

SCIENTIA AGRICOLA

Cont. ANAIS DA ESALQ e
ENERGIA NUCLEAR E AGRICULTURA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"
ESALQ/CENA

PIRACICABA, SÃO PAULO, BRASIL

ANTAGONISMO IN VITRO DE *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB¹

M.P. MARTINS-CORDER^{1,2}; J.S. de MELO³

²Depto. Ciências Florestais/CCR/UFSM, CEP: 97119-900 - Santa Maria, RS.

³CNPMA/EMBRAPA, C.P. 69, CEP: 13820-000 - Jaguariuna, SP.

RESUMO: O presente trabalho visou testar e selecionar isolados selvagens de *Trichoderma* spp. quanto à capacidade antagonista ao fungo fitopatogênico *Verticillium dahliae*. Os ensaios *in vitro* consistiram de testes para avaliar a capacidade hiperparasítica e de antibiose através da produção de metabólitos voláteis e não voláteis. Pela técnica de culturas pareadas, 47 isolados de diversas espécies de *Trichoderma* foram avaliados e, pelos resultados obtidos, 20 foram selecionados. Através do teste de antibiose, selecionaram-se 7 isolados: T15P e Tal-1 (*T. viride*), TW6 e CNP311A (*T. koningii*), CNP17 e TCII (*T. harzianum*) e Tal-10 (*T. aureoviride*) os quais inibiram completamente o crescimento micelial de *V. dahliae* através da produção de metabólitos. Observações microscópicas demonstraram interações de hifas entre *Trichoderma* sp. e *V. dahliae*, tais como: enrolamento, crescimento paralelo de ambos, formação de ganchos.

Descritores: biocontrole, parasitismo, antagonismo, *Trichoderma*, *Verticillium*

IN VITRO ANTAGONISM OF *Trichoderma* spp. AGAINST *Verticillium dahliae* KLEB

ABSTRACT: This work was carried out to test and to select wild strains of *Trichoderma* spp. with antagonistic ability against *Verticillium dahliae*. The *in vitro* assay consisted of the antibiosis technique by assessment of volatile and non-volatile metabolites and hyphal interaction. Forty seven *Trichoderma* strains were evaluated and twenty strains were selected by their antagonistic ability against *V. dahliae*. Through the antibiosis test, seven strains of different species T15P and Tal-1 (*T. viride*); TW6 and CNP311A (*T. koningii*); CNP17 and TCII (*T. harzianum*) and Tal-10 (*T. aureoviride*) inhibited the mycelial growth of *V. dahliae* due to the production of metabolites. Several kinds of hyphal interference were observed such as coiling and hook formation.

Key Words: biocontrol, parasitism, *Trichoderma*, *Verticillium*, antagonism

INTRODUÇÃO

Espécies de *Trichoderma* são consideradas eficientes antagonistas contra uma série de fungos fitopatogênicos, atuando tanto pela produção de metabólitos voláteis como de não voláteis (Claydon et al., 1987; Camporota, 1985; Rai et al., 1980; Dennis & Webster, 1971a, b) como também pelo hiperparasitismo (Papavizas, 1985; Barak et al., 1985; Vajna, 1985 a, b; Chet & Elad, 1983; Dennis & Webster, 1971c; Barnett, 1963) e pela competição por nutrientes, espaço e oxigênio (Chet & Elad, 1983).

A produção de metabólitos tóxicos por espécies de *Trichoderma* foi primeiramente observada por Weindling (1934), que determinou haver difusão do princípio letal em hifas jovens.

As espécies de *Trichoderma* também produzem exoglucanases e endoglucanases, celobiase e quitinase, que são enzimas importantes na degradação e na lise da parede celular de fungos fitopatogênicos (Ridout et al., 1988; Papavizas, 1985; Elad et al., 1982). Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente durante o processo de vida do antagonista. A capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie.

É importante conhecer antes de lançar mão de estratégias para aumentar a efetividade desses agentes quais são as características passíveis de serem manipuladas para tornar o biocontrole viável. De acordo com Kemerly & Stack (1987), as principais características para iniciar um programa de

¹Parte da Dissertação do primeiro autor apresentado à ESALQ/USP.

melhoramento genético, através da obtenção de novas linhagens de *Trichoderma* spp. são: capacidade de sobrevivência no solo, produção de metabólitos tóxicos, resistência a temperaturas extremas e estabilidade metabólica. Visando o controle integrado, vários estudos têm sido realizados no sentido de produzir novos biótipos de *Trichoderma* spp. resistentes a diversos fungicidas (Cassiolato, 1995; Peterbauer et al., 1992; Melo & Silva, 1991, Gullino & Garibaldi, 1988).

A murcha verticilar causada por *V. dahliae* tem causado severos danos à cultura de berinjela (*Solanum melongena*). Diversas medidas fitossanitárias são tomadas, sem grandes êxitos, pois o patógeno pode persistir no solo durante muitos anos na forma de microesclerócios. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo selecionar isolados de *Trichoderma* spp. quanto à sua capacidade de produzir metabólitos tóxicos, competir e hiperparasitar *V. dahliae* "in vitro", para posteriormente, serem empregados em testes de casa de vegetação e de campo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Teste de antagonismo em confrontação direta: 47 isolados de *Trichoderma* spp. foram testados contra *V. dahliae*. Discos de ágar contendo micélio e conídios de *V. dahliae* foram colocados em placas de Petri (90 mm), contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da borda. As culturas foram incubadas por 10 dias, em temperatura ambiente, na ausência de luz. A seguir, fez-se a repicagem de *Trichoderma* spp. nas placas de Petri, em posição oposta à colônia do patógeno. As colônias foram incubadas durante 5 dias, em temperatura ambiente e em fotoperíodo de 12 horas. Nas avaliações, utilizou-se o critério de Bell et al. (1982) através de escala de notas com valores de 1 a 5. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento.

Os 20 isolados de *Trichoderma* spp. selecionados, foram classificados taxonomicamente no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, sendo: Tal-1 e T15P (*T. viride* Pers. ex. S.T. Gray); Tal-4, Tal-6, Tal-9, Tal-10, TW16, TH15, T410 e T218 (*T. gureoviride* Rifai); TW6 e CNP311A (*T. koningii* Oud); TW14, TV, TISE, TIV e T10P (*T. pseudokoningii*); CNP17, TCII e TWS (*T. harzianum*). Novamente, esses 20 isolados de *Trichoderma* foram testados contra outros isolados de *V. dahliae* (IM₁, IM₂ e IM₃,

procedentes de Piracicaba SP, Campinas SP e Betim MG, respectivamente) os quais tiveram como hospedeiro comum, a cultura de berinjela. Neste caso, substituiu-se o meio de BDA pelo meio de extrato de malte-ágar, pH 6,0 e o critério de avaliação, pela porcentagem de colonização (%C), seguiu o recomendado por Camporota (1985), em que: %C = DT/DE100, sendo DT, o raio de crescimento da colônia de *Trichoderma* spp. em direção frontal à colônia de *V. dahliae* e DE, a distância que separa as duas colônias.

Teste de antibiose: o método consistiu em cobrir assepticamente toda a superfície do meio de extrato de malte-ágar (pH 6,5), com discos de papel celofane (9,0 cm de diâmetro). A seguir, discos de ágar contendo micélio mais conídios de *Trichoderma* spp. foram colocados no centro, sobre a superfície do papel celofane (Dennis & Webster, 1971a). Os isolados de *Trichoderma* spp. foram os mesmos selecionados no teste descrito anteriormente. As colônias foram incubadas por 48 horas à temperatura ambiente, sob luz contínua. Tomou-se as medidas de diâmetro médio da colônia de *Trichoderma* spp. e finalmente, retirou-se o papel celofane (juntamente com a colônia de *Trichoderma* spp.). As placas foram invertidas e adicionaram-se aproximadamente 30 ml de clorofórmio na sua parte inferior, a fim de eliminar resíduos estruturais de *Trichoderma*. Após a evaporação do produto, voltou-se à posição original das placas de Petri. A seguir, fez-se a semeadura através da adição de 0,12 ml da suspensão contendo estruturas de *V. dahliae* sobre o meio, espalhando uniformemente o inóculo com auxílio da alça de Drigalsk. As placas foram incubadas a 25 C, na ausência de luz. A suspensão contendo estruturas de *V. dahliae* foi obtida de colônias crescendo em meio de aveia-ágar, durante 12 dias, a 26 C.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento. Tomou-se o diâmetro médio do halo de inibição formado por *Trichoderma* spp., após 3 dias de incubação, através do crescimento de *V. dahliae*.

Teste de avaliação do efeito de metabólitos voláteis: o método baseado em Bharat et al. (1980), consistiu em posicionar tampas de placas de Petri umas sobre as outras, após ter vertido meio de extrato de malte-ágar em cada uma delas. Na extremidade inferior da placa, semeou-se o antagonista e na superior, o patógeno, ambos na

forma de discos de ágar (1 cm) contendo micélio e conídios. Lateralmente, vedaram-se as tampas com membrana plástica e em seguida, incubou-se o material em temperatura ambiente, por 7 dias, sob luz fluorescente contínua. Utilizaram-se os seguintes isolados: Tal-1 e T15P (*T. viride*); TW6 e CNP311A (*T. koningii*); e IM₁ (*V. dahliae*). O delineamento inteiramente casualizado teve 4 repetições por tratamento. A testemunha recebeu apenas *V. dahliae* tanto na parte superior como na parte inferior da placa de Petri.

Estudos sobre a interação de hifas: empregou-se a mesma metodologia descrita anteriormente, no teste de antagonismo em confrontação direta, com exceção apenas que, neste teste, posicionou-se previamente, uma lamínula esterilizada entre as duas colônias opostas. Para as observações microscópicas, efetuou-se a montagem de lâminas após a adição de uma gota do corante Azul de

Bromofenol sobre a lamínula contendo estruturas dos dois fungos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 47 isolados de *Trichoderma* spp., foram selecionados 20 isolados que receberam nota 1 e alguns outros que receberam nota 2 (TABELA 1). Constatou-se que a maioria dos antagonistas colonizou e produziu esporos em abundância sobre as colônias de *V. dahliae*. Boosalis (1964) relata que a intensa esporulação pode ocorrer quando determinados hospedeiros estimulam a reprodução de seus parasitas.

Os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados e re-avaliados no teste de antagonismo em confrontação direta mostraram uma estreita magnitude de variação e poucos tratamentos apresentaram diferenças estatísticas pelo teste de

TABELA 1 - Classificação de isolados de *Trichoderma* spp. pelo teste de antagonismo em confrontação direta, em meio de BDA.

Isolado de <i>Trichoderma</i>	Procedência	Nota ^{1/}	Isolado de <i>Trichoderma</i>	Procedência	Nota ^{1/}
TW16*	CNPSO/EMBRAPA	1	T362	Piracicaba, SP	2
TW11	CNPSO/EMBRAPA	2	T410*	Piracicaba, SP	2
TW6*	CNPSO/EMBRAPA	1	T10P*	UFP-Recife, PE	2
TCII*	CNPSO/EMBRAPA	1	TW14*	CNPSO/EMBRAPA	1
MII	Desconhecida	2	TAP-1	Piracicaba, SP	3
CNP17*	CNPSO/EMBRAPA	1	CNP424	CNPSO/EMBRAPA	2
TW8	CNPSO/EMBRAPA	2	Tal-6*	Mogi das Cruzes, SP	2
TISE*	Desconhecida	1	T17P	Desconhecida	2
IG-9	Piracicaba, SP	3	T329	Piracicaba, SP	2
TW10	CNPSO/EMBRAPA	2	TC	Desconhecida	3
CNP311A*	CNPSO/EMBRAPA	1	TH15*	Desconhecida	1
CNP47	CNPSO/EMBRAPA	2	Tal-9*	Mogi das Cruzes, SP	1
T15P*	UFP-Recife, PE	1	D-1	Anhembi, SP	2
TRIP	Desconhecida	2	Ti	Desconhecida	2
T32	Piracicaba, SP	2	Tal-1*	Mogi das Cruzes, SP	1
T2P	UFP - Recife, PE	2	Tal-8	Mogi das Cruzes, SP	3
Tal-5	Mogi das Cruzes, SP	2	TAP-2	Piracicaba, SP	3
H-1	Piracicaba, SP	3	TBIII	Desconhecida	3
T218*	Piracicaba, SP	1	TBII	Desconhecida	2
FY413	Mutante	3	TIV*	Desconhecida	1
Tal-3	Mogi das Cruzes, SP	2	TV*	Desconhecida	1
D-7	Anhembi, SP	2	TVII	Desconhecida	3
Tal-10*	Mogi das Cruzes, SP	1	Tal-4*	Mogi das Cruzes, SP	1
TW5*	CNPSO/EMBRAPA	1			

^{1/} Valores médios de notas, em 3 repetições, conforme Bell et al. (1982).

* Isolados de *Trichoderma* spp. selecionados.

Tukey a 5% de probabilidade (TABELA 2). Esses resultados mostraram que houve uma redução na variabilidade para a característica em estudo, com a seleção feita no primeiro ensaio.

Pelo teste de antibiose foi possível quantificar a produção de metabólitos de *Trichoderma* spp. (TABELA 3). Os isolados que apresentaram os melhores resultados foram: T15P, Tal-1, TW6, CNP311A, CNP17, TCII e Tal-10. Com exceção do TW6, os demais isolados selecionados através do teste de antibiose, produziram metabólitos que não permitiram mais o crescimento de *V. dahliae* no meio. O T15P apresentou melhor resposta quanto à produção de metabólitos, visto que sua colônia, ao atingir cerca de 4,0 cm, mostrava inibição completa do crescimento de *V. dahliae*. O TW6 apesar de colonizar rapidamente o substrato, foi o isolado que apresentou maior instabilidade metabólica, pois verificou-se que, apesar de apresentar halo de inibição superior à média,

constatou-se que após algumas horas houve, a retomada de crescimento de *V. dahliae*. Os outros isolados testados que apresentaram diâmetro médio de colônia acima da média mostraram pouca capacidade para produzirem metabólitos, através do halo de inibição.

Empregou-se como critério de seleção o potencial para produção de metabólitos, a velocidade para colonizar o substrato e o fato de ter pelo menos dois isolados da mesma espécie. Apesar dos antibióticos apresentarem grande importância no antagonismo, a competição é um mecanismo essencial em condições naturais.

Para o teste de produção de metabólitos voláteis, verificou-se que os 4 isolados selecionados (T15P, Tal-1, TW6 e CNP311A) apresentaram diferenças significativa em relação ao controle, apesar de não diferirem entre si, pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (TABELA 4). Verificou-se que as colônias de *V. dahliae* tornaram-se

TABELA 2 - Teste de antagonismo de isolados selecionados de *Trichoderma* spp. em confrontação direta, em meio de malte-agar.

Isolado de <i>Trichoderma</i> spp.	Porcentagem média de colonização Isolados de <i>Verticillium dahliae</i>		
	IM ₁	IM ₂	IM ₃
TW16	100,0 a	100,00 a	74,7 bc
Tal-6	94,4 ab	99,2 a	80,6 ab
Tal-4	93,3 abc	96,3 a	69,5 bcd
Tal-1	89,5 abc	57,4 c	69,3 bcd
Tal-10	82,7 abc	91,5 abc	78,0 ab
TISE	72,7 abc	61,7 bc	69,8 bcd
Tal-9	80,5 abc	91,1 abc	82,0 ab
T410	80,0 abc	87,1 abc	81,5 ab
TH-15	79,4 abc	77,4 abc	77,6 bc
TV	79,4 abc	76,7 abc	87,5 ab
TW6	76,7 abc	94,1 abc	80,0 ab
T10P	75,7 abc	60,7 abc	60,5 cd
T15P	74,5 abc	84,2 abc	79,2 ab
CNP17	74,4 abc	84,3 abc	53,3 d
T218	73,8 abc	86,9 abc	78,0 ab
TW5	73,6 abc	83,3 abc	82,3 ab
TCII	72,7 abc	83,3 abc	98,7 a
CNP311A	64,3 bc	65,5 abc	75,6 bc
TW14	61,3 c	85,2 abc	71,4 bc

¹Valores originais médios de porcentagem de colonização de *Trichoderma* spp., conforme metodologia proposta por Camporota (1985).

Nas colunas, letras iguais indicam que os contrastes de médias não foram significativos, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (D.M.S. = 1,728; D.M.S. = 2,112 e D.M.S. = 1,054, respectivamente).

Para as análises estatísticas os dados foram transformados em \sqrt{x} .

Tabela 3 - Teste de antibiose (metabólitos não voláteis) de *Trichoderma* spp. e *Verticillium dahliae*.

Isolado de <i>Trichoderma</i> spp.	Testador IM ₁		Testador IM ₂		Testador IM ₃	
	Colônia (cm)	Halo (cm)	Colônia (cm)	Halo (cm)	Colônia (cm)	Halo (cm)
TI5P	4,9 j	9,0 a	5,8 g	9,0 a	4,4 gh	9,0 a
CNP17	7,2 bc	7,0 ab	7,0 cde	6,3 bc	5,6 def	4,0 efg
TW6	9,0 a	7,0 ab	9,0 a	6,8 b	8,5 a	7,0 b
TCII	6,9 bc	5,7 bc	7,5 bc	5,8 bcde	6,3 cde	5,2 de
Tal-6	7,0 bc	4,6 bcd	7,9 bc	5,4 bcdef	6,9 bc	4,9 def
T410	6,7 bcdef	4,5 bcde	7,3 c	5,7 bcde	6,9 bc	5,2 de
CNP311A	6,6 bcdefg	4,5 bcde	7,3 c	6,8 b	7,7 ab	7,3 ab
Tal-1	5,9 efgh	4,5 bcde	6,0 fg	6,7 bc	6,2 cde	6,5 bcd
Tal-10	7,0 bc	4,4 bcde	7,4 c	6,0 bcd	7,7 ab	5,8 bcde
T218	7,2 bc	3,9 cde	8,5 a	4,7 defg	6,9 bc	5,5 cde
TV	6,0 bcdefg	3,9 cde	6,2 defg	5,2 cdefg	5,6 def	4,1 efg
TW14	5,7 ghi	3,2 cde	6,0 fg	5,2 efghi	4,6 fgh	3,4 fgh
TH15	6,7 bcdef	3,1 cde	7,0 def	4,4 efghi	6,4 cde	4,8 def
TISE	6,8 bcde	2,5 def	6,9 def	3,2 hi	6,4 cde	4,1 efg
TW16	6,9 bcd	2,4 def	6,9 def	3,0 i	6,9 bc	4,9 defg
Tal-4	6,3 bcdefg	1,9 def	7,1 bc	4,4 efghi	6,6 bcd	5,1 def
OP	5,3 hi	1,7 def	5,5 g	3,4 hi	4,2 h	2,7 gh
Tal-9	7,2 b	1,6 def	7,6 bc	3,7 ghi	7,1 bc	5,1 def
TW5	5,9 defg	1,5 ef	7,3 c	4,0 fghi	6,4 cde	4,6 ef
TIV	5,7 fghi	0,0 f	7,0 cde	0,8 j	5,3 efg	1,7 h

Nas colunas, as letras iguais indicam contrastes de médias não significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (D.M.S. = 0,92; D.M.S. = 3,01; D.M.S. = 1,02; D.M.S. = 1,52; D.M.S. = 1,13; D.M.S. = 2,06, respectivamente).

Valores médios em 3 repetições utilizando 3 isolados de *V. dahliae* (Testadores IM₁, IM₂ e IM₃).

Dados originais de diâmetro médio de colônia e de halo de inibição de isolados de *Trichoderma* spp..

frequentemente reduzidas na presença de *Trichoderma* spp.. De acordo com Dennis & Webster (1971 b), *T. viride* e *T. koningii* são eficientes produtores de metabólitos voláteis em meio de cultura. Esses autores explicam que os antibióticos voláteis atuam sobre os fungos suscetíveis através da inibição do crescimento micelial e que isolados com capacidade para produzirem substâncias não voláteis nem sempre produzem substâncias voláteis. Os antagonistas selecionados no presente estudo são produtores tanto de metabólitos voláteis como de metabólitos não voláteis.

Através dos estudos de interação de hifas de *Trichoderma* spp. e *V. dahliae*, verificaram-se várias formas típicas de parasitismo (Figura 1). Crescimento paralelo das hifas de ambos os fungos (Figura 1a), formação de estruturas semelhantes a ganchos, que cresciam em direção aos feixes de hifas do hospedeiro (Figura 1b,c,d), enrolamentos de hifas do antagonista sobre o patógeno (Figura

1e,f) e intensiva fragmentação de hifas do hospedeiro ocorreu frequentemente.

No presente estudo, verificou-se que os isolados de *T. viride* e *T. koningii* selecionados através da antibiose, competição por substrato e hiperparasitismo, mostraram ampla potencialidade para antagonizar *V. dahliae* "in vitro". Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente ao longo do processo de vida do antagonista os quais se sobrepõem e prejudicam o desenvolvimento dos competidores. *Trichoderma* spp. causaram a degradação das hifas hospedeiras através da secreção de metabólitos tóxicos inibindo o desenvolvimento de *V. dahliae*. Quando se estabeleceu o contato íntimo entre as hifas, o antagonista enrolou-se no hospedeiro, formando estruturas semelhantes a ganchos, causando a destruição da parede celular, provavelmente para obter nutrientes a partir das células mortas. Adicionalmente, o crescimento de *Trichoderma* spp. foi bastante agressivo, conferindo a esses

TABELA 4 - Teste de antibiose (metabólitos voláteis) de *Trichoderma* spp. e *Verticillium dahliae*.

Isolado de <i>Trichoderma</i> spp.	Diâmetro médio colônia de <i>V. dahliae</i> (cm)
Testemunha (<i>V. dahliae</i>)	2,70 a
<i>T. koningii</i> - CNP311A	1,53 b
<i>T. koningii</i> - TW6	1,50 b
<i>T. viride</i> - Tal-1	1,48 b
<i>T. viride</i> - T15P	1,45 b

Médias de 4 repetições. Letras iguais indicam que os contrastes não foram significativos pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (D.M.S. = 0,779).

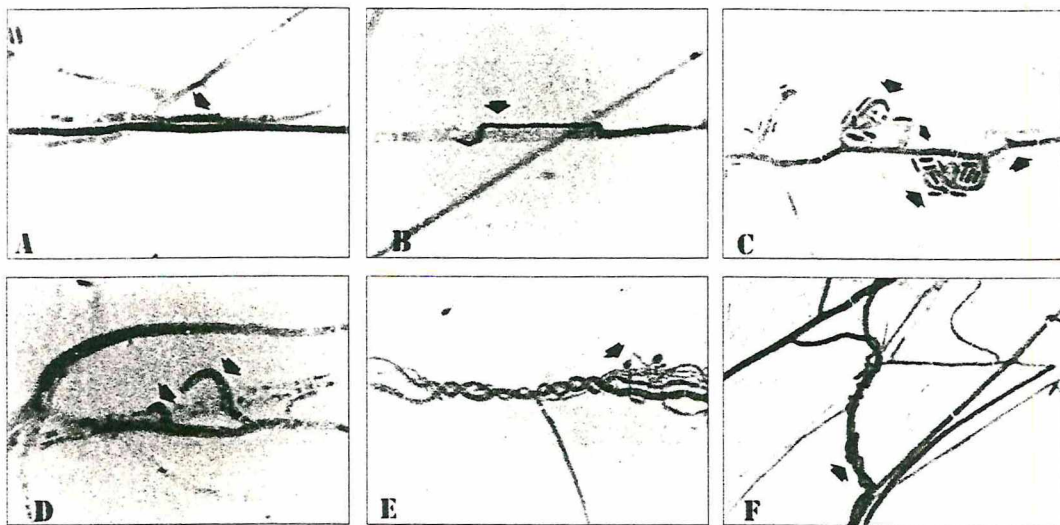


Figura 1 - Interação de hifas de *Trichoderma* spp. (coradas de azul intenso) e *Verticillium dahliae* (não coradas). (A) crescimento em contato íntimo de *T. pseudokoningii*, isolado TIV, com IM₂ (x100). (B) idem ao anterior, a ponta da seta indica início da formação de um gancho (x100). (C) crescimento em contato íntimo e formação de ganchos de *T. aureo-viride*, isolado TW16, envolvendo conídios de IM₃ (x100). (D) formação de ganchos. (E) enrolamento de hifas do isolado TW6 de *T. koningii*, a seta mostra um clamidosporo (x40). (F) enrolamento de hifas de *T. aureoviride*, isolado T218, sobre IM₃, a seta mostra parte da hifa de *V. dahliae* (x40).

antagonistas uma enorme capacidade como competidores através da rápida colonização do substrato. As espécies de *Trichoderma* podem parasitar também estruturas de resistência como microescleródios, que são frequentemente produzidos por *V. dahliae* (Melo, 1991; Chet & Hennis, 1985).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, evidenciou-se a necessidade de testar esses isolados de *Trichoderma* spp. em condições de casa de vegetação e de campo, para comprovar seu potencial como agentes de biocontrole da murcha verticilar de berinjela causada por *V. dahliae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARAK, R.; ELAD, Y.; MICRELMAN, O.; CHET, I. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, v.75, p.458-462, 1985.
- BARNETT, H.L. The nature of mycoparasitism by fungi. *Annual Review of Microbiology*, v.17, p.1-14, 1963.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHABELL, D.K.; WELLS, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, v.72, p.379-382, 1982.

- BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp.. *Plant and Soil*, v.57, p.131-135, 1980.
- BOSSALIS, M.C. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology*, v.2, p.363-375, 1964.
- CAMPOROTA, P. Antagonism *in vitro* of *Trichoderma* spp. vis-a-vis *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Agronomie*, v.5, p.613-620, 1985.
- CASSIOLATO, A.M.R. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) De Bary por mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai. Piracicaba, 1995. 133p. Tese (Doutoramento) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CHET, I.; ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. In: Les antagonismes microbiens. Mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. *Colloques de L'I.N.R.A.*, v.18, p.35-40, 1983.
- CHET, I.; HENIS, Y. Effect of catechol and disodium EDTA on melanin content of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and the role of melanin in the susceptibility of these walls to beta 1,3 glucanase and chitinase. *Soil Biology & Biochemistry*, v.1, p.31-38, 1985.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.L. HANSON, J.R.; AVENT, G.A. Antigungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society*, v.88, p.503-513, 1987.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathology Society*, 1983. 539p.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, v.57, p.25-39, 1971a.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II - Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, v.57, p.41-48, 1971b.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, v.57, p.368-369, 1971c.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.28, p.719-725, 1982.
- GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Biological and integrated control of grey mold of grape in Italy. *Trichoderma Newsletter*, v.4, p.4, 1988.
- KEMERLEY, C.M.; STACK, J.P. Influence of assessment methods on selection of fungal antagonists of the sclerotium-forming fungus *Phymatotrichum amnicorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.33, p.632-635, 1987.
- MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., org. *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, 1991. p.135-156. (Documentos, 15.).
- MELO, I.S.; SILVA, A.C. Resistance of U.V. induced mutants of *Trichoderma harzianum* to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Petria*, v.1, p.151-152, 1991.
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, v.23, p.23-54, 1985.
- PETERBAUER, C.K.; HEIDENREICH, E.; BAKER, R.; KUBICEK, C.P. Effect of benomyl resistance on cellulase formation by *Trichoderma reesei* and *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.38, p.1292-1297, 1992.
- RAI, B.; SINGH, V.T.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp.. *Plant and Soil*, v.57, p.131-135, 1980.
- RIDOUT, C.J.; COLEY-SMITH, J.R.; LYNCH, J.M. Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.10, p.180-187, 1988.
- VAJNA, L. Phytopathogenic *Fusarium oxysporum* as a necrotrophic mycoparasite. *Phytopathologische Zeitschrift*, v.114, p.338-348, 1985a.
- VAJNA, L. Mutual parasitism between *Trichoderma hamatum* and *Trichoderma pseudokoningii*. *Phytopathologische Zeitschrift*, v.113, p.300-303, 1985b.
- WEINDLING, R. Studies on lethal principles effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*, v.24, p.1153-1179, 1934.

Recebido para publicação em 22.10.96
Aceito para publicação em 26.06.97