

SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DE *Cylindrocladium spathulatum* EM ERVA-MATE*

Nei Sebastião Braga Gomes*
Albino Grigoletti Junior **
Celso Garcia Auer***

RESUMO

A erva-mate está sujeita a doenças que podem provocar prejuízos ou, até mesmo, inviabilizar seu cultivo. A principal é a pinta-preta causada por *Cylindrocladium spathulatum*. O objetivo deste trabalho foi selecionar e avaliar antagonistas para o controle biológico da pinta-preta. Os experimentos foram conduzidos com antagonistas residentes obtidos (1) de solo infestado com o patógeno, (2) a partir da lavagem de folhas de erva-mate nativa e (3) de microrganismos presentes em lesões de pinta-preta. Outros isolados testados, *Trichoderma* e *Bacillus subtilis*, foram procedentes de Bento Gonçalves/RS e Jaguariúna/SP, respectivamente. Inicialmente, fez-se a seleção de isolados antagônicos à *C. spathulatum*, em placas de Petri com meio BDA. Os isolados de bactérias e de *Trichoderma* que apresentaram maior percentual de inibição, em teste de produção de antibióticos e no teste de hiperparasitismo, respectivamente, foram selecionados para serem empregados nos testes subsequentes com papel celofane, placas sobrepostas, inibição de germinação de esporos e, antagonismo em folhas destacadas e em mudas. O resultados mostraram que a seleção de antagonistas é possível em mudas. Os isolados de *Bacillus* mostraram-se mais eficientes que os de *Trichoderma*. O isolado mais efetivo AP-49 (*B. subtilis*) reduziu o número de lesões das mudas, em até 90 %. Os isolados residentes, B-1 e B-3 também reduziram a incidência da doença.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus*, controle biológico, doença, *Ilex paraguariensis*, *Trichoderma*.

* Artigo extraído da tese de Mestrado do primeiro autor, apresentada no curso de PG em Engenharia Florestal-UFPR

¹ Engenheiro Florestal, Mestre em Engenharia Florestal - UFPR.

² Engenheiro-agrônomo, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

³ Engenheiro Florestal, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

SELECTION OF POTENTIAL ANTAGONISTS FOR THE CONTROL OF *Cylindrocladium spathulatum* ON MATE

ABSTRACT

As any other plant, diseases that may cause damage or make its culture unprofitable can affect mate. Leaf spot caused by *Cylindrocladium spathulatum* is the main disease. This work aimed to select antagonists for biological control of this leaf spot. The experiments were carried with resident antagonistic microorganism isolated from (1) infected soils with the pathogen, (2) washed leaves of native mate and, (3) from contamination occurred during leaf spot isolation. Other microorganisms were acquired from Jaguariúna/SP (*Bacillus subtilis* isolates) and Bento Gonçalves/RS (*Trichoderma* isolates). The initial experiment was to select antagonists against *C. spathulatum* in Petri dishes with PDA medium. Afterwards, three bacteria isolates and three *Trichoderma* isolates, that showed higher inhibition on antibiotic production assay and hyperparasitism assay, respectively, were selected. These six isolates were tested on cellophane paper, overlap dishes and spore germination inhibition, and also on detached leaves and seedlings. Results showed that selection of antagonists on seedlings is feasible. The most effective isolate was AP-49 (*B. subtilis*), giving 90 % in reduction of lesions on seedlings. The resident isolates B-1 and B-3 also reduced disease incidence.

KEY WORDS: *Bacillus*, biological control, disease, *Ilex paraguariensis*, *Trichoderma*.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) apresenta grande importância econômica na Região Sul do Brasil e nos países vizinhos, como Argentina e Paraguai. É importante na economia local, com o mercado consumidor se expandindo de forma significativa, tanto por meio do aumento de demanda, como de novos mercados consumidores. No período de 1970 a 1992, o crescimento foi da ordem de 83,59%, na região Sul do Brasil, onde desempenha um importante papel sócio-econômico, cultural e ambiental, principalmente na pequena propriedade agrícola (Rodigheri et al., 1996).

Auer & Grigoletti Júnior (1995), destacaram a mancha da folha (pinta-preta), causada pelo fungo *Cylindrocladium spathulatum* El-Gholl, Kimbrough, Barnard, Alfieri & Schoulties. Esta é a principal doença da cultura, pois causa prejuízos, tanto em viveiros como em plantios no campo; em viveiros, ocorre perda de plântulas e de mudas repicadas.

O controle químico de *C. spathulatum* têm sido utilizado em viveiro, porém no Brasil não existe produto registrado para a cultura. O desenvolvimento de técnicas alternativas de controle (cultural e biológico) para solucionar os problemas causados

por esta doença, é justificável pois, o produto consumido é a folha, tanto em chimarrão, como na forma de chá-mate, que pode ser facilmente contaminado com os pesticidas.

Para o controle biológico de doenças, as chances de obtenção de agentes antagonísticos são maiores, quando os isolamentos são feitos a partir do ambiente onde serão usados. Assim, os originários do filoplano serão os mais adequados a esse ambiente. Entretanto, antagonistas de outros habitats podem ser empregados com sucesso. Vários estudos vêm sendo feitos sobre a seleção e o uso de antagonistas para o controle de doenças em culturas agrícolas (Bettiol & Kimati, 1989), destacando-se as espécies de bactérias do gênero *Bacillus* e de fungos do gênero *Trichoderma* (Bettiol, 1997; Melo, 1991).

Somente dois estudos foram feitos com *Bacillus*, para o controle de doenças florestais, no Brasil. O primeiro testou o antagonismo de um isolado de *Bacillus* sp., obtido da superfície foliar de *Eucalyptus grandis*, contra o patógeno *C. scoparium* (Bettiol et al., 1988). A bactéria apresentou controle similar ao benomyl, demonstrando ser possível a sua utilização e de seus metabólitos. O segundo avaliou o efeito de 24 isolados de *B. subtilis*, antagonísticos a *P. oryzae*, sobre *Puccinia psidii*, agente causal da ferrugem do eucalipto (Santos et al., 1998). Os isolados foram testados *in vitro*, quanto à capacidade de inibição de uredíniosporos do patógeno. Todos os isolados reduziram a germinação dos uredíniosporos, demonstrando que os metabólitos produzidos por *B. subtilis* são termoestáveis e a inibição independe da presença de células vivas. Com relação a *Trichoderma*, pouco se sabe sobre o seu potencial contra doenças florestais.

A necessidade de se obter formas alternativas de controle da pinta-preta da erva-mate estimulou o desenvolvimento deste trabalho, cujo objetivo foi selecionar fungos e bactérias antagonísticos a *C. spathulatum* *in vitro* e *in vivo*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção de isolados do patógeno e antagonistas

O isolado do patógeno *C. spathulatum* utilizado nos ensaios pertence à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas. É um isolado, monospórico obtido de lesões em mudas de erva-mate, Colombo, PR.

O isolamento dos antagonistas foi feito em meio BDA, utilizando-se diferentes procedimentos: (a) peneiramento de solo infestado, proveniente de áreas plantadas com erva-mate e plaqueamento das partículas de matéria orgânica em BDA; (b) lavagem de folhas de erva-mate nativa com água esterilizada e plaqueamento da suspensão em BDA e, (c) purificação de colônias de microrganismos desenvolvidas em isolamento de lesões de pinta-preta, que apresentaram halo de inibição em relação a *C. spathulatum*. A relação de todos os isolados dos antagonistas utilizados estão discriminados na Tabela 1.

TABELA1. Origem procedência dos isolados dos antagonistas.

Antagonista	Identificação	Origem	Procedência
*T-1	Trichoderma sp.	solo	São Mateus do Sul/PR
*T-2	“	“	“
TSS-3	“	-	CNPUV
*T-4	Fungo não identificado	solo	São Mateus do Sul/PR
*T-5	“	“	“
*T-6	“	folhas de erva-mate	Colombo/PR
*T-7	“	“	“
*T-8	“	solo	São Mateus do Sul/PR
TSS-9	Trichoderma sp.	-	CNPUV
*T-10	Fungo não identificado	folhas de erva-mate	Colombo/PR
*T-11	“	“	“
T-12	Trichoderma sp.	-	CNPUV
TSS-13	“	-	“
*T-14	Fungo não identificado	folhas de erva-mate	Colombo/PR
T-15	“	-	CNPUV
T-15E	Trichoderma sp.	-	“
*T-16	Fungo não identificado	folhas de erva-mate	Colombo/PR
T-19	Trichoderma sp.	-	CNPUV
*B-1	Bactéria não identificada	folhas de erva-mate	Ponta-Porã/MS
*B-2	“	“	Colombo/PR
*B-3	“	“	“
*B-4	“	“	“
*B-5	“	“	“
*B-6	“	“	“
*B-8	“	“	“
*B-9	“	“	“
*B-10	“	solo	“
AP-3	Bacillus subtilis	“	CNPMA
AP-49	“	folhas de arroz	“
AP-51	“	“	“

(*) Isolados obtidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas. Os isolados sem asterisco foram cedidos pela Embrapa Meio Ambiente (CNPMA) e Embrapa Uva e Vinho (CNPUV).

Dentre as bactérias testadas, alguns isolados são *Bacillus subtilis* (AP-3, AP-49 e AP-51). As outras bactérias são espécies de *Bacillus* ainda não identificadas, porém devem ser *B. subtilis*. No caso de fungos, os isolados cedidos já haviam sido identificados como pertencentes do gênero *Trichoderma*, porém sem a identificação ao nível de espécies.

2.2. Produção de antibiose entre bactérias antagônicas e *C. spathulatum*

Porções de 200 ml de BD (Batata-Dextrose) foram acondicionadas em frascos de Erlenmeyer, e nestes foram transferidos discos de meio BDA contendo as bactérias, com sete dias de idade. Os frascos permaneceram durante 15 dias, sem agitação, a uma temperatura de $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, na ausência de luz. Após esse período, foram adicionadas 3 g de ágar em cada frasco e estes foram autoclavadas por 20 minutos a 120°C , e o caldo agarizado foi vertido em placas de Petri, de 90 mm de diâmetro. No centro das placas foram colocados discos de cultura do patógeno e estas foram mantidas por 18 dias a uma temperatura de $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e fotofase de 12 h, em câmara de germinação tipo BOD.

A avaliação do potencial de antagonismo foi feita, após o período de incubação, medindo-se os diâmetros das colônias do patógeno, comparando-se com a testemunha, cujo patógeno se desenvolveu em meio BDA. Os três melhores isolados, que apresentaram maior percentual de inibição, foram selecionados para os testes subsequentes.

2.3. Pareamento dos fungos antagônicos a *C. spathulatum*

Para avaliar o antagonismo dos isolados, por meio do hiperparasitismo, foi utilizado o pareamento de culturas em placas de Petri contendo meio BDA. Cada antagonista foi testado em dez repetições. Foram colocados, em cada placa, em um dos lados, um disco de cultura do patógeno e no outro, um disco de cultura do antagonista, ambos a 2,0 cm de distância da borda da placa, em posições opostas. Os discos foram obtidos em culturas puras dos antagonistas, as quais foram incubadas em condições ambiente de laboratório, por 7 dias e, do patógeno, por 30 dias. Após a transferência, as placas foram mantidas em condições de temperatura de $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 h, em câmara de germinação tipo BOD.

O potencial de antagonismo dos isolados foi avaliado três dias após a transferência dos organismos, adaptando-se a metodologia proposta por BELL et al. (1982), que estabelece o grau de antagonismo, por meio da divisão em cinco classes de notas: nota 1 - antagonista cobrindo a totalidade da superfície da placa, nota 2 - antagonista cobrindo ao menos 2/3 da superfície, nota 3 - antagonista cobrindo ao menos 50% da superfície, nota 4 - patógeno cobrindo ao menos 2/3 da superfície e nota 5 - patógeno cobrindo a totalidade da superfície, anulando o antagonista.

Para a análise estatística, as notas foram transformadas em percentagem de colonização, como 100, 75, 50, 25 e zero, para as notas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. No caso da testemunha (patógeno) mediu-se o diâmetro da colônia, na mesma ocasião.

Para os testes subseqüentes foram selecionados três isolados de fungos, que apresentaram maior percentual de hiperparasitismo.

2.4. Avaliação da produção de metabólitos não voláteis pelos antagonistas

O método do papel celofane descrito por Gibbs (1967)¹, citado por Mariano (1993), que consiste na transferência de um disco de crescimento do antagonista para o centro de placas de Petri contendo meio BDA, sobreposto por papel celofane lavado e esterilizado foi utilizado para avaliar a produção de metabólitos voláteis. O teste foi realizado com os isolados de bactérias e de *Trichoderma* selecionados. Após sete dias da transferência do antagonista para a superfície do papel celofane, retirou-se este papel com o crescimento aderente e transferiu-se um disco de meio BDA com o patógeno para o centro da placa. A avaliação foi feita sete dias após a repicagem, medindo-se os diâmetros das colônias do patógeno em contato com os metabólitos produzidos pelos antagonistas, comparando-se com a testemunha. A testemunha consistiu no cultivo do patógeno após a retirada do celofane, sem a prévia sobreposição do antagonista.

2.5. Avaliação da produção de metabólitos voláteis pelos antagonistas

Em uma placa de Petri, contendo BDA, colocou-se um disco de cultura do patógeno e em outra colocou-se um disco de cultura do antagonista. A placa com o patógeno ficou sobreposta à placa com o antagonista e estas foram envolvidas por filme plástico. A incubação ocorreu em condições ambiente de laboratório e a avaliação foi realizada 11 dias após a montagem do experimento, por meio da medição dos diâmetros das colônias do patógeno, comparando-os com a testemunha. No caso da testemunha, sobrepôs-se a placa com o patógeno com uma outra contendo somente o meio BDA (Dick & Hutchinson, 1966², citados por Mariano, 1993).

2.6. Inibição da germinação de conídios de *C. spathulatum*

Dois discos de meio de cultura ágar-água, com diâmetro de 18 mm, foram colocados sobre uma lâmina de microscópio apoiada em suporte de vidro em forma de "V", colocados em placa de Petri. Sobre os discos de meio de cultura colocou-se uma gota da suspensão de conídios do patógeno e, sobre esta, adicionou-se uma gota de suspensão dos antagonistas. Após três horas de incubação, à temperatura ambiente, foi feita a contagem de conídios germinados do patógeno, comparando-se com a testemunha (ausência dos antagonistas).

Com os isolados de bactérias testou-se o caldo nas formas natural (cru) e autoclavado, nas concentrações de 10%; 50% e 100%. O caldo foi obtido cultivando-se as bactérias em meio líquido BD, por 15 dias, a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, no escuro.

Para *Trichoderma spp.* utilizou-se a suspensão de conídios, obtida da lavagem com água esterilizada de colônias cultivadas em placas de Petri, durante sete dias, em condições ambiente de laboratório. Assim, obteve-se as concentrações de $1,6 \times 10^7$; $7,3 \times 10^4$ e $2,2 \times 10^7$ conídios/ml para os isolados T-1, TSS-9 e T-12, respectivamente. Para o patógeno utilizou-se uma suspensão de conídios na concentração de 10^5 conídios/ml. Os esporos foram retirados de colônias cultivadas por 30 dias em

placas com BDA, em condições ambiente de laboratório. A concentração de esporos dos fungos foi determinada em câmara de Neubauer, sob microscópio ótico.

Para determinar o percentual de germinação foram contados 100 conídios do patógeno, que apresentaram ao menos o início da formação do tubo germinativo.

2.7. Potencial dos antagonistas no controle da doença

Neste estudo foram utilizados os três isolados de bactérias e três de *Trichoderma* spp, previamente selecionados nos itens 2.2. e 2.3.

Para a produção dos metabólitos, os discos de cultura das bactérias foram transferidos para meio líquido BD e incubados sob agitação, em condições ambiente de laboratório, durante 15 dias. Para cada isolado de bactéria, o caldo foi utilizado de três diferentes formas: N - produto natural (sem autoclavagem e filtragem); A - produto autoclavado por 20 minutos a 120°C e F - produto filtrado em filtro "millex" (millipore 0,22 mm).

As suspensões de *Trichoderma* spp. foram obtidas por meio da lavagem com água esterilizada de colônias cultivadas em placas de Petri com BDA, durante sete dias, em condições ambiente de laboratório.

A inoculação do patógeno foi feita com uma suspensão de conídios, obtida por meio da lavagem com água esterilizada de colônias cultivadas em placas de Petri com BDA, durante trinta dias, em condições de laboratório. A concentração de conídios da suspensão esteve ao redor de 10^5 conídios/ml, similar aos estudos de patogenicidade deste fungo em *Ilex* e *Eucalyptus* feitos por Lau & Grigoletti Junior (1997).

2.7.1. Teste com os antagonistas em folhas destacadas

O teste foi realizado em cinco caixas gerbox, previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio a 0,6% de cloro ativo, com duas folhas de papel filtro umedecido em água esterilizada, em cada caixa. Sobre as folhas de papel de filtro, colocaram-se duas folhas maduras de erva-mate, com o pecíolo envolvido por algodão umedecido com água esterilizada, coletadas da altura intermediária das mudas produzidas em casa-de-vegetação. Foram estabelecidas dez repetições por tratamento.

As suspensões de *Trichoderma* spp. foram pulverizadas em concentrações de $6,4 \times 10^6$; $3,6 \times 10^7$ e $3,0 \times 10^7$ conídios/ml, dos isolados T-1, TSS-9 e T-12, respectivamente. Para os isolados de bactérias, as concentrações utilizadas oscilaram entre $2,0$ e $3,1 \times 10^9$ células/ml. As pulverizações foram feitas na face abaxial das folhas de erva-mate e, 24 horas após, pulverizou-se o patógeno, por meio de uma suspensão de $3,9 \times 10^5$ conídios/ml. A testemunha consistiu na pulverização apenas com água esterilizada.

As folhas permaneceram em ambiente de laboratório por onze dias, quando fez-se a avaliação do experimento, quantificando-se o número de folhas com lesão.

2.7.2. Teste com os antagonistas em mudas

Para este teste foram utilizadas dez mudas por tratamento, produzidas em sacos plásticos de 7,5 x 15 cm, com substrato solo-adubo, com cerca de seis meses de idade. As mudas foram cultivadas em casa-de-vegetação, apresentando-se em bom estado fitossanitário, vigorosas e uniformes em altura e número de folhas, que foram distribuídas em caixas plásticas (55 x 35 x 26 cm). Uma camada aproximada de 10 cm de serragem de madeira, umedecida foi colocada no fundo das caixas para separá-las, mantê-las em posição vertical e para facilitar a formação da câmara úmida. As caixas permaneceram encobertas com plásticos formando a câmara úmida, durante o período de incubação, em casa de vegetação sem controle de temperatura.

A concentração da suspensão de conídios do patógeno, de *Trichoderma* e de células das bactérias e o modo de aplicação, foram os mesmos utilizados no item 2.7.1. Decorridas 24 horas da aplicação dos antagonistas, as mudas foram inoculadas com suspensão de conídios do patógeno contendo $3,9 \times 10^5$ conídios/ml. Entretanto, decorridos dez dias da inoculação, não foram observadas lesões nas mudas. Possivelmente, as altas temperaturas e a baixa umidade criaram condições inadequadas para a germinação dos conídios do patógeno. Desse modo, fez-se nova inoculação do patógeno dez dias após a 1ª inoculação, a qual mostrou-se eficiente, pela incidência observada nas testemunhas (90 %).

A avaliação final do experimento foi feita oito dias após a inoculação do patógeno, quantificando-se o número de folhas com lesão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias produzidas pelas bactérias no caldo de cultivo, inibiram significativamente o crescimento micelial de *C. spathulatum*. Os maiores percentuais de inibição foram promovidos pelos isolados B-1, AP-49 e B-3 (Tabela 2). Outros isolados estimularam o patógeno, como foi o caso de B-6, B-8 e B-9. Estas substâncias também impediram a germinação de conídios do patógeno, notadamente as produzidas por AP-49. A inibição foi maior nas concentrações de caldo de 50 e 100 %, independente do isolado testado (Tabela 3). O caldo natural (sem autoclavagem) causou maior inibição na germinação de conídios. Santo et al. (1998), testando *B. subtilis* contra *Puccinia psidii*, também verificaram inibição de germinação de uredíniosporos, tanto em caldo natural como autoclavado, considerando a termoestabilidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis*, independente da presença de células vivas.

TABELA 2. Inibição do crescimento micelial de *Cylindrocladium spathulatum* por bactérias antagonicas.

Isolado antagonico	Diâmetro da colônia (mm)	Inibição em relação à testemunha (%)
B-6	90,0 a*	-
B-8	90,0 a	-
B-9	90,0 a	-
Testemunha	82,2 b	-
AP-3	48,5 c	41,0
B-4	43,6 d	47,0
B-10	41,6 d	49,4
B-5	41,3 de	49,8
B-2	40,9 de	50,2
AP-51	40,4 de	50,9
B-3	40,3 de	51,0
AP-49	37,2 e	54,7
B-1	17,8 f	78,3

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Coeficiente de variação = 5,71%.

Os fungos não inibiram a germinação de *C. spathulatum* (Tabela 3), apesar do parasitismo de *Trichoderma* sobre o patógeno (Tabela 4). Os maiores percentuais de parasitismo ocorreram com os isolados TSS-9 e T-12. Por este motivo, estes fungos foram selecionados para os outros testes, juntamente com o isolado T-1, este último obtido da rizosfera de erva-mate.

TABELA 3. Inibição da germinação de conídios (%) de *Cylindrocladium spathulatum* por bactérias antagonicas e *Trichoderma*.

Bactérias/concentração	Germinação (%)	Inibição (%)
Testemunha	93,58 a*	-
B-1N 10%	55,05 ab	41,2
B-1N 50%	9,91 bc	89,4
B-1N 100%	9,10 c	90,3
B-1A 10%.	16,99 bc	81,8
B-1A 50%.	6,69 c	92,9
B-1A 100%	6,97 c	92,6
B-3N 10%	18,99 bc	79,7
B-3N 50%	6,41 c	93,2
B-3N 100%	6,00 c	93,6
B-3A 10%	14,54 bc	84,5
B-3A 50%	2,92 c	96,9
B-3A 100%	8,77 c	90,6
AP-49N-10%	12,19 bc	87,0
AP-49N 50%	2,00 c	97,9
AP-49N 100%	3,74 c	96,0
AP-49A 10%	35,14 bc	62,4
AP-49A 50%	19,38 bc	79,3
AP-49A 100%	12,93 bc	86,2
Fungos	Germinação (%)	Inibição (%)
T-12	99,63 a*	-
Testemunha	98,54 a	-
TSS-9	98,25 a	0,3
T-1	97,77 a	0,8

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).

CV bactérias = 32,2%. CV fungos = 6,8%

N - caldo natural (não autoclavado), A - caldo autoclavado

% - concentração do caldo em relação à concentração original

Os metabólitos voláteis e não voláteis produziram efeitos diferentes (Tabela 5). Os metabólitos não voláteis não inibiram e até estimularam significativamente o crescimento do patógeno (Tabela 5). Os metabólitos voláteis inibiram o crescimento micelial, principalmente AP-49, B-3 e B-1, a exemplo do observado na Tabela 2.

TABELA 4. Parasitismo de *Cylindrocladium spathulatum* por *Trichoderma* spp.

Isolado	Colonização em relação à testemunha(%)
TSS-9	97,55 a*
T-12	97,55 a
T-4	81,47 b
TSS-3	75,00 bc
T-6	75,00 bc
T-19	75,00 bc
TSS-13	75,00 bc
T-14	75,00 bc
T-15	75,00 bc
T-15E	75,00 bc
T-1	67,92 bc d
T-7	61,53 c d
T-2	60,40 c d
T-8	50,00 d
T-5	50,00 d
T-10	50,00 d
T-11	50,00 d
T-16	25,00 e

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Coeficiente de variação = 13,94%.

TABELA 5. Efeito de metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por antagonistas sobre o crescimento micelial de *Cylindrocladium spathulatum*

Isolado	Voláteis		Não voláteis	
	Diâmetro da colônia (mm)	Inibição (%)	Diâmetro da colônia (mm)	Inibição (%)
Testemunha	72,5 a*	-	39,00 bcd*	-
T-12	16,8 b	76,8	37,00 d	5,1
TSS-9	13,4 bc	81,5	38,00 cd	2,6
T-1	13,4 bc	81,5	40,00 abcd	-
B-1	9,9 c	86,3	42,62 a	-
B-3	9,8 c	86,5	41,25 ab	-
AP-49	9,3 c	87,2	41,00 abc	-

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).
CV metabólitos voláteis = 21,2%; metabólitos não voláteis = 4,3%

Alguns comentários podem ser feitos acerca dos testes in vitro. Pode-se afirmar que o método mais eficiente e prático para avaliar o grau de antagonismo, seria o método de inibição da germinação de conídios. Este método é adequado, quando a incidência da doença está diretamente relacionada à germinação dos conídios no filoplano. Como exemplo, *B. subtilis* inibiu a germinação de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix* (Bettiol & Varzea, 1992) e de *Uromyces phaseoli* (Baker et al. 1983), controlando as ferrugens em casa-de-vegetação.

No teste com folhas destacadas, os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se o caldo natural, em relação ao caldo autoclavado e caldo filtrado (Tabela 6). Ocorreu perda da eficiência quando se filtra ou se esteriliza o caldo natural. Assim, o caldo natural foi adequado para o controle, em folhas destacadas.

TABELA 6. Efeito de antagonistas sobre a incidência de manchas foliares causadas por *Cylindrocladium spathulatum* em folhas de erva-mate.

Antagonista*	Incidência (%)	Antagonista*	Incidência (%)
	Folhas destacadas		Mudas
B-1 ^A	100	Testemunha	90
Testemunha	90	B-3F	80
AP-49F	90	T-1	70
T-1	90	T-SS9	60
B-3 ^A	80	B-1A	50
T-12	80	B-3A	50
T-SS9	80	B-1F	50
B-1F	70	T-12	20
B-3N	70	B-3N	20
AP-49 ^A	70	AP-49A	20
B-1N	50	AP-49F	10
B-3F	50	B-1N	10
AP-49N	40	AP-49N	10

*N - caldo natural (não autoclavado), A - caldo autoclavado, F - caldo filtrado.

Quanto aos isolados de *Trichoderma* não houve controle, em folhas destacadas. Provavelmente, o hiperparasita não impediu a germinação de conídios de *C. spathulatum* (Tabela 3), apesar do grau de hiperparasitismo verificado (Tabela 4). Um dos mecanismos para se evitar a doença é a inibição da germinação de esporos (Melo, 1996), porém como os conídios germinaram nas folhas, houve a colonização e a formação de lesões. Os resultados estão em concordância com os trabalhos de Michereff et al. (1993a e b), que relataram a inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola in vitro* por *Trichoderma*, mas não houve controle da doença em plantas de sorgo, em casa-de-vegetação.

No teste em mudas, AP-49 foi o mais efetivo no controle da pinta-preta, reduzindo a incidência entre 80 e 90 % (Tabela 6), apesar de ter sido obtido de filosfera de arroz. Os isolados obtidos de erva-mate (B-1 e B-3) foram tão eficientes, dependendo da forma de preparo do caldo cultivado. Assim, existe a possibilidade de outros isolados bacterianos, obtidos da filosfera de erva-mate possam ser mais eficientes do que AP-49. Quanto aos fungos, o resultado foi melhor do que o verificado em folha destacada e somente T-12 controlou a doença em mudas, similar ao das bactérias.

O teste em folhas destacadas é mais prático, rápido e econômico (menor gasto com reagentes e equipamentos), porém não foi adequado para selecionar os antagonistas. O efeito destes sobre *C. spathulatum* pôde ser melhor avaliado em

mudas, do que em folhas destacadas (Tabela 6). Houveram situações em que se formaram lesões em folhas destacadas e ausência nas mudas e vice-versa. Possivelmente, alguns dos isolados foram incapazes de permanecer na filosfera das mudas e produzir antibióticos sob as condições da casa-de-vegetação (Baker et al., 1983).

O trabalho desenvolvido buscou encontrar agentes de controle biológico contra *C. spathulatum*, patógeno importante em mudas de erva-mate. Os resultados demonstraram a potencialidade do controle biológico da pinta-preta, em viveiros. Segundo Bettiol (1991), é recomendada a complementação com testes de campo (viveiro) para confirmar a competência de um dado antagonista.

4. CONCLUSÕES

- 1) Os isolados de bactérias foram mais antagônicos a *Cylindrocladium spathulatum* que os de *Trichoderma*.
- 2) O isolados AP-49, B-1 e B-3 foram os mais eficazes, para controle da pinta-preta em erva-mate.
- 3) A seleção de antagonistas para o controle da doença é viável em mudas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças da erva-mate. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.21, n.3-4, p.195-198, 1995.

BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology*, Saint Paul, v.73, n.8, p.1148-1152, 1983.

BELL D.K.; WELLS H.D.; MARKHAM C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, Saint Paul, v.72, n. 4, p.379-382, 1982.

BETTIOI, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOI, W. *Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.223-236.

BETTIOI, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas . *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.5, p.59-97, 1997.

BETTIOI, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagônicos à *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.15, n.3-4, p.257-266, 1989.

BETTIOI, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.25, n.8, p.1165-1174, 1990.

BETTIOL, W.; VARZEA, V.M.P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p.91-95, 1992.

BETTIOL, W.; AUER, C.G; CAMARGO, L.E.A.; KIMATI, H. Controle da mancha foliar de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* induzida por *Cylindrocladium scoparium* com *Bacillus* sp. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna. v.14, n.3-4, p.210-218, 1988.

LAU, D.; GRIGOLETTI JUNIOR A. Patogenicidade de *Cylindrocladium spathulatum* em espécies de *Ilex* e *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v.22., Supl., p.274, 1997.

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

MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.135-56.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 4, p.261-295, 1996.

MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M. & MARIANO, R. L. R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.19, p.14-17, 1993a.

MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Potencial de *Trichoderma* spp. para o controle da antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.392-398, 1993b.

RODIGHERI, H.R.; SCHLOSSNACHER NETO, L.; CICHACZEWSKI, I.F. **Custos, produtividade e renda de erva-mate cultivada na região de Guarapuava, PR.**, Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1996. 22p. (EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica, 24).

SANTOS, C.F.C., CASTRO, H.A., BETTIOL, W.; ANGELI JÚNIOR, A. Sensibilidade *in vitro* de urediniosporos de *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**. Jaboticabal, v.24, n.2 p.183-185, 1998.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Rosa Maria V. Sanhueza da Embrapa Uva e Vinho, e ao Dr. Wagner Bettiol, da Embrapa Meio Ambiente, pelo fornecimento de alguns isolados de Trichoderma e de Bacillus, utilizados como antagonistas.