

CONTROLE BIOLÓGICO DA MURCHA DE BERINJELA
CAUSADA POR *Verticillium albo-atrum**

Itamar Soares de Melo**
Cyro Paulino da Costa***

RESUMO

O controle biológico de *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth., agente causal da murcha de berinjela (*Solanum melongena* L.), foi feito em condições de laboratório e em condições de campo. Os melhores isolados de *Trichoderma* foram aqueles que apresentaram, em placas de Petri, uma zona de inibição bem evidente. *Trichoderma hamatum* e o isolado T₃ de *Trichoderma* reduziram sensivelmente a incidência da doença em condições de casa-de-vegetação. No campo, *T. lignorum* e o isolado T₃ propiciaram os melhores resultados. Os mutantes de *Trichoderma*, obtidos por irradiação ultravioleta, não foram eficientes no biocontrole de *Verticillium*.

*Aceito para publicação em 29/10/87.

**Eng^o Agr^o, Dr., EMBRAPA/ESALQ/USP, Dep. de Genética.

***Eng^o Agr^o, Ph.D., Dep. de Genética, ESALQ/USP.

Termos de indexação: *Verticillium albo-atrum*, *Trichoderma*, *Solanum melongena*, isolados.

INTRODUÇÃO

Verticillium albo-atrum Reinke & Berth é um dos mais importantes parasitas vasculares de plantas superiores. Sua extensa gama de hospedeiros inclui várias espécies agrícolas de expressão, entre elas a berinjela (*Solanum melongena* L.), causando murcha. No Brasil, a murcha é uma doença que pode causar a perda total da produção em anos de severas epidemias. A principal fonte de inóculo é o solo, onde microesclerócios do fungo permanecem viáveis por até 14 anos (WILHERLM, 1955).

As variedades de berinjela ora plantadas em nosso meio carecem de resistência a *V. albo-atrum*. Ademais, o controle químico efetivo da doença tem sido inconsistente e as medidas preventivas recomendadas, como a rotação de cultura, têm se mostrado pouco eficiente, devido à grande longevidade dos microesclerócios e ao grande número de espécies suscetíveis ao fungo.

O manejo adequado de doenças, como o uso de hospedeiros resistentes e práticas culturais para maximizar a ação de microrganismos antagonísticos, pode ser um método eficiente de controle, não se recorrendo a medidas não biológicas. O controle biológico de doenças de plantas é um método que ganha importância com a evolução dos conhecimentos fitopatológicos. Microrganismos podem agir como reguladores de populações ou mesmo exterminadores de outros, atuando em antagonismo com patógenos de plantas. Fungos saprófitas do solo mostram atividade antagonística a vários patógenos, inclusive a *V. albo-atrum*. Espécies de *Trichoderma* são antagonistas a uma ampla gama de fungos e efetivamente reduzem a incidência de doenças causadas por patógenos de solo (SCHROTH & HANCOCK, 1981). Muitos isolados de *Trichoderma* produzem antibióticos vo-

lâteis e não volâteis ativos contra uma gama de fungos (DENNIS & WEBSTER, 1971a; DENNIS & WEBSTER, 1971b). A capacidade de produzir tais substâncias varia entre isolados da mesma espécie, assim como entre diferentes espécies. CHET & BAKER (1980) encontraram um isolado de *T. hamatum* em um solo supressivo a *Rhizoctonia solani* e que foi eficiente em controlar doenças induzidas por *R. solani*, *Pythium* sp. e *Sclerotium rolfsii*. Este isolado produziu B-glucanase, quitinase e celulase e foi capaz de se desenvolver nas hifas de *R. solani*. Com relação à murcha de *V. albo-atrum* do tomateiro, ISAAC (1954) observou que, quando *Blastomyces luteus* foi adicionado a solo infestado com *V. albo-atrum* e *V. dahliae*, houve uma marcante redução na incidência da doença. MAOIS et al. (1982) usaram o fungo antagonico *Talaromyces flavus* como agente efetivo no biocontrole de *Verticillium dahliae* em berinjela.

O presente trabalho teve por objetivo testar a possibilidade de controle biológico da murcha de berinjela com isolados do fungo antagonico do gênero *Trichoderma*.

MATERIAL E MÉTODOS

ANTAGONISMO "in vitro" - A fim de se avaliarem isolados de *Trichoderma* com relação ao antagonismo a *V. albo-atrum* em placas de Petri contendo BDA. *Verticillium albo-atrum* e *Trichoderma* foram colocados simultaneamente nas placas usando, para tanto, discos de micélio, sendo cada qual depositado num ponto oposto da placa e a cerca de dois centímetros de seus bordos, conforme JOHNSON et al. (1959). Cada tratamento foi repetido 4 vezes. As placas foram deixadas no escuro a temperatura ambiente e as observações foram feitas 12 dias após o plaqueamento.

CONTROLE BIOLÓGICO DE *V. albo-atrum* EM CASA DE VEGETAÇÃO - Os fungos selecionados no laboratório, prováveis inibidores do patógeno, foram testados em condições

de casa de vegetação. Para tanto, fizeram-se dois ensaios, utilizando-se dois métodos de inoculação. Os fungos utilizados no primeiro ensaio foram *Trichoderma lignorum*, *T. hamatum*, *Trichoderma* sp. (T₁), *Trichoderma* sp. (T₃) e *Trichoderma* sp. (T₆).

O primeiro ensaio foi feito em caixas de plástico, onde foram colocadas três camadas de substrato. A primeira foi constituída de areia mais bagaço de cana pré-colonizado com *Trichoderma*, na relação 1:2; a segunda, de solo + bagaço de cana colonizado e, por último, areia. Dois frascos de 500 ml contendo bagaço de cana colonizado com *Trichoderma* foram usados em cada caixa. Cada uma foi umedecida com 200 ml de melação a 2%. A inoculação do *Verticillium*, um dia após o preparo do substrato, foi feita através da imersão das raízes numa suspensão conidial (5×10^5 conídios/ml), utilizando-se mudas de berinjela cv. Florida Market com 22 dias de idade, desenvolvidas em solo esterilizado.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 repetições, além de controle não inoculado com *Verticillium* e dos tratamentos que receberam somente *Trichoderma*. Utilizaram-se 25 plantas por parcela (caixa). A avaliação da reação do hospedeiro, feita 35 dias após a inoculação, foi através da porcentagem de plantas doentes, observando-se os sintomas externos (murcha) e internos (escurecimento dos vasos).

O segundo ensaio foi feito em vasos de barro com capacidade para 5 kg de solo, mudando-se a técnica de inoculação, que foi através de infestação do solo.

Utilizaram-se, para este ensaio, aqueles fungos que melhores resultados proporcionaram no ensaio anterior, os quais foram *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma* sp. (T₃) e *Trichoderma lignorum*.

A semeadura da berinjela foi feita em caixas de plástico, e as mudas com 12 dias de idade foram transplanta

das para vasos de polietileno de 7 cm de diâmetro, contendo solo esterilizado. Quando as mudas atingiram aproximadamente 15 cm de altura (30 dias após a semeadura), as plantas foram transferidas para os vasos de barro contendo solo infestado com *Verticillium*. Um dia anterior ao transplante, procedeu-se à infestação do solo com os três isolados de *Trichoderma*. De cada vaso, foi retirado cerca de 1/3 de solo para que se pudesse aplicar uniformemente, à região das raízes, os fungos antagonísticos. Assim, cada vaso recebeu 300 ml de bagaço de cana colonizado por *Trichoderma* e 100 ml de melação a 2% foram utilizados para irrigar cada vaso. Logo após, completou-se o volume do vaso com o solo restante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições, além do controle não inoculado com o patógeno e dos tratamentos que receberam somente *Trichoderma*. Utilizaram-se 16 plantas por parcela, sendo 4 plantas em cada vaso.

A avaliação da reação do hospedeiro foi através da porcentagem de plantas doentes. Efetuaram-se avaliações de plantas infectadas a partir do 10º dia da inoculação, em intervalos de 7 dias, por um período de 38 dias.

CONTROLE BIOLÓGICO DE *V. albo-atrum* EM CONDIÇÕES DE CAMPO - Foram utilizados os fungos antagonísticos de *T. lignorum* e *Trichoderma* sp. (T3).

A metodologia utilizada foi semelhante à descrita no ensaio anterior, mudando-se somente a técnica de inoculação de *Verticillium*. Mudanças de berinjela cv. Florida Market, desenvolvidas em vasos de polietileno (10 cm de diâmetro) contendo solo esterilizado, com 32 dias de idade, foram transplantadas para o campo. Em cada cova, eram adicionados 100 ml de bagaço de cana colonizado por *Trichoderma* e irrigada com melação a 2%. O espaçamento utilizado foi de 1,30 x 40 cm. Sete dias após o transplante, inoculou-se *Verticillium* a uma concentração de 5×10^5 conídios/ml. Cada cova no campo foi infesta-

da artificialmente pela adição de 40 ml da suspensão. O inóculo foi incorporado ao solo a uma profundidade de 10 cm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições, além do controle não inoculado. Utilizaram-se 10 plantas por parcela.

A avaliação da reação do hospedeiro foi através da porcentagem de plantas doentes. Efetuaram-se avaliações de plantas doentes com intervalos de 7 dias a partir do 14º dia após a inoculação, por um período de 49 dias. As irrigações (por infiltração) e capinas foram realizadas sempre que necessárias. Foram realizadas 2 aplicações de acaricidas para prevenção de ataque de ácaro. Foi realizada uma adubação nitrogenada, em cobertura, com uréia, 30 dias após o transplante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANTAGONISMO in vitro - *Trichoderma hamatum*, *T. lignorum*, *Trichoderma* sp. (T₁), (T₆), foram selecionados em meio de cultura por apresentarem uma zona de inibição ao patógeno. O mutante de *Trichoderma* sp. (M₁), mesmo não tendo sido efetivo in vitro, foi usado no teste em casa de vegetação. Estes fungos atingiram o máximo de esporulação e colonização do substrato ao 7º dia de incubação, exceto para isolado T₆, que alcançou o nível máximo ao 10º dia.

Verificou-se que houve diferentes tipos de inibição do crescimento, havendo uma zona de inibição entre as duas colônias. O *V. albo-atrum* tinha seu crescimento paralisado, enquanto a antagonista continuava a crescer pela zona de inibição. Os quatro mutantes usados não produziram zonas de inibição. Verificou-se que a ação dos fungos in vitro correspondeu ao seu comportamento in vivo.

CONTROLE BIOLÓGICO DE *V. albo-atrum* EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO E DE CAMPO - Os resultados do ensaio, feito em caixas plásticas, constam da Tabela 1. A análise da variância detectou pelo menos um contraste significativo entre os tratamentos, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 1. Controle de *V. albo-atrum*, em substrato colonizado por *Trichoderma*, em berinjela, em condições de casa de vegetação. Dados não transformados.

| Tratamentos | Médias ¹ |
|---|---------------------|
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma</i> sp. (M ₁) | 41,66 ns |
| <i>V. Albo-atrum</i> + <i>Trichoderma</i> sp. (T ₁) | 33,33 + |
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma</i> sp. (T ₆) | 29,99 + |
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma lignorum</i> | 26,66 + |
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma</i> sp. (T ₃) | 16,66 + |
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma hamatum</i> | 13,33 + |
| <i>V. albo-atrum</i> (controle) | 59,99 |

¹ Média de 4 repetições.

+ Significativo ao nível de 5% pelo Teste Dunnet quando comparado com o controle
ns não significativo

No tocante ao teste de médias (Tabela 1) realizado através do teste de Dunnett ao nível de 5%, pode-se observar que todos os fungos utilizados, com exceção do mutante de *Trichoderma* (M₁), reduziram significativamente a incidência da doença quando comparados com o controle.

Pode-se inferir, pelos resultados, que o nível de inóculo utilizado foi suficiente para causar 60% de incidência de doença. Verificou-se uma redução de 60% para

13% de plantas atacadas quando se aplicaram simultaneamente *V. albo-atrum* e *Trichoderma hamatum*. *Trichoderma lignorum* e o isolado T₃ também reduziram sensivelmente a murcha causada por *Verticillium*.

O teste de antagonismo em vasos de barro com solo artificialmente infestado indica que *T. hamatum* e o isolado T₃ reduziram significativamente a incidência da doença (Tabela 2). Os primeiros sintomas da doença, no tratamento com *V. albo-atrum* e *T. hamatum*, foram observáveis 21 dias após o surgimento da doença no controle. *Trichoderma hamatum* reduziu a doença em cerca de 50%, comparado com o controle.

Tabela 2. Controle de *V. albo-atrum* em berinjela, em solo artificial infestado, em condições de casa de vegetação. Dados não transformados.

| Tratamentos | Médias ¹ |
|---|---------------------|
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma lignorum</i> | 47,91 ns |
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma</i> sp. (T ₃) | 41,67 + |
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma hamatum</i> | 33,33 + |
| <i>V. albo-atrum</i> (controle) | 64,58 + |

¹ Média de 4 repetições

+ Significativo ao nível de 5% pelo Teste de Dunnett quando comparado com o controle.

ns não significativo.

Apesar de *T. lignorum* ter reduzido a incidência da murcha, ele não foi estatisticamente diferente do controle, pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. No campo, o controle de *Verticillium* por *Trichoderma lignorum* e *Trichoderma* sp. (T₃) ficou evidenciado pela acentuada diminuição da doença. Estes fungos diferiram estatisti-

mente do controle ao nível 5% de probabilidade, diferente do ensaio anterior, mostrou-se eficiente em controlar a doença no campo, naquelas condições estudadas.

Tanto em condições de casa de vegetação como em condições de campo, o controle de *V. albo-atrum* foi eficiente com a utilização do isolado T₃ de *Trichoderma*. *Trichoderma hamatum* foi também eficiente em casa de vegetação. Assim, recomenda-se a utilização destes fungos em testes posteriores.

Este é o primeiro relato de *T. hamatum* controlando a murcha de berinjela causada por *V. albo-atrum*. Já foi relatado o controle biológico de *Verticillium* com fungos antagônicos como *T. lignorum* em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e em berinjela (Berimistru e Shteinberg (1978), citados por MAROIS et al. (1982). MAROIS et al. (1982) usaram com sucesso o fungo *Talaromyces flavus* como agente efetivo no controle biológico de *Verticillium dahliae* em berinjela.

Devido ao fato de *V. albo-atrum* ser o fungo mais importante da berinjela no Estado de São Paulo, novos biótipos ou isolados de *Trichoderma*, e talvez agentes de biocontrole, necessitam ser desenvolvidos com atividade contra este patógeno. Necessitam também ser desenvolvidos melhores e mais baratos substratos para multiplicação do fungo *Trichoderma* sp. para garantir sua estabilidade no solo. O fungo *Trichoderma*, segundo HARMAN et al. (1981), necessita de um bom substrato para se estabelecer no solo.

Este trabalho não tem, evidentemente, pretensões de estabelecer definitivamente a viabilidade prática do uso do controle biológico mas encorajar a pesquisa nesta área para que, futuramente, tal prática seja usada rotineiramente pelos agricultores. Ademais, o emprego adequado de organismos eficientes no biocontrole possibilitará a redução do uso de fungicidas, que entre tantas vantagens, propicia o aparecimento de raças resistentes dos

patógenos, oneram o custo de produção, destroem o equilíbrio ecológico e são, em geral, altamente tóxicos.

Tabela 3. Controle de *V. albo-atrum* em berinjela com *Trichoderma* sp. em condições de campo. Dados não transformados.

| Tratamentos | Médias ¹ |
|---|---------------------|
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma lignorum</i> | 58,33 + |
| <i>V. albo-atrum</i> + <i>Trichoderma</i> sp. (T ₃) | 55,00 + |
| <i>V. albo-atrum</i> (controle) | 90,00 |

¹ Média de 6 repetições

+ Significativo ao nível de 5% pelo Teste de Dunnett quando comparado com o controle.

Para que o controle biológico seja usado com sucesso, deve-se, se possível, utilizarem hospedeiros com certo grau de resistência ao patógeno em estudo. Usando-se hospedeiros suscetíveis, a doença não pode ser controlada eficientemente só com o uso de organismos antagonísticos. BROWNING et al. (1977) afirmam que se deve trabalhar com gens de resistência para conseguir um controle mais estável. O uso adequado de diferentes táticas - diferentes tipos de resistência, fungicidas e práticas culturais para maximizar a ação de antagonísticos (biocontrole) - ajudaria no manejo estratégico de doenças.

SUMMARY

BIOLOGICAL CONTROL OF *Verticillium* WILT OF EGGPLANT

The antagonistic activity of *Trichoderma* species against *Verticillium* wilt of eggplant was evaluated.

The studies were undertaken *in vitro* and *in vivo*. A clearly defined zone, in which the growth of the pathogen was inhibited, was observed with some isolates of *Trichoderma* *in vitro*. The best results of the biocontrol under greenhouse conditions were obtained with *Trichoderma hamatum* and with the isolate T₃ of *Trichoderma* sp. In a field experiment, *T. lignorum* and the isolate significantly reduced the disease. The mutants of *Trichoderma*, obtained by UV irradiation, were not efficient in controlling the disease.

LITERATURA CITADA

- BROWING, J.A.; SIMONS, M.D. & TORRES, E. Managing host genes: epidemiologic and genetic concepts. In: Plant disease. Vol. I. Academic Press, Inc., New York, pp. 191-211, 1977.
- CHET, I. & BAKER, R. Introduction of Supressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, **70**: 994-98, 1980.
- DENNIS, L. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **57**: 25-39, 1971a.
- DENNIS, L. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, **57**: 41-48, 1971b.
- GARRETT, S.D. Toward biological control of soil - borne plant pathogens. In: **Ecology of Soil - Borne Plant Pathogens - Prelude to Biological Control**. K.F. Baker and W.C. Snyder. Univ. of California Press: 4-17, 1965.

- HARMAN, G.E.; CHET, I. & BAKER, R. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol-agent. **Phytopathology**, **71**: 569-572, 1981.
- ISAAC, I. Studies in the antagonism between *Blastomyces luteus* and species of *Verticillium*. **Ann. Appl. Biol.**, **76**: 27-35. 1954.
- MAROIS, J.J.; JOHNSTON, A.; DUNN, M.T. & PAPAIVIZAS, G.C. Biological Control of *Verticillium* wilt of eggplant in the field. **Plant Disease**, **66**: 1166-1168, 1982.
- SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. **Ann. Rev. Microbiol.**, **35**: 453 - 76, 1981.
- WILHELM, S. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. **Phytopathology**, **45**:180-181, 1955.