC 1, ARC 2, ARC 3, ARC 4), which molecular weight ranges between 35,000-40,000 daltons, were found. Each type confers different levels of resistance to the bruchids *Acanthoscelides obtectus* and *Zabrotes subfasciatus*, which infest beans.

The presence of arcelin has effect on the insect biology. This effect is observed by three parameters: The percent emergency, the duration of the life cycle and the weight of the emerged adults.

The arcelin 1 confers higher levels of resistance than the other types. It can decrease emergence in both, *A. obtectus* and *Z. subfasciatus*, by more than 80%. However when the arcelin is transferred from wild to cultivated lines, via backcrossing, the resistance to *Zabrotes* is higher than in *Acanthoscelides*. The resistance level to *Zabrotes* is related to the amount of arcelin 1.

The presence of arcelin in seeds of cultivated *Phaseolus vulgaris* causes a considerable decrease of *Phaseolin*.

VARIABILIDADE EM *Trichoderma harzianum*. PERES, E. & MELO, I.S. (Estagiária do Departamento de Genética - ESALQ/USP, CNPDA/EMBRAPA. C. Postal 69. 13820 - Jaguariúna-SP).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a variabilidade existente entre 12 isolados de *Trichoderma harzianum* antagônicos a *Rhizoctonia solani*; *Verticillium dahliae* e *Sclerotinia minor* (Th₁, Th₂, Th₃, Th₄, Th₅, Th₆, Th₇, Th₈, Th₉, Tal₁, Tal₈ e TMA₄). Analisando-se os seguintes parâmetros: tamanho de conídios, número de núcleos por conídios, crescimento radial, esporulação e morfologia da colônia.

Quanto ao tamanho verificou-se que nos isolados Th₁, Th₄ e Tal₁ os conídios foram maiores que nos outros isolados. Com relação ao número de núcleos, observou-se a presença de conídios uni, bi e trinucleados, os isolados Th₅ e Th₉ apresentaram a maior porcentagem de conídios trinucleados, enquanto que os isolados Th₂, Th₇ e Th₈, tiveram apenas conídios uninucleados. Os isolados Th₉ e Tal₈ tiveram crescimento mais lento (6,48 e 6,79, respectivamente em 48 horas).

Também os isolados diferiram entre si quanto ao grau de antagonismo contra *Sclerotinia minor* e *R. solani*.

EFEITO ANTAGÔNICO DE *Trichoderma* spp. SOBRE *Verticillium dahliae* KLEB. EM BERINJELA (*Solanum melangena* L.). MARTINS, M.P. & MELO, I.S. (Departamento de Genética - ESALQ/USP. C.P. 09. 13400-Piracicaba-SP).

ANTAGONIC EFFECT OF *Trichoderma* ON *Verticillium dahliae* KLEB. IN EGG-PLANT (*Solanum melangena* L.).

O presente estudo foi conduzido inicialmente em laboratório através da seleção de isolados de *Trichoderma* spp. com poder antagônico sobre *V. dahliae*, sendo denominados: *T. viride* (Tal, e T15P), *T. kaniingii* (CNP311A e TW6), *T. harzianum* (CNP 17 e TC II).

Para verificar a eficiência desses antagonistas "in vivo" ambos os fungos foram semeados em substrato contendo milho pipoca esterilizado durante 60 minutos, a 120°C. Os isolados de *Trichoderma* spp. cresceram nesse substrato durante 15 dias sobre *V. dahliae*, que crescia a 7 dias, a temperatura ambiente. Em casa de vegetação, os inóculos foram transferidos para vasos plásticos contendo uma mistura de solo + areia + esterco, em partes iguais. Mudanças da cultivar RV III e do híbrido F100 foram transplantadas para os vasos plásticos. A avaliação das plantas com sintomas de murcha verticilar foi realizada no 30º dia. Na testemunha, sem *Trichoderma* spp., a quantidade de doença foi de 96% e 60% no híbrido F100 e na cultivar RV III, respectivamente. Na maioria dos tratamentos houve uma drástica redução do inóculo de *V. dahliae*, que pode ser constatada pela ausência de plantas doentes.

Paralelamente, verificou-se que as isoladas de *Trichoderma* spp. sobreviveram no solo natural, em sacos plásticos, durante 210 dias.

Em condições de campo, a avaliação de reação do hospedeiro efetuada no 70º dia após a infestação dos fungos no solo, mostrou que o isolado CNP 17 foi um dos mais eficientes no controle da murcha verticilar.

OBTENÇÃO DE NOVOS BIÓTIPOS DE *Trichoderma viride* ANTAGÔNICOS A *Sclerotinia minor* Jajjer*. MELO, I.S. (Centro Nacional de Pesq. de Defesa da Agricultura/EMBRAPA, C. Postal 69, 13820 - Jaguariúna-SP).

Trichoderma viride, linhagem T2b, isolado da rizosfera de alface, mostrou-se antagonístico ao fungo *Sclerotinia minor*, agente causador da podridão basal que, juntamente com *S. sclerotiorum* constituem sério problema fitossanitário à cultura da alface em regiões de clima ameno.

Linhagens mutantes produtoras de metabólitos tóxicos contra *S. minor* e *Rhizoctenia solani* foram obtidas da linhagem T2b através do tratamento com irradiação ultra-violeta. Três mutantes foram mais inibitórios "in vitro" e "in vivo". O mutante designado M-19 protegeu plantas de alface da podridão em aproximadamente 80%, quando comparado com a testemunha não inoculada com *Trichoderma* e em 50% quando comparada com o isolado selvagem. Contudo, tanto o crescimento micelial quanto a esporulação destes mutantes foram reduzidos em relação ao isolado selvagem.

Este estudo mostra que o mecanismo de controle de *S. minor* pode ser através de substâncias produzidas por *Trichoderma viride* e que se pode aumentar a variabilidade genética do caráter através do tratamento de condições com luz ultra-violeta.

NEW BIOTYPES OF *Trichoderma viride* WITH ENHANCED BIOCONTROL CAPABILITIES AGAINST *Sclerotinia minor*, OBTAINED BY U.V. IRRADIATION. MELO, I.S. (CNPDA/EMBRAPA, C. Postal 69. 13820-Jaguariúna-SP).

Mutant strains overproducing toxic metabolites against *Sclerotinia minor* were isolated from the fungus *Trichoderma viride*-T2b after mutagenesis by ultra-violet irradiation. Three mutants with enhanced toxic metabolite production were more inhibitory "in vitro" and "in vivo" than the parent isolate. The mutant M-19 protected lettuce of the soft rot, caused by *S. minor*, in about 80% when compared to the check, not inoculated with *Trichoderma* and 50% when compared to the parent isolate. However, its growth rate was reduced.

These results indicate that the biocontrol mechanism of *S. minor* may be through of antibiotic compounds produced by *T. viride* and that the U.V. irradiation is efficient in increasing the genetic variability for antibiotic production in this fungus.

* Trabalho financiado pela Fundação Banco do Brasil

MUTANTES DE *Trichoderma harzianum* RESISTENTES A IPRODIONE E ANTAGÔNICOS AO *Sclerotinia minor**. (SILVA, A.C.F. da¹ & MELO, I.S.^{1,3}; ² Departamento de Genética - ESALQ/USP, 13400 - Piracicaba - SP; ³CNPDA/EMBRAPA, C. Postal, 69 - Jaguariúna - S.P.).

Visando um programa de controle integrado de *Sclerotinia minor* na cultura da alface (*Lactuca sativa* L.), esporos em solução salina do agente de biocontrole, *Trichoderma harzianum* (Linhagens Tw5 e TMA4), foram irradiadas sob luz ultravioleta (2,0 minutos para Tw5 e 4,0 minutos para TMA4, dose de 5% de sobrevivência). Em seguida, 0,1 ml da solução irradiada (10⁷ esporos/ml) foi plaqueado em meio BDA, contendo 2000 ppm de Iprodione. Após o crescimento das colônias mutantes a 26°C, foram selecionadas dez colônias da linhagem TMA4 e oito colônias da linhagem Tw5 por apresentarem maior crescimento e esporulação. A avaliação das colônias resistentes foi feita através da medição do crescimento radial e da esporulação por contagem em hematómetro quando em crescimento em meio de aveia sem o fungicida e em meio BDA com 2.000 ppm de Iprodione. O teste de antibiose "in vitro" foi feito através do método de papel celofane em meio BDA com os biótipos mutantes resistentes a 2000 ppm do fungicida Iprodione na esporulação e no crescimento radial dos biótipos mutantes em meio de aveia, como também em BDA 2000 ppm de Iprodione. A percentagem de inibição de crescimento radial do patógeno *Sclerotinia minor* foi, na maioria, 100% para os biótipos mutantes.

* Trabalho financiado pela Fundação Banco do Brasil.

SOBREVIVÊNCIA DE LINHAGENS DE *Trichoderma* RESISTENTES A IPRODIONE EM MORAN GUEIRO. VITTI, A.J. & GHINI, R. (EMBRAPAECNPDA. C.P. 69. 13820-Jaguariúna-SP.).

Linhagens de *Trichoderma* resistentes a iprodione, isto é, apresentando crescimento micelial e esporulação em meio de cultura contendo 1000 ppm do fungicida, foram testadas quanto à sobrevivência em plantas de moran gueiro.

No primeiro ensaio, suspensões de 10^7 conídios/ml das linhagens MAT 48 R 1 e MAT 63 R 2 e da mistura MAT 48 R 1 + MAT 63 R 2 foram preparadas em água destilada e em solução de sacarose 1%, com adição de 0,01% de Tween 80. As suspensões foram pulverizadas, permanecendo, a seguir, 24 horas em câmara úmida. A avaliação foi realizada, semanalmente, através da coleta de discos de folha com 4 mm de diâmetro, divididos em quatro partes e transferidos para meio de cultura de BDA contendo 500 ppm de iprodione e 500 ppm de tetraciclina. A recuperação das linhagens de *Trichoderma*, 16 dias após a pulverização, foi de 100% em todos os tratamentos, exceto nas testemunhas (água destilada e solução de sacarose 1%). Após 37 dias, as porcentagens de recuperação permaneceram elevadas, sendo que os melhores resultados foram obtidos com solução de sacarose 1% e com a mistura de linhagens.

No segundo ensaio, as plantas foram pulverizadas com: a) suspensão de conídios de MAT 48 R 1 (10^7 conídios/ml); b) MAT 48 R 1 (10^7 conídios/ml) e iprodione (75 ppm), aplicados simultaneamente; c) iprodione (750 ppm) e d) testemunha (água destilada). As plantas foram pulverizadas com 10 ml de suspensão/vaso, em 8 repetições, permanecendo 24 horas em câmara úmida. A avaliação da sobrevivência foi feita através do número de conídios viáveis por área foliar. Para tanto, discos foliares (4 mm de diâmetro) foram coletados, mergulhados em solução tampão fosfato esterilizada e agitados a 150 rpm, durante 15 minutos. Alíquotas foram retiradas e colocadas em meio de cultura de BDA com 500 ppm de tetraciclina, 500 ppm de iprodione e 250 ppm de propionato de sódio, sendo avaliado o número de colônias, após 1 semana de incubação. De amostras coletadas 2, 9, 16 e 23 dias após a pulverização foi observada, respectivamente, a existência de sobrevivência de 2457, 114, 69 e 17 conídios/cm² de folha para a linhagem MAT 48 R 1 aplicada sozinha e 1776, 19, 72 e 4 conídios/cm² de folha para MAT 48 R 1 + iprodione.

ATIVIDADE CELULOLÍTICA DA LINHAGEM SELVAGEM E MUTANTES MONO E DUPLO AUXOTRÓFICOS DE *Trichoderma pseudokoningii* var RIFAI. FURLANETO, M.C. & PIZZI RANI-KLEINER, A.A. (Departamento de Genética - ESALQ/USP. 13400 - Piracicaba-SP).

As atividades celulolíticas de colônias da linhagem selvagem e mutantes auxotróficos de *Trichoderma pseudokoningii* foram expressas na forma de índices enzimáticos. Observou-se variabilidade nas colônias quanto a produção deste complexo enzimático. Mutantes mono e duplo auxotróficos apresentaram atividades celulolíticas superiores a da linhagem selvagem e a do mutante QM 9414 de *T. reesei*. As colônias de menor crescimento, menor diâmetro, apresentaram valores médios de atividade celulolítica maiores, em relação às colônias de maior crescimento. Os valores de índices enzimáticos foram proporcionais à maior ou menor compactação das colônias. O mutante de maior grau de compactação, designado TY5UV8-24, foi significativamente diferente das demais colônias. No entanto, os fatores determinantes de alterações em atividades enzimáticas, são difíceis de serem delimitados devido a natureza complexa do problema.

OBTENÇÃO DE MUTANTES DE *Pareilomyces lilacinus* PARA UTILIZAÇÃO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES. PIMENTEL, I.C. & AZEVEDO, J.L. (Departamento de Genética, ESALQ/USP, Caixa Postal 83, 13400 Piracicaba, SP).

Visando o uso de *Pareilomyces lilacinus* no controle biológico de nematóides lançou-se da técnica de obtenção de mutantes para um possível melhoramento genético da linhagem através de tratamento com mutagênicos físicos. Primeiramente utilizou-se a luz ultra-violeta onde suspensões de conídios foram irradiadas nos seguintes tempos 1; 2; 3; 4 e 8 minutos de exposição e depois semeadas em placas de Petri esterilizadas contendo meio BDA (Batata-dextrose-ágar) e incubadas a 28°C em ausência de luz por 7 a 8 dias. Utilizou-se também a radiação Gama sendo a suspensão de conídios da mesma linhagem irradiada com raios Gama (Fonte de Co^{60} -CENA-USP) a uma distância da fonte de 26 cm com uma taxa de dose de 2.225,07 gray-hora. As doses acumulativas foram de 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 gray e os conídios após irradiados semeados em placas de Petri esterilizadas contendo meio BDA e incubadas a 28°C por 7 a 8 dias.

A avaliação foi feita através da contagem do número e porcentagem relativa dos sobreviventes (expressos em conídios/ml), tomando-se o nº de colônias obtidas no tempo 0 e a dose 0 (controle) como sendo 100% de sobrevivência, estimou-se deste modo 4 minutos ($5,0 \times 10^2$ conídios/ml) que permitiu 5% de sobrevivência e a dose de 600 Gray ($7,6 \times 10^2$ conídios/ml) que permitiu 1% de sobrevivência.

Das irradiações obteve-se 4 mutantes através da luz ultra-violeta e 3 mutantes da radiação Gama que apresentaram coloração e morfologia diferentes da linhagem selvagem os quais mantiveram característica de bom crescimento e produção de conídios.

OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *Paecilomyces lilacinus* AGENTE UTILIZADO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES. PIMENTEL, I.C. & AZEVEDO, J.L. (Departamento de Genética, ESALQ/USP, Caixa Postal 83, 13400 Piracicaba, SP).

A utilidade e a aplicabilidade de protoplastos no melhoramento genético de fungos é uma consequência de muitos estudos básicos no isolamento e cultivo dos mesmos; neste trabalho foram ensaiados diferentes estabilizadores osmóticos em diferentes concentrações para obtenção de protoplastos de *P. lilacinus*.

Uma suspensão de conídios inoculados em meio líquido de BDA foram incubadas em agitador rotatório (150 rpm) por 24 horas a 28°C, sendo posteriormente o micélio filtrado à vácuo em papel filtro e lavado com KCl 0,8; 1,0 ou 1,2 M e MgSO₄ 0,6 ou 0,8 M. O peso úmido do micélio foi determinado e montado um sistema lítico de solução osmótica KCl 0,8; 1,0 ou 1,2 M e MgSO₄ 0,6 ou 0,6 M: 5,0 ml mais Novozyne 234 ("Novo Industries"): 12,5 mg; Celulase CP ("John & Sturge"): 12,5 mg mais o micélio úmido; 200 mg.

Os protoplastos foram incubados novamente em agitador rotatório e coletados através de centrifugação e lavagem sucessivas; posteriormente realizou-se a contagem e semeadura em placas nos seguintes meios de regeneração (meio BDA + KCl 1,0M; meio BDA + KCl 1,2M; meio BDA + MgSO₄ 0,6M ou BDA + MgSO₄ 0,0M) e incubados por 3 a 5 dias. Após esse período a viabilidade dos protoplastos foi estimada, sendo expressa através da taxa de regeneração dos mesmos.

Foram obtidas as seguintes porcentagens de regeneração: nos meios de BDA + KCl 0,8M 3,485%, BDA + KCl 1,0M 0,3% + KCl 1,2M 2,906%, BDA + MgSO₄ 0,6M 4,963% e BDA + MgSO₄ 0,8M 5,538%.



EMBRAPA

FICHA DO LIVRO

AUTOR

TÍTULO: Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 3., Piracicaba, 1989. Anais.

DEVOLVER EM

NOME DO LEITOR

19/10/91

Fulano



EMBRAPA

— BIBLIOTECA —

