

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**DINÂMICA POPULACIONAL E AÇÃO DE
Trichoderma NO CONTROLE DE FUSARIOSE EM
MUDAS DE TOMATEIRO E PEPINEIRO**

TESE DE DOUTORADO

Luciana Zago Ethur

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**DINÂMICA POPULACIONAL E AÇÃO DE *Trichoderma* NO
CONTROLE DE FUSARIOSE EM MUDAS DE TOMATEIRO
E PEPINEIRO**

por

Luciana Zago Ethur

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Agronomia**.

Orientadora: Prof. Ph.D. Elena Blume

Santa Maria, RS, Brasil
2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**DINÂMICA POPULACIONAL E AÇÃO DE *Trichoderma* NO
CONTROLE DE FUSARIOSE EM MUDAS DE TOMATEIRO E
PEPINEIRO**

elaborada por
Luciana Zago Ethur

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA

Elena Blume, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza, Dr. (EMBRAPA)

Zaida Inês Antonioli, Dr. (UFSM)

Antonio Carlos Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)

Marlove Fátima Brião Muniz, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 13 de janeiro de 2006.

“... Dedico este trabalho ao meu companheiro Felipe, ao meu filho Vítor e aos meus pais Marlei e Luiz José, que juntos, são minha motivação de vida...”

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO:

À Prof^a. Elena Blume, pela orientação deste trabalho, pela amizade e pelas oportunidades que me proporcionou durante a realização do doutorado.

Ao órgão financiador CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de doutorado.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFSM, aos professores e a secretária Adriana, pelo profissionalismo.

Aos membros do “grupo de controle biológico” – Paola, Cícero, Josiane e Maria Georgina - que estiveram presentes na execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da UFSM – Maria, Fernando, Rodrigo e Josiane, pelo auxílio e alegre convivência.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária – Geraldo e Mari, pela disponibilidade.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Creio que não existe uma estrada principal na ciência... estamos numa floresta e descobrimos o nosso caminho por ensaio e erro, construindo nossas próprias estradas à medida que avançamos”. Max Born

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

DINÂMICA POPULACIONAL E AÇÃO DE *Trichoderma* NO CONTROLE DA FUSARIOSE EM MUDAS DE TOMATEIRO E PEPINEIRO.

AUTORA: LUCIANA ZAGO ETHUR
ORIENTADORA: ELENA BLUME

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 13 de janeiro de 2006.

Trichoderma spp. é um dos fungos mais pesquisados na atualidade como agente de biocontrole, sendo antagonista a vários fitopatógenos em diferentes culturas, além de auxiliar no desenvolvimento vegetal. O patógeno *Fusarium oxysporum* causador da murcha de fusário ou fusariose é difícil de ser controlado, principalmente pela sua capacidade em manter-se no solo por longos períodos, mesmo sem a presença do hospedeiro. Estudos da dinâmica populacional de *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. e microbiota nativa são necessários, principalmente para observar-se o impacto da adição do agente de biocontrole no ambiente solo. Olerícolas, como pepineiro e tomateiro, são comumente cultivadas na Região Sul, porém são sensíveis a uma gama de doenças, dentre as quais, a fusariose, que figura como principal doença, principalmente em ambiente protegido. Para buscar o controle biológico da fusariose no cultivo do tomateiro e pepineiro por *Trichoderma* e estudar a dinâmica populacional desse agente de biocontrole quando adicionado ao solo, foram propostos os seguintes objetivos: estudar a distribuição espacial dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico, no cultivo do pepineiro e tomateiro, em horta e estufa; utilizar micro-ambiente para realizar a seleção massal de isolados fúngicos antagônicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* e identificar, em nível de espécie, os isolados fúngicos mais efetivos; verificar a ação de isolados de *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a murcha de fusário do tomateiro e do pepineiro, identificando a melhor forma de aplicação do agente de biocontrole no controle da fusariose; analisar a dinâmica populacional dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* e de parte da microbiota do solo, com a adição de agente de biocontrole, no cultivo do tomateiro e pepineiro, em estufa e horta. Tanto *Trichoderma* quanto *Fusarium* foram encontrados em solo rizosférico e não rizosférico de horta e estufa, sendo que *Trichoderma* foi encontrado em maior número de coletas em solo rizosférico de estufa. O método de seleção massal, em substrato, de isolados fúngicos antagônicos aos patógenos *F. solani* e *F. oxysporum* foi eficiente, pois os três isolados de *Trichoderma harzianum* selecionados, além de reduzirem a população dos patógenos em substrato, foram efetivos contra a fusariose do tomateiro e pepineiro, em tratamento de semente ou de substrato. Ocorreu flutuação populacional de *Trichoderma* spp. quando isolados de *T. harzianum* foram adicionados ao solo no cultivo do tomateiro e pepineiro, em horta e estufa. Observou-se uma tendência da população de *Trichoderma* spp. voltar aos parâmetros iniciais, ou seja, antes do agente de biocontrole ser adicionado ao ambiente solo. A população de bactérias, *Fusarium* spp. e fungos gerais não apresentou grandes alterações pela presença dos isolados do agente de biocontrole.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum*, estufa, rizosfera e controle biológico.

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Graduate Program in Agronomy
Universidade Federal de Santa Maria

POPULATION DYNAMICS AND ACTION OF *Trichoderma* IN THE CONTROL OF FUSARIAL WILT OF TOMATO AND CUCUMBER SEEDLINGS.

AUTHOR: LUCIANA ZAGO ETHUR
ADVISER: ELENA BLUME

Location and Date of Presentation: Santa Maria, January 13, 2006.

Trichoderma spp. is at the present time, one of the fungi most studied as biocontrol agent, being antagonistic to several pathogens in different crops, besides promoting vegetable growth. The pathogen *Fusarium oxysporum* causes the fusarial wilt and is difficult to control mainly because of its capacity to remain in the soil for long periods, even without the presence of the host. Studies of the population dynamics of *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. and native microorganisms are necessary, mainly to observe the impact of the biocontrol agent addition to the soil. Vegetables as cucumber and tomato are commonly cultivated in South Brazil and are sensitive to a variety of diseases, as the fusarial wilt which is one of, their main diseases, specially in protected environment. For the biological control of the fusarial wilt in the cultivation of tomato and cucumber by *Trichoderma* and to study the population dynamics of the biocontrol agent when added to the soil, the following objectives were proposed: to study the space distribution of both *Trichoderma* and *Fusarium* in rhizosphere and bulk soil, in the cultivation of cucumber and tomato, in vegetable garden and greenhouse; to find a method for the mass selection of fungi isolates antagonistic to *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in microenvironment, and to identify the more effective ones; to verify the action of *Trichoderma harzianum* isolates in the development and protection of seedlings against the fusarial wilt of tomato and cucumber, identifying the best form of the biocontrol agent application in the control of the fusarial wilt; to analyze the population dynamics of *Trichoderma* and *Fusarium*, and of part of the microorganisms of the soil, with the addition of the biocontrol agents, in the cultivation of the tomato and cucumber, in greenhouse and vegetable garden. Both *Trichoderma* and *Fusarium* were found in the rhizosphere and bulk soil and the rhizosphere soil had the greater frequency of *Trichoderma* specially in greenhouse. The method of mass selection, in substratum, of fungi isolates antagonistic to the pathogens *F. solani* and *F. oxysporum* was efficient, since the three isolates of *Trichoderma harzianum* selected, besides reducing the population of the pathogens in substrate were also effective against the fusarial wilt of tomato and cucumber when applied as seed or substrate treatment. A population fluctuation of *Trichoderma* spp. occurred when isolates of *T. harzianum* were added to the soil in the cultivation of tomato and cucumber, in vegetable garden and greenhouse. There was a tendency of the population of *Trichoderma* spp. to return to the initial parameters, i.e. before the biocontrol agent was added to the soil. The population of bacteria, *Fusarium* spp. and general fungi did not show great alterations with the presence of the isolates of the biocontrol agent.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, greenhouse, rhizosphere and biological control.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Comparação entre solo rizosférico e não rizosférico quanto ao número de pontos de coleta que apresentaram os fungos <i>Trichoderma</i> ou <i>Fusarium</i> , no cultivo do tomateiro ou pepineiro, em estufa ou horta. Santa Maria - RS.....	57
TABELA 2 – Comparação entre os ambientes estufa e horta, quanto ao número de pontos de coleta de solo rizosférico e não rizosférico que apresentaram os fungos <i>Trichoderma</i> ou <i>Fusarium</i> , no cultivo do tomateiro ou pepineiro. Santa Maria - RS	58
TABELA 3 – Comparação entre os gêneros <i>Trichoderma</i> e <i>Fusarium</i> quanto ao número de pontos de coleta nos quais foram encontrados em solo rizosférico ou não rizosférico, no cultivo do tomateiro ou pepineiro, em estufa ou horta. Santa Maria – RS	60
TABELA 4 – Sobrevivência de <i>Fusarium solani</i> (Log_{10} UFC/g de substrato) em substrato tratado com possíveis antagonistas fúngicos do gênero <i>Trichoderma</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Cladosporium</i> . Santa Maria – RS.....	73
TABELA 5 – Sobrevivência de <i>Fusarium oxysporum</i> (Log_{10} UFC/g de substrato) em substrato tratado com possíveis antagonistas fúngicos do gênero <i>Trichoderma</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Cladosporium</i> . Santa Maria – RS.....	76
TABELA 6 - Médias e classes de antagonismo de três isolados de <i>Trichoderma</i> sp. a <i>Fusarium solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> , em pareamento de culturas. Santa Maria – RS	77
TABELA 7 – Dimensões das estruturas (μm) que compõem os conidióforos dos isolados HTSR5, ETSR20 e ETSR8 de <i>Trichoderma harzianum</i> . Santa Maria – RS	80
TABELA 8 – Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas em sementes de tomate tratadas com isolados de <i>Trichoderma harzianum</i> , em teste de papel filtro. Santa Maria – RS	98

TABELA 9 – Emergência e desenvolvimento de mudas a partir de sementes de tomate tratadas com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> sp., cultivadas em bandejas de isopor. Santa Maria – RS	99
TABELA 10 – Incidência (%) e severidade (notas) da murcha de fusário em mudas de tomateiro, em tratamentos de semente com isolados e mix de <i>Trichoderma harzianum</i> e Thiran®. Santa Maria – RS	100
TABELA 11 - Incidência (%) e severidade (notas) da murcha de fusário em mudas de tomateiro, com tratamentos biológico (isolados e mix de <i>Trichoderma harzianum</i>) e/ou químico (fungicida Thiran®). Santa Maria – RS	101
TABELA 12 – Germinação e desenvolvimento de plântulas em sementes de pepineiro tratadas com isolados de <i>Trichoderma harzianum</i> , em teste de papel filtro. Santa Maria – RS	105
TABELA 13 – Emergência e desenvolvimento de mudas a partir de sementes de pepineiro tratadas com isolados e mix de <i>Trichoderma harzianum</i> cultivadas em bandejas de isopor. Santa Maria – RS	105
TABELA 14 – Incidência (%) e severidade (notas) da murcha de fusário em pepineiro, em função do tratamentos biológico (isolados e mix de <i>Trichoderma harzianum</i>) e/ou químico (fungicida Thiran®) de sementes. Santa Maria – RS ...	107
TABELA 15 – Número de Unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Trichoderma</i> spp. em solo rizosférico de mudas de pepineiro que receberam tratamento de sementes ou de substrato com isolados ou mix de <i>Trichoderma harzianum</i> . Santa Maria – RS	111
TABELA 16 – Incidência (%) e severidade (notas) da murcha de fusário em mudas de pepineiro transplantadas de bandejas de isopor, sob diferentes tratamentos com isolados e mix de <i>Trichoderma harzianum</i> , veiculados pela sementes ou substrato. Santa Maria – RS	112
TABELA 17 – Incidência (%) e severidade (notas) da murcha de fusário em mudas de pepineiro transplantadas de bandejas de isopor, sob diferentes formas de aplicação (semente ou substrato) dos isolados e mix de <i>Trichoderma harzianum</i> . Santa Maria – RS	112
TABELA 18 – <i>Trichoderma</i> spp. e fungos totais (Log UFC/g de solo) em solo rizosférico e não rizosférico, sob diferentes tratamentos com isolados de <i>Trichoderma harzianum</i> e mix, no cultivo do pepineiro, em estufa, no outono/inverno. Santa Maria – RS.....	131

TABELA 19 – *Trichoderma* spp. (Log_{10} UFC/g de solo) em solo rizosférico e não rizosférico, sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma harzianum* e mix, no cultivo do pepineiro, em estufa, na primavera/verão. Santa Maria – RS . 140

TABELA 20 – *Trichoderma* spp. (Log_{10} UFC/g de solo) em solo rizosférico e não rizosférico, sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma harzianum* e mix, no cultivo do tomateiro, em estufa, na primavera/verão. Santa Maria – RS . 142

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Arranjo mostrando os camalhões com os pontos de coleta de solo rizosférico do pepineiro e tomateiro, em estufa e horta. Santa Maria – RS.....	51
FIGURA 2 – Distribuição espacial dos gêneros <i>Trichoderma</i> e <i>Fusarium</i> em solos rizosférico e não rizosférico, no cultivo do pepineiro e tomateiro, nos ambientes estufa e horta. Santa Maria – RS.	56
FIGURA 3 – Médias de temperatura (TM) e Umidade Relativa do ar (URm), em estufa, no período de janeiro a fevereiro de 2003. Santa Maria - RS.....	61
FIGURA 4 – Médias de temperatura (TM) e Umidade Relativa do ar (URm), em horta, no período de janeiro a fevereiro de 2003. Santa Maria - RS	61
FIGURA 5 – Aspecto e coloração dos isolados ETSR20, ETSR8 e HTSR5 de <i>Trichoderma harzianum</i> , em meio BDA. Santa Maria – RS.....	78
FIGURA 6 – Aspectos morfológicos dos isolados ETSR20, ETSR8 e HTSR5 de <i>Trichoderma harzianum</i> , em meio de cultura. Conidióforos, fiálides e conídios germinando. Santa Maria – RS	79
FIGURA 7 – Incidência (%) da murcha do tomateiro, em substrato infestado com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , em tratamento de substrato, com diferentes doses de pó (formulado) do isolado HTSR5 de <i>Trichoderma harzianum</i> . Santa Maria – RS	102
FIGURA 8 – Severidade (notas) da murcha do tomateiro, em substrato infestado com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , em tratamento de substrato, com diferentes doses de pó (formulado) do isolado HTSR5 de <i>Trichoderma harzianum</i> . Santa Maria – RS	104
FIGURA 9 – Incidência (%) da murcha de fusário do pepineiro, em tratamento de substrato com diferentes doses de pó (formulado) do isolado HTSR5 de <i>Trichoderma harzianum</i> . Santa Maria – RS.....	109
FIGURA 10 – População de <i>Trichoderma</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., fungos totais e bactérias, com a adição de isolados de <i>Trichoderma harzianum</i> no solo, no cultivo do pepineiro, em horta e estufa, no outono/inverno. Santa Maria – RS	131

FIGURA 11 – População de <i>Trichoderma</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., fungos totais e bactérias, com a adição de isolados de <i>Trichoderma harzianum</i> no solo, no cultivo do tomateiro, em horta e estufa, no outono/inverno. Santa Maria – RS.....	133
FIGURA 12 – Média da temperatura e umidade relativa referente aos experimentos do outono/inverno, em estufa. Santa Maria – RS.....	129
FIGURA 13 – Temperatura do solo medida por geotermômetros a 2,5, 5 e 10 cm de profundidade às 9 h, em estufa. Santa Maria – RS.....	135
FIGURA 14 – Média da temperatura e umidade relativa referente aos experimentos do outono/inverno, em horta. Santa Maria – RS.....	136
FIGURA 15 – Temperatura do solo medida por geotermômetros a 2,5, 5 e 10 cm de profundidade às 9 h, em horta. Santa Maria – RS.....	136
FIGURA 16 – População de <i>Trichoderma</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., fungos totais e bactérias, com a adição de isolados de <i>Trichoderma harzianum</i> no solo, no cultivo do pepineiro, em horta e estufa, na primavera/verão. Santa Maria – RS.....	139
FIGURA 17 – População de <i>Trichoderma</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., fungos totais e bactérias, com a adição de isolados de <i>Trichoderma harzianum</i> no solo, no cultivo do tomateiro, em horta e estufa, na primavera/verão. Santa Maria – RS.....	142
FIGURA 18 – Média da temperatura e umidade relativa referente aos experimentos da primavera/verão, em horta. Santa Maria – RS.....	147
FIGURA 19 – Média da temperatura e umidade relativa referente aos experimentos da primavera/verão, em estufa. Santa Maria – RS.....	148

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Características químicas dos solos de horta e estufa, onde ocorreram as coletas de solo rizosférico e não rizosférico. Santa Maria - RS 59

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I – Características químicas dos solos de horta e estufa para os experimentos do outono/inverno e primavera/verão.....	154
--	-----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1.1 – Cultura do tomateiro	21
1.2 – Cultura do pepineiro	22
1.3 – <i>Fusarium oxysporum</i>	22
1.3.1 – <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	24
1.3.1 – <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	25
1.4 – Medidas de controle da fusariose.....	26
1.4.1 – Controle biológico da fusariose	26
1.5 – <i>Trichoderma</i> spp.....	28
1.5.1 – <i>Trichoderma</i> como agente de biocontrole	29
1.5.2 – <i>Trichoderma</i> no desenvolvimento vegetal	32
1.6 – Espermosfera e rizosfera	34
1.7 – Dinâmica populacional.....	36
1.8 – Ambiente protegido	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO II – DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE <i>Trichoderma</i> E <i>Fusarium</i> EM SOLO CULTIVADO COM PEPINEIRO E TOMATEIRO, EM HORTA E ESTUFA	47
2.1 – Introdução.....	48
2.2 – Material e Métodos	49
2.2.1 – Distribuição espacial dos gêneros fúngicos <i>Trichoderma</i> e <i>Fusarium</i>	49
2.2.1.1 – Local das coletas.....	49
2.2.1.1.1 – Descrição da estufa	50
2.2.1.2 – Implantação do experimento	50
2.2.1.3 – Coletas	51
2.2.1.4 – Avaliação da presença dos fungos.....	52
2.2.1.5 – Registro dos dados meteorológicos	53
2.2.1.6 – Análise estatística.....	53

2.2.2 – Patogenicidade dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. ao tomateiro e pepineiro...	53
2.2.2.1 – Produção de inóculo	53
2.2.2.2 – Teste de patogenicidade	54
2.3 – Resultados e Discussão	55
2.3.1 – Distribuição espacial dos gêneros <i>Trichoderma</i> e <i>Fusarium</i>	55
2.3.2 - Patogenicidade dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. ao tomateiro e pepineiro..	62
2.4 – Conclusões.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO III – SELEÇÃO MASSAL DE ANTAGONISTAS FÚNGICOS A <i>Fusarium solani</i> E <i>Fusarium oxysporum</i> EM SUBSTRATO	66
3.1 – Introdução.....	67
3.2 – Material e Métodos	68
3.2.1 – Isolados dos patógenos e possíveis antagonistas.....	68
3.2.2 – Seleção de antagonistas a <i>Fusarium solani</i> em substrato.....	69
3.2.3 – Ação dos isolados fúngicos sobre <i>Fusarium oxysporum</i> em substrato	70
3.2.4 – Análise estatística.....	70
3.2.5 – Pareamento de culturas	71
3.2.6 – Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i>	71
3.3 – Resultados e Discussão	72
3.3.1 – Seleção de antagonistas fúngicos a <i>Fusarium solani</i> em substrato	72
3.3.2 – Ação de isolados fúngicos a <i>Fusarium oxysporum</i> em substrato	75
3.3.3 – Pareamento de culturas	76
3.3.4 – Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp.....	77
3.4 – Conclusões.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CAPÍTULO IV – <i>Trichoderma harzianum</i> NO DESENVOLVIMENTO E NA PROTEÇÃO DE MUDAS CONTRA A FUSARIOSE DO TOMATEIRO E PEPINEIRO, EM CONDIÇÕES CONTROLADAS.....	84
4.1 – Introdução.....	85
4.2 – Material e Métodos	87
4.2.1 – Inóculo, formulação de <i>Trichoderma</i> e fungicida	87
4.2.2 – Germinação, emergência e desenvolvimento de mudas com sementes tratadas por isolados de <i>Trichoderma harzianum</i>	89
4.2.2.1 – Germinação	89

4.2.2.2 – Emergência e desenvolvimento de mudas	90
4.2.3 – Controle biológico da murcha de fusário do tomateiro e pepineiro.....	91
4.2.3.1 – Tratamento de sementes.....	91
4.2.3.1.1 – Experimentos em bandejas	91
4.2.3.1.2 – Experimentos em sacos plásticos	92
4.2.3.2 – Tratamento de substrato	93
4.2.3.3 – Tratamentos de semente e substrato em bandejas de isopor com posterior transplante de mudas de pepineiro	95
4.2.3.3.1 – População de <i>Trichoderma</i> na rizosfera do pepineiro	96
4.2.4 – Análise estatística.....	97
4.3 – Resultados e Discussão	97
4.3.1 – Experimentos com tomateiro	97
4.3.1.1 – Germinação, emergência e desenvolvimento de plântulas com sementes tratadas por isolados de <i>Trichoderma harzianum</i>	97
4.3.1.2 – Controle da murcha do tomateiro por diferentes isolados de <i>Trichoderma harzianum</i>	100
4.3.1.2.1 – Tratamento de sementes.....	100
4.3.1.2.2 – Tratamento de substrato.....	102
4.3.2 – Experimentos com pepineiro	104
4.3.2.1 – Germinação, emergência e desenvolvimento de plântulas	104
4.3.2.2 – Controle biológico da murcha de fusário do pepineiro.....	107
4.3.2.2.1 – Tratamento de sementes.....	107
4.3.2.2.2 – Tratamento de substrato.....	109
4.3.2.2.3 – Tratamento de semente e substrato em bandejas de isopor com posterior transplante de mudas	110
4.4 – Conclusões.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
CAPÍTULO V – DINÂMICA POPULACIONAL DOS GÊNEROS <i>Trichoderma</i> e <i>Fusarium</i> E DE PARTE DA MICROBIOTA DO SOLO, COM A ADIÇÃO DE <i>Trichoderma harzianum</i> , NO CULTIVO DO TOMATEIRO E PEPINEIRO	121
5.1 – Introdução.....	122
5.2 – Material e Métodos	124
5.2.1 – Local das coletas.....	124
5.2.2 – Formulação dos isolados de <i>Trichoderma harzianum</i>	124

5.2.3 – Implantação dos experimentos.....	125
5.2.4 – Coletas	126
5.2.5 – Diluições das amostras de solo rizosférico e não rizosférico.....	127
5.2.6 – Avaliação	128
5.2.7 – Registro dos dados meteorológicos	128
5.2.8 – Análise estatística.....	129
5.3 – Resultados e Discussão	129
5.3.1 – Experimentos realizados no outono/inverno.....	129
5.3.1.1 – Sobrevivência e desenvolvimento populacional de <i>Trichoderma</i> spp. em experimentos no outono/inverno	133
5.3.1.2 – A adição de <i>Trichoderma</i> no solo e a interferência na microbiota nativa em experimentos no outono/inverno	136
5.3.2 – Experimentos realizados na primavera/verão.....	138
5.3.2.1 – Sobrevivência e desenvolvimento populacional de <i>Trichoderma</i> spp. em experimentos na primavera/verão	143
5.3.2.2 – A adição de <i>Trichoderma</i> no solo e a interferência na microbiota nativa em experimentos na primavera/verão	145
5.4 – Conclusões.....	148
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
CONCLUSÃO.....	152
ANEXO.....	154

INTRODUÇÃO

O controle biológico faz parte do manejo integrado de doenças e cada vez mais se estuda e utiliza essa forma de controle como alternativa ao controle químico. Os agroquímicos, por sua vez, estão associados a diversos problemas como falhas no controle de patógenos de solo, contaminação ambiental e danos à saúde humana.

Um dos principais obstáculos para a utilização do controle biológico está em encontrar o antagonista ideal, pois a especificidade muitas vezes é marca registrada de determinados agentes de biocontrole, além de outras barreiras determinantes para a sua ação, como dose-resposta, temperatura, umidade, tipo de solo e suscetibilidade do hospedeiro.

Trichoderma spp. é um dos fungos mais pesquisados na atualidade como agente de biocontrole, sendo antagonista a vários fitopatógenos em diferentes culturas. Estudos da dinâmica populacional desse antagonista, patógenos e microbiota nativa são necessários, principalmente para avaliar-se o impacto da adição do agente de biocontrole no ambiente solo. Assim, pode-se compreender como e em quais circunstâncias ocorre o controle biológico no ambiente solo, pois a análise microbiológica é que definirá as relações entre patógeno, agente de biocontrole e hospedeiro.

O fungo *Fusarium* spp. é cosmopolita, habitante de solos de lavoura, horta e estufa, e o estudo de sua dinâmica populacional se restringe basicamente a lavouras. Esse gênero fúngico comporta várias espécies de patógenos causadores de doenças em várias culturas, sendo a espécie *Fusarium oxysporum* causadora da murcha de fusário ou fusariose. O controle da murcha ocasionada por *F. oxysporum* é difícil, principalmente pela capacidade do patógeno em se manter no solo por longos períodos, mesmo sem a presença do hospedeiro.

O controle biológico é atualmente uma das alternativas utilizadas para o controle da murcha de fusário e antagonistas como *Trichoderma* spp. são encontrados em formulações comerciais nacionais e internacionais, porém não se encontra nenhum estudo que represente o potencial da microbiota em nossa região, em solos de Santa Maria – RS, que atuem no biocontrole de *F. oxysporum*. As

pesquisas na área de controle biológico são fundamentais, pois a introdução de antagonistas adaptados ao ambiente do patógeno é um aspecto relevante para que ocorra a otimização do biocontrole.

Olerícolas, como pepineiro e tomateiro, são comumente cultivadas na Região Sul e importantes contribuintes na renda dos agricultores, porém são sensíveis a uma gama de patógenos de filoplano ou de solo. Estufas podem ser inviabilizadas ao cultivo de determinadas olerícolas devido à infestação por fungos de solo como *F. oxysporum*. O tomateiro é um exemplo de planta conhecida como de cultivo nômade, tal a problemática da ação dos fitopatógenos de solo e a falta de conhecimento da ecologia destes e do manejo integrado no controle de doenças.

A hipótese formulada para essa pesquisa foi de que "em solo rizosférico, tanto do pepineiro quanto do tomateiro, em horta ou estufa, seriam encontrados isolados de *Trichoderma* antagônicos a *Fusarium oxysporum*, e que a adição de *Trichoderma* nos solos dos dois ambientes reduziria a população de *Fusarium* spp. e da microbiota nativa. E, ainda, que a população do agente de biocontrole, uma vez adaptada ao ambiente solo, se manteria constante."

Para testar a hipótese exposta acima, foram propostos os seguintes objetivos, dispostos em quatro capítulos:

- 1) observar a ocorrência dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico, no cultivo do pepineiro e tomateiro, em horta e estufa, e quantificar e identificar os isolados de *Fusarium* sp. patogênicos às duas culturas;
- 2) realizar seleção massal de isolados fúngicos antagônicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato, para serem utilizados em programas de controle biológico, e identificar, em nível de espécie, os isolados mais efetivos;
- 3) verificar a ação de isolados de *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a murcha de fusário do tomateiro e do pepineiro, identificar a melhor forma de aplicação do agente de biocontrole no controle da fusariose, e identificar a ação conjunta dos tratamentos químico e biológico;
- 4) analisar a dinâmica populacional dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* e de parte da microbiota do solo, com a adição do agente de biocontrole, no cultivo do tomateiro e pepineiro, em estufa e horta.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 – Cultura do tomateiro

De acordo com Murayama (1995), o tomateiro (*Lycopersicum esculentum* Mill.) é originário da parte ocidental das Américas Central e do Sul, de onde foi levado para o sul da Europa, pelos exploradores espanhóis. A utilização do tomateiro como planta de interesse agrícola é relativamente recente, remontando apenas a 1800, pois, ainda em 1700, um catálogo o considerava unicamente como espécie decorativa (ANDERLINI, 1982).

No Brasil, o tomateiro ocupa o segundo lugar entre as olerícolas cultivadas, estando o Rio Grande do Sul em terceiro lugar na sua produção (FILGUEIRA, 2003). Cultivam-se diferentes variedades de tomateiros no Brasil e uma delas é o tomate do tipo “cereja”, que segundo a EMATER (comunicação pessoal, POERSCHKE, 2003), os produtores que cultivam no Rio Grande do Sul obtêm boa produção. O tomate do grupo cereja foi introduzido no início da década de 90, é caracterizado pelo minúsculo tamanho dos frutos (15 a 25 g) e é produzido em campo ou estufa (FILGUEIRA, 2003).

O tomateiro necessita de temperaturas relativamente elevadas para poder desenvolver o ciclo vegetativo e assegurar a completa maturação dos frutos. A temperatura diurna adequada fica entre 20 e 25 °C e a noturna entre 11 e 18 °C. Em temperaturas excessivamente elevadas, acima de 35 °C, ocorrem problemas na frutificação, com fecundação prejudicada e queda acentuada de flores e frutos, sendo que esse problema também ocorre em temperaturas excessivamente baixas (-2°C) (FILGUEIRA, 2003; MESSIAEN et al., 1995).

A cultura do tomateiro constitui-se numa das atividades agrícolas mais difíceis de serem conduzidas, face aos problemas enfrentados pelo agricultor durante o seu cultivo (FILGUEIRA, 2003). São inúmeros os inconvenientes presentes e, entre eles, as doenças representam, talvez, os riscos mais sérios para a cultura (KIMATI & MINAMI, 1982).

1.2 - Cultura do pepineiro

O pepineiro (*Cucumis sativus* L.) é originário das regiões quentes do norte da Índia ou da África (FILGUEIRA, 2003), mas Camargo (1992) o entende como originário da África e da Ásia, sendo hoje cultivado em todos os países do mundo. Na região de Santa Maria – RS, segundo dados da EMATER, cultiva-se cerca de 7.700 ha de pepino para conserva, sendo que desses, a maior parte ocorre em estufas.

Como a maioria das Cucurbitáceas, o pepineiro necessita de clima quente, não suportando temperaturas muito baixas e nem geadas (CAMARGO, 1992; FILGUEIRA, 2003). A cultura é muito exigente quanto à temperatura e à umidade do solo. Após a germinação, no decorrer das primeiras fases de vegetação, deve-se diminuir a irrigação para fortalecer o sistema radicular, pois o pepineiro tem grande exigência de água, sobretudo a partir do início da floração (SGANZERLA, 1997).

1.3 – *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum Schlechtend.: Fr. é uma espécie composta por várias *formae specialis* que causam fusariose em hospedeiros específicos, e apresentam várias raças e patotipos. É um fungo filamentosso, anamórfico, que tem sido estudado principalmente pela sua habilidade em causar doença em plantas de interesse econômico. Apresenta variações sob o aspecto morfológico e patogênico, sendo comumente isolado de raízes de plantas que não apresentam sintomas da doença (GORDON & MARTYN, 1997).

Fusarium oxysporum apresenta três tipos de esporos: microconídios, macroconídios e clamidósporos. Os microconídios são abundantes, ovais, formados em pequenas fiálides (conidióforos) por uma e ocasionalmente por duas células. Os macroconídios são fusiformes, apresentam de três a cinco células, são produzidos em grande número e freqüentemente em esporodóquio. Já os clamidósporos são formados por macroconídios e micélio, e os formados pelo micélio têm ocorrência simples ou em pares e podem ser intercalados ou terminais (ZITTER et al., 1996). A pigmentação no meio de cultura por *F. oxysporum* é freqüentemente rosada e

violácea.

Quando *F. oxysporum* infecta plantas no início de seu desenvolvimento pode provocar tombamento de mudas. Plantas em vários estágios de desenvolvimento podem ser infectadas pelo patógeno, que provoca amarelecimento e/ou murchas nas folhas mais velhas que progride até nos brotos. Com a evolução da doença, pode ocorrer necrose marginal nas folhas; murcha total da planta; queda de folhas, flores e frutos; aparecimento de raízes adventícias e, finalmente a morte da planta (BEDENDO, 1995). Os sintomas internos são evidentes pelo escurecimento dos vasos do xilema, pois o patógeno é responsável pelo desarranjo e bloqueio de elementos do xilema, formação de tiloses e alterações no transporte de água na planta (ZITTER et al., 1996).

A maior severidade da doença está condicionada a fatores ambientais favoráveis, tais como: temperatura, umidade, plantio em solos arenosos, presença de nematóides, ocorrência de pH baixo e adubação com baixo teor de potássio; além da falta de resistência do hospedeiro (BEDENDO, 1995). A temperatura ideal para o desenvolvimento de *F. oxysporum* fica entre 25 a 32 °C (BEDENDO, 1995), sendo o ponto ótimo em 28 °C e inibição do desenvolvimento do patógeno acima de 33 °C e abaixo de 17 °C (COOK & BAKER, 1983). Segundo Peng et al. (1999), tanto em solo supressivo quanto em solo condutivo, a temperatura do solo tem efeito direto na germinação de clamidósporos de *F. oxysporum* f. sp. *cubensis*, pois o máximo ficou em 33 °C (germinação de 30 e 55 %, respectivamente) e após ocorreu decréscimo em ambos os solos. Com relação ao pH do solo, o ponto ótimo para a germinação de clamidósporos foi em pH 8 quando ocorreu germinação de 40 e 50 %, em solo supressivo e condutivo, respectivamente, sendo que em pH 10 não ocorreram diferenças entre os solos e a média de germinação foi de 18 % (PENG et al., 1999).

A sobrevivência no solo, do agente da fusariose, ocorre na forma de clamidósporos, que podem sobreviver por longos períodos e serem disseminados na área através do movimento do solo provocado por vento, água ou implementos (BEDENDO, 1995).

1.3.1 – *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* Sacc. Snyder & Hansen causador da murcha de fusário do tomateiro apresenta três raças fisiológicas, sendo que as raças um e dois são amplamente distribuídas no Brasil e no mundo (REIS et al., 2003). Entretanto, novos patotipos desse patógeno têm surgido superando as cultivares de tomateiro existentes (TELLO & LACASA, 1988).

Os danos econômicos causados por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* são preocupantes, e devido a isso, encontram-se estudos direcionados para vários aspectos de sua ecologia e de sua ação na patogênese, tais como, a colonização de raízes em diferentes fontes de nitrogênio (CARVALHO et al., 2003) e a disseminação aérea de inóculo (KATAN et al., 1997).

Nas mudas de tomateiros, os sintomas aparecem primeiro nas folhas mais velhas, que murcham e se curvam, podendo ocorrer tombamento (TOKESHI, 1997). Ocorre o escurecimento dos tecidos vasculares que se prolonga por todo o caule e as plantas freqüentemente murcham e morrem (JONES et al., 1993), sendo que a descoloração é mais intensa na base do caule (LOPES & SANTOS, 1994). Já os sintomas em plantas mais velhas geralmente ocorrem entre o florescimento e a maturação dos frutos. Segundo Lopes & Santos (1994), o sintoma reflexo mais evidente da doença é o amarelecimento das folhas, a partir das mais velhas. Nas horas mais quentes do dia, a planta murcha, principalmente nas extremidades, recuperando-se ao entardecer. Conforme evolui a doença, aumenta a queda de folhas basais, a planta vai murchando e as folhas ainda firmes tornam-se inicialmente amarelas e depois marrons. Mesmo assim, as plantas adultas podem permanecer vivas. É comum encontrar-se plantas atacadas parcialmente, isto é, apresentando sintomas apenas de um lado, em metade da planta, podendo ocorrer queda prematura dos frutos que apresentam descoloração dos tecidos vasculares (KIMATI & MINAMI, 1982; JONES et al., 1993).

O desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pode ser influenciado pela baixa umidade do solo, dias curtos, intensidade de luz baixa, nutrição pobre em nitrogênio, fósforo e potássio, e pH baixo. As temperaturas entre 21 e 33 °C favorecem a murcha, estando o ótimo em 28 °C (JONES et al., 1993), mas segundo Kimati & Minami (1982), a virulência é maior quando a temperatura oscila entre 25 e

30 °C. A fonte de nitrogênio pode alterar o pH na região da rizosfera e afetar diretamente a colonização do tomateiro por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Carvalho et al. (2003) observaram colonização das hastes do tomateiro pelo patógeno com a adição de NH_4^+ e NH_4NO_3^- porque o pH ficou entre 3,43 e 3,95, em 24 h. O mesmo não ocorreu quando foi adicionado NO_3^- , pois o pH ficou entre 5,08 e 6,03, observando-se apenas a presença isolada de conídios do patógeno.

1.3.2 – *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

A cultura do pepineiro apresenta grande suscetibilidade ao tombamento causado por vários patógenos de solo. Esses tendem a acumular-se e a disseminar-se através das sementes, por ocasião do preparo do solo, da prática de irrigação e de tratamentos culturais, fazendo com que haja aumento na incidência de doenças à medida que se repete a semeadura em um mesmo local. Os patógenos mais comumente encontrados em solo de cultivo de pepineiro são: *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina* spp., *Pythium deliense* e *Fusarium* spp. (OLIVEIRA et al., 1995; ZAMBOLIM et al., 1999).

A murcha de fusário do pepineiro ocorre em vários países, apresentando maior importância nos Estados Unidos, Inglaterra, Grécia, Israel, Japão, China, Alemanha, Austrália e Holanda. Em vários outros países é considerada doença secundária, não apresentando importância econômica (ZITTER, 1996).

O fungo *Fusarium oxysporum* Schelechtend.:Fr. f. sp. *cucumerinum* J.H. Owen é o agente causal da murcha de fusário do pepineiro. Esse fungo ataca o pepineiro em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, podendo ocasionar comumente tombamento de mudas em temperaturas em torno de 20°C. *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* pode acarretar, também, tombamento de pré-emergência e infecção de plantas velhas, resultando na murcha de um ou mais brotos progredindo para a murcha de toda a planta. Outro sintoma comum é a descoloração vascular de raiz e caule (ZITTER et al., 1996; ROBERTS & KUCHARÉK, 2005).

Segundo Blancard et al. (1996) pouco se sabe sobre as condições favoráveis ao desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* que pode sobreviver no solo

na forma de clamidósporos e saprofiticamente em restos de cultura e matéria orgânica. Sua disseminação pode ocorrer a partir do inóculo contido em restos de cultura infectados, por sementes contaminadas, onde pode permanecer viável por pelo menos um ano (ZITTER et al., 1996), pela liberação de esporos presentes na planta infectada, pela ação do vento ou chuva e pelo maquinário e/ou materiais utilizados para o cultivo (BLANCARD et al., 1996).

1.4 – Medidas de controle da fusariose

O controle de *F. oxysporum*, agente causador de murcha, é difícil, porque se desenvolve no solo e infecta o hospedeiro via sistema radicular, além de sobreviver no solo por longos períodos (BEDENDO, 1995).

As medidas de controle envolvem manejo integrado, como, rotação de culturas (BEDENDO, 1995; ROBERTS & KUCHAREK, 2005), sanidade das sementes (ZITTER et al., 1996), retirada de plantas doentes e de restos culturais infectados, esterilização do solo com vapor, desinfecção do material utilizado para sementeira e cultivo (BLANCARD et al., 1996), instalação da cultura em áreas onde ocorre baixa população do patógeno, aração profunda visando o enterro de restos de cultura, controle de nematóides que facilitam a penetração do patógeno, inundação da área infestada pelo patógeno, solarização do solo, controle biológico (BEDENDO, 1995) e, principalmente, o uso de cultivares tolerantes ou resistentes (BEDENDO, 1995; MELO & PICCININ, 1999). Dentre todas as medidas de manejo, utiliza-se ainda, o controle químico que no tratamento de sementes não apresenta efeito prolongado no ambiente solo e quando utilizado diretamente no colo da planta infectada (BLANCARD et al., 1996) atua apenas como paliativo.

1.4.1 – Controle biológico da fusariose

O controle da murcha de fusário (fusariose) do tomateiro é difícil de ser realizado porque o patógeno sobrevive bem por longo tempo no solo sem os hospedeiros (KIMATI & MINAMI, 1982). De acordo com Smith & Snyder (1972), o aumento da concentração de nutrientes no solo aumentou a percentagem de

germinação de clamidósporos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, tanto em solos supressivos quanto em solos conducivos, e ocorreu o decréscimo da competição entre patógeno e saprófitas.

Alguns microrganismos foram utilizados no controle biológico de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, dentre os quais, *Pseudomonas* sp. que apresentou aumento de 150 % na massa seca do tomateiro comparado com o tratamento testemunha, em solo infestado pelo patógeno (FREITAS & PIZZINATTO, 1991). *Burkholderia cepacia* e *Gliocladium virens* foram utilizados em tratamento de sementes e apresentaram aumento na percentagem de plantas sadias de 53 e 51%, respectivamente, quando comparados com o tratamento testemunha (MAO et al., 1998). *Penicillium oxalicum* induziu resistência sistêmica contra o patógeno, ocorrendo menor severidade da doença em tomateiros tratados, pois de acordo com dados histológicos ocorreu formação de xilema secundário adicional nessas plantas (DE CAL et al., 2000). *Trichoderma asperellum*, adicionado em solo esterilizado apresentou redução na incidência da doença de 85% (COTXARRERA et al., 2002). *Burkholderia cepacia*, *Gliocladium virens*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Trichoderma* sp. apresentaram redução na incidência da murcha do tomateiro de 36, 57, 88, 77 e 57 %, respectivamente (LARKIN & FRAVEL, 1998).

Em tratamentos com *Glomus intraradices* e *Trichoderma harzianum* ocorreu incidência de podridão de raiz de 14 e 32 %, respectivamente, e no tratamento testemunha de 48 %, em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (DATNOFF et al., 1995).

Poucos relatos existem a respeito do controle biológico da murcha de fusário no pepineiro. Segundo Singh et al. (1999), utilizando diferentes doses de composto com *Streptomyces* sp. e *Paenibacillus* sp., 6 g do composto diminuíram a incidência da murcha de fusário no pepineiro de 70 para 20 % e estabilizou com relação a doses mais altas. A aplicação de composto de lixo urbano e microrganismos (E.M.4. – effective microorganisms) apresentou redução no reisolamento de *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* em sementes e raízes de pepineiros. A incidência de podridão de raiz em pepineiros, em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* e tratado com alface incorporada ao mesmo, foi 50% menor do que em tratamento sem a alface (PAVLOU & VAKALOUNAKIS, 2005). *Trichoderma harzianum* induziu a ativação de defesa do pepineiro, de acordo com resultados encontrados em estudo histológico e bioquímico (YEDIDIA, 1999).

1.5 – *Trichoderma* spp.

Segundo Ramirez et al. (1995), o gênero *Trichoderma* Persson foi descrito, em 1794, para quatro espécies de fungos e, em 1969, foi novamente classificado por Rifai. De acordo com MELO (1991), as espécies de *Trichoderma*, dentro de um mesmo grupo ou seção, apresentam características sobrepostas, o que torna difícil a classificação de isolados. Esse gênero é classificado como imperfeito, pertencente à Sub-divisão Deuteromycotina, ordem Hifomicetes e família Moniliaceae (MELO, 1991).

Trichoderma spp. é um fungo anamórfico, freqüentemente isolado de solos em diferentes temperaturas e, em solos tropicais, pode-se encontrar de 10^1 a 10^3 UFC (unidades formadoras de colônia) (HARMAN et al., 2004). A sua fase teleomórfica é constituída pelo gênero *Hypocrea*, o qual é encontrado colonizando restos vegetais de plantas lenhosas e herbáceas, classificado como ascomiceto da ordem Hypocreales (KRUGNER & BACCHI, 1995). Porém, na natureza, a forma anamórfica parece ser um estágio independente da teleomórfica, seja em nível de indivíduos ou de populações (HARMAN et al., 2004). Já que, aparentemente, o gênero é desprovido de um ciclo sexual, algum mecanismo de recombinação entre diferentes espécies deve ocorrer (MELO, 1991).

Em meio de cultura, as colônias de *Trichoderma* crescem rapidamente, apresentando, inicialmente, superfície lisa e quase translúcida, tornando-se posteriormente flocosas ou compactas. A coloração da colônia em vários tons de verde (às vezes, muito claro – cor gelo) é, normalmente, devida à pigmentação dos conídios e à quantidade de conídios produzidos, podendo ainda ser influenciada pelo tipo e pH do meio de cultivo. O micélio é composto por hifas hialinas muito ramificadas e de parede lisa. Clamidósporos estão presentes na maioria das espécies, intercalados nas hifas ou, ocasionalmente, terminais (MELO, 1991; HOWELL, 2003).

As diferentes espécies sobrevivem em variadas temperaturas, sendo que *T. harzianum*, segundo Eastburn & Butler (1991), apresentou maior crescimento de colônia (micelial) de 27 a 30 °C, em teste *in vitro*; porém, no solo, a temperatura ideal para a colonização de restos de cultura, ação saprofítica, ficou entre 15 e 21 °C.

Isolados de *Trichoderma* spp. são conhecidos pela habilidade em produzir

enzimas que degradam celulose e quitina (HARMAN et al., 2004), utilizadas no antagonismo contra fungos patogênicos e na biodegradação da celulose de papel (VAN WYK & MOHULATSI, 2003).

1.5.1 – *Trichoderma* como agente de biocontrole

Trichoderma spp. é um fungo hemibiotrófico eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos (MELO, 1998). Sua ação como biocontrolador foi demonstrada pela primeira vez em 1932, por Weindling, que sugeriu seu uso no controle de doenças (SPIEGEL & CHET, 1998). Fatores como temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração, pH e teor de matéria orgânica influenciam na sobrevivência de *Trichoderma* no solo ou substrato (HOWELL, 2003). *Trichoderma viride* é um antagonista ativo em condições de solo úmido, mas é inibido em presença de umidade com pH acima de 5,4. Antagonismo de *T. harzianum* foi observado em vários valores de pH menores de 6,5, sendo a faixa ótima entre 4,5 e 5,3 (COOK & BAKER, 1983).

A ação de *Trichoderma* como agente de biocontrole ocorre devido à associação ou não dos mecanismos de antibiose, hiperparasitismo e competição (MELO, 1998). Já Howell et al. (1997) desconsideram o hiperparasitismo e acrescentam a indução de resistência do hospedeiro, além do favorecimento da planta na tolerância a estresse ambiental, solubilização e seqüestro de nutrientes inorgânicos e inativação de enzimas dos patógenos (HARMAN, 2000).

Antibiose é definida como uma interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos, produzidos por um organismo, têm um efeito danoso sobre o outro (BETTIOL, 1991). As espécies de *Trichoderma* têm sido estudadas por produzirem uma série de enzimas extracelulares (MENEZES & SOUZA, 1995); por degradarem paredes de células fúngicas e por serem ativas na produção de metabólitos extracelulares com atividade antimicrobiana (MELO, 1991) que, segundo Harman et al. (2004), chegam a mais de 100. Os metabólitos produzidos podem ser voláteis e não-voláteis. Dos antibióticos produzidos por *Trichoderma*, BASTOS (1991) cita gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina, que têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos. De acordo com Roberts & Lumsden (1990), a gliotoxina é responsável pela inibição da germinação de

esporângios e do crescimento micelial de *Pythium ultimum*.

Hiperparasitismo ou micoparasitismo é o fenômeno que consiste em um microrganismo parasitar o outro. Os hiperparasitas atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de planta, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno. A relação hospedeiro-parasita é caracterizada por um período relativamente longo de contato, que pode ser físico ou metabólico com digestão por enzimas hidrolíticas (quitinases, proteases, glucanases e lipases) (BETTIOL, 1991; MELO & FAULL, 2000). *Trichoderma* spp. possui característica micoparasita, pois pode detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção, presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, formar estruturas semelhantes a apressórios e enrolar-se fortemente em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa (SILVA, 1997; MELO, 1998). Segundo Harman et al. (2004) há de 20 a 30 genes envolvidos no processo de micoparasitismo devido a quantidade de proteínas e outros metabólitos que são envolvidos nessa interação. O hiperparasitismo realizado por *Trichoderma*, ocorre sobre vários fungos, inclusive *Fusarium oxysporum*, no qual ocorreu enrolamento de hifas, sítios de penetração, invasão de hifas e crescimento intracelular por isolado de *Trichoderma longibrachiatum* (MELO, 1991). Já Sivan e Chet (1989) comprovaram que o isolado T-35 de *T. harzianum*, embora tenha produzido β -1,3- glucanase e quitinase, ocorrendo o micoparasitismo de *Rhizoctonia solani* e *Pythium aphanidermatum*, não apresentou a mesma ação sobre *F. oxysporum*, sendo que a interferência deveria estar nas proteínas da parede celular do patógeno que devem ter interferido na ação das enzimas, aumentando sua resistência à lise.

Competição é um processo referente à interação entre dois ou mais organismos, empenhados na mesma ação. A competição entre microrganismos ocorre principalmente por nutrientes, espaço e oxigênio (BETTIOL, 1991; BAKER & DICKMAN, 1993) e, mesmo sendo um mecanismo importante, é extremamente difícil de ser comprovado experimentalmente, o que não ocorre com a antibiose e o micoparasitismo (HARMAN, 2000). Segundo Harman et al. (2004), *Trichoderma* sp. compete pelos exsudatos liberados pelas sementes no processo de germinação que estimulam a germinação de propágulos de fungos fitopatogênicos. De acordo com Howell (2003), a competição é uma das principais características de isolados de *Trichoderma* usados como agentes de biocontrole, pois somente assim terão capacidade de se desenvolver na rizosfera.

A indução de resistência é outro mecanismo utilizado por agentes de biocontrole, como *Trichoderma* spp. Esse processo ocorre quando as plantas expostas a um agente indutor têm seus mecanismos de defesa ativados, não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada (ROMEIRO, 1999). Tem ocorrido muito progresso na elucidação dos caminhos que envolvem a indução de resistência, sendo que, em muitos casos, o ácido salicílico e o ácido jasmônico, juntamente com o etileno ou óxido nítrico, induzem a cascata de eventos que provoca a produção de uma grande variedade de metabólitos e proteínas com diversas funções na planta, modificando o proteoma vegetal (HARMAN et al., 2004).

Em plântulas de pepineiro, em hidroponia, Yedidia et al. (1999) observaram que houve a penetração nas raízes por *T. harzianum* e ocorreram mudanças bioquímicas e morfológicas, caracterizando a ativação de mecanismo de resistência sistêmico. *Trichoderma harzianum* T-39 provocou resistência sistêmica no feijoeiro contra *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum lindemuthianum*, reduzindo em 42% o número e a área das lesões (Bigirimana et al., 1997 apud HARMAN et al., 2004). Já *Trichoderma* sp. isolado GT3-2 reduziu em 52% os danos de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* nas folhas do pepineiro. *Trichoderma* spp. é muito utilizado para controlar patógenos veiculados pelo solo e, portanto, nesse caso fica difícil de demonstrar a ocorrência de indução de resistência sistêmica quando o patógeno e o agente de biocontrole se encontram no mesmo ambiente (HARMAN et al., 2004).

A ação de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole de patógenos causadores de tombamento, murcha e podridão em mudas, é conhecida. Pode-se utilizar o agente de biocontrole como protetor de sementes que após desenvolver-se na espermosfera acaba acompanhando o desenvolvimento da raiz da nova planta (HARMAN, 2000). Segundo Harman et al. (2004), alguns isolados são excelentes competidores na rizosfera e por isso colonizam toda a superfície da raiz por várias semanas ou meses. Um importante ponto referente a colonização da rizosfera por isolados de *Trichoderma* é que foram encontradas hifas (não esporos) do isolado T-22 de *T. harzianum* envolvendo raízes de plântulas de milho (HARMAN, 2000). Os esporos não apresentam ação direta comprovada na ação de biocontrole (LEWIS & PAPAVIDAS, 1984) embora, geralmente, utilizam-se conídios para o tratamento de sementes ou solo. Segundo Melo (1996), os conídios e clamidósporos de *Trichoderma* são formulados e utilizados para tratamento de solos, sementes,

estolões e de bulbos e, ainda, pulverizados na parte aérea dos vegetais.

Trichoderma apresenta algumas características que são essenciais para um agente de biocontrole, tais como: ser inócuo ao ser humano e não apresentar impacto negativo ao meio ambiente, apresentar estruturas de reprodução de fácil propagação (SPIEGEL & CHET, 1998), principalmente em substratos naturais e apresentar meia vida de prateleira, quando formulado, razoavelmente longa e com boa viabilidade (MELO, 1996).

A preocupação com danos ao meio ambiente e a saúde humana vem crescendo juntamente com a maior disponibilidade de agentes de biocontrole no mercado nacional e internacional. Comparados com os agroquímicos, os agentes de biocontrole apresentam uma ação mais específica, ação de controle prolongada pelo estabelecimento da população microbiana no sítio do patógeno e biodegradação (CAPALBO & NARDO, 2000). Segundo Castro et al. (2001), *T. stromaticum* que é utilizado como antagonista a *Crinipellis pernicioso* (vassoura de bruxa) e é potencialmente seguro para organismos não-alvo, tais como, peixe *Hyphessobrycon scholzei* e ratos wistar, expostos diretamente ao fungo. Já Harman (2000), menciona que o isolado T-22 de *T. harzianum* usado em plantas de framboesa deslocou isolados nativos de *T. virens* e parte da microbiota.

A sobrevivência de *Trichoderma* spp. no solo é pouco documentada, sendo um ponto importante na sua ação como agente de biocontrole. Segundo Harman (2000), *T. virens* foi encontrado colonizando toda a extensão das raízes de plantas de framboesa, em solos com diferentes teores de matéria orgânica. GARNICA et al. (2004) observaram que diferentes isolados de rizobactérias promotoras de crescimento diminuíram em 28 %, no máximo, a população natural de *Trichoderma* spp. em substrato comercial Plantimax® utilizado para enraizamento de eucaliptos; notaram, ainda, uma tendência de restauração do nível populacional original do fungo a partir de 25 dias.

Trichoderma spp. apresentou variação populacional em solo com diferentes tratamentos de adubação orgânica (húmus de minhoca, esterco de gado, suíno e aves, além de solo não adubado) e também, ao longo do tempo (120 dias após a inoculação) demonstrando que, embora o manejo do solo influencie na sua sobrevivência e desenvolvimento, a população tende a voltar a concentração inicial, mantendo o equilíbrio natural (MATSUMURA et al., 2002).

1.5.2 – *Trichoderma* no desenvolvimento vegetal

A promoção de crescimento ocasionada por microrganismos do solo ocorre devido à ação de vários fatores ainda pouco esclarecidos. Pode envolver produção de hormônios vegetais, produção de vitaminas ou conversão de materiais a uma forma útil para a planta, absorção e translocação de minerais e controle de patógenos (MELO, 1996).

A promoção de crescimento em plantas promovida pelo isolado T-22 de *T. harzianum* está na sua habilidade de solubilizar muitos nutrientes importantes para a planta (ALTOMARE et al., 1999). No solo, macro e micronutrientes sofrem um equilíbrio dinâmico complexo de solubilização e insolubilização, fortemente influenciado pelo pH e pela microflora, os quais afetam sua acessibilidade para absorção pelas raízes das plantas. Dos nutrientes encontrados no solo, o ferro e o manganês receberam maior atenção pela sua solubilização, pela microflora e sua disponibilidade e influência nas doenças em plantas. O manganês é um microelemento essencial para diversas funções fisiológicas das plantas, inclusive crescimento e resistência a doenças (ALTOMARE et al., 1999). Com a aplicação de nitrogênio no solo juntamente com a utilização do isolado T-22 de *T. harzianum*, Harman (2000), constatou que inicialmente não ocorreram diferenças entre áreas com e sem nitrogênio, mas na presença do nutriente, plantas adultas apresentaram maiores médias de diâmetro de talos e rendimentos de grãos e silagem.

A interferência de *Trichoderma spp.* no crescimento de plantas e o aumento na produtividade ocorrem, segundo Harman et al. (2004), devido à sua capacidade em colonizar as raízes. O isolado T-22 de *T. harzianum* foi efetivo na indução de formação de raízes em tomateiro, tanto quanto um hormônio comercial, e ocorreu aumento no comprimento de raízes de soja e milho tratadas com o referido isolado e maior produtividade de pimentão comparados com testemunhas não tratadas (HARMAN, 2000). Sivan & Harman (1991), tratando sementes de milho e algodão com os isolados T12, T95 e T22 (fusão dos dois anteriores) de *T. harzianum* observaram que o isolado T22 promoveu crescimento das raízes, em relação à testemunha, de 31 % em milho e 60 % em algodoeiro. Chang et al. (1986), utilizando tratamento de solo com suspensão de conídios de *T. harzianum* observaram promoção de crescimento através do peso de massa seca superior à testemunha, no

feijoeiro de 10 %, no rabanete de 8 %, no tomateiro de 37 %, na pimenteira de 42 % e no pepineiro de 93 %. Também foram encontrados resultados positivos por Inbar et al. (1994), em tratamento de solo com isolado de *T. harzianum*, nos quais o pepineiro (aos 18 dias) e pimenteira (aos 30 dias) tiveram aumento significativo quanto à altura das plantas em 24 e 17 % e peso de massa seca em 25 e 29 %, respectivamente.

KLEIFELD & CHET (1992) obtiveram resultados positivos na promoção de crescimento do pepineiro (massa seca) por isolado de *T. harzianum*, tanto em solo autoclavado (26 %) quanto em solo não autoclavado (43 %). Já Ousley et al. (1993) observaram que apenas um dos dois isolados de *T. harzianum* apresentou melhor resultado (5 %) do que a testemunha quanto ao crescimento (massa seca) em alface.

Isolados de *Trichoderma* spp. podem agir como promotores de crescimento, mesmo na presença de fungos micorrízicos. Calvet et al. (1993), utilizando tratamentos com a aplicação dos fungos micorrízico *Glomus mosseae*, antagonista *T. aureoviride* e o fitopatógeno *Pythium ultimum* em *Tagetes erecta*, observaram que *G. mosseae* + *T. aureoviride* aumentaram o peso de massa seca em 100 % e a área foliar em 55 %, comparado com a testemunha.

A contribuição de *Trichoderma* spp. na germinação também é comprovada. Kleifeld & Chet (1992) observaram ação positiva de isolado de *T. harzianum* em tratamento de semente e de solo na germinação (5 dias após a semeadura) de feijão em 77 e 100%, rabanete em 58 e 100 %, tomate em 100 e 70 %, pimenta (12 dias após a semeadura) em 90% e pepineiro 90 e 100 %, respectivamente, o que evidenciou que as variações nos resultados, neste experimento, são decorrentes da forma de tratamento e da cultura. Já Ousley et al. (1993) observaram que alguns isolados de *T. harzianum* auxiliaram e outros inibiram a germinação de sementes de alface.

1.6 – Espermosfera e rizosfera

A semente, ao sair da fase de repouso ou dormência e iniciar o processo de germinação, exsuda compostos metabólicos que são responsáveis pelas interações planta-microrganismos e microrganismo-microrganismo (LUZ, 1998). De acordo com

Nelson (2004), a zona microbiológica dinâmica em torno de uma semente em processo de germinação no solo é chamada de espermosfera e pode estender-se de 1 a 20 mm da semente (KENNEDY, 1998). O termo espermosfera foi primeiramente mencionado por Slykhuis (1947) que observou o desenvolvimento de *Fusarium culmorum* em torno de sementes em processo de germinação e constatou que foi diferente daquele encontrado no solo (NELSON, 2004). Os fungos constituem a maior parte da biomassa microbiana da espermosfera, embora sejam encontrados em número menor do que as bactérias e, além desses, podem ser encontrados protozoários, microalgas e nematóides (LUZ, 1998). Segundo Short & Lacy (1974), a germinação de clamidósporos de *F. solani* f. sp. *pisi* ocorreu em torno de 5 a 7 mm da superfície de sementes de ervilha e, principalmente, no local onde ocorreu a emergência da radícula.

A interferência na microbiota da espermosfera pode estar relacionada a fatores como: umidade, temperatura, tipo de solo, exsudato da semente, fertilizantes, tratamento de sementes, microbiota e interação de fatores ambientais (LUZ, 1998; NELSON, 2004). A concentração de componentes específicos do exsudato na espermosfera é particularmente importante para o crescimento e desenvolvimento da microbiota, sendo comprovado para patógenos como *Fusarium* spp. que quanto maior a concentração de exsudatos, maior é a incidência da doença (NELSON, 2004).

O termo rizosfera foi usado, primeiramente, em 1904 para descrever a zona do solo sob a influência das raízes. A rizosfera é difícil de ser demarcada e é a área de maior atividade microbiana do solo, sendo considerada, para os microrganismos do solo, como um oásis no deserto (KENNEDY, 1998). De acordo com Fitter & Garbaye (1994), exceto na superfície, onde existe matéria orgânica, a maior atividade biótica no solo está na rizosfera, simplesmente porque não há origem de alimentos para os microrganismos no restante do solo. Bonkowski et al. (2000), observando biomassa microbiana, encontraram cerca de 1030 $\mu\text{g Cmic. g}^{-1}$ em solo rizosférico de cevada e 590 $\mu\text{g Cmic. g}^{-1}$ em solo não rizosférico. Segundo Sivan & Chet (1989), *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, inoculado em sementes de melão e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, em sementes de algodão, apresentaram germinação de clamidósporos em solo rizosférico de 43 a 50 % e em solo não rizosférico de 25 a 39%, respectivamente. Foram encontradas $4,2 \times 10^2$ e $1,5 \times 10^2$ UFC de *Trichoderma* spp. e $1,900 \times 10^2$ e 920×10^2 UFC de *Fusarium* spp., em solo

rizosférico e não rizosférico, respectivamente, no cultivo do meloeiro (SIVAN & CHET, 1989).

A rizosfera é uma zona de alterada diversidade microbiana tanto em número quanto na atividade dos organismos e complexa interação dos microrganismos com as raízes. O desenvolvimento das plantas é influenciado pela interação microrganismos-raízes, onde se encontram efeitos benéficos: simbiose, antibiose, biocontrole, fixação de nitrogênio, promoção de crescimento, estabilização do solo e disponibilidade de água; efeitos prejudiciais: doença e fitotoxicidade; efeitos neutros ou variáveis: fluxo de nutrientes, liberação de enzimas, alelopatia e competição (KENNEDY, 1998).

Assim como na espermosfera, existem fatores que influenciam a população microbiana na rizosfera, como propriedades químicas e físicas do solo, umidade, textura do solo, temperatura, pH, microbiota, tipo e quantidade de exsudatos liberados pela raiz (KENNEDY, 1998).

De acordo com Luz (1998), muitos microrganismos são encontrados igualmente na espermosfera e na rizosfera, sendo que a colonização da primeira por microrganismos geralmente apresenta-se como determinante para a colonização da segunda. Segundo Howell (2003), *Trichoderma* spp. adicionado no solo ou aplicado em sementes, cresce rapidamente acompanhando o desenvolvimento da raiz.

1.7 – Dinâmica populacional

A dinâmica populacional está relacionada a uma área da ecologia que trata da “dinâmica de populações” que é o estudo das variações das populações de seres vivos de determinada espécie, com relação ao tempo e ao espaço (ODUM, 1988).

Existem poucos relatos sobre a dinâmica populacional de fungos de importância agronômica, a campo, sendo que para *Fusarium* os trabalhos visam culturas comerciais. O ambiente está diretamente envolvido nas alterações da densidade populacional de fungos de solo, pois a sucessão soja-aveia-soja pode ter sido decisiva para a ocorrência do aumento da densidade populacional de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *F. oxysporum* e *F. graminearum*, em campo infestado naturalmente (FREITAS, 2003). Já no estudo da distribuição vertical e temporal de *Fusarium solani* em campo infestado naturalmente com *F. solani* f. sp. *glycines*,

observou-se que ocorreu maior densidade de inóculo na profundidade de 0 a 15 cm (localização das raízes) e flutuação populacional nos diferentes estádios de desenvolvimento da soja (RUPE et al., 1999). Quanto mais organizada e madura for a comunidade e/ou quanto mais estável o ambiente, menor será a amplitude das flutuações da densidade populacional, com relação ao tempo (ODUM, 1988).

1.8 - Ambiente protegido

No Brasil, os plásticos começaram a ser empregados na produção agrícola a partir da década de 70, porém, a partir da década de 80, essa atividade se expandiu rapidamente, com o sucesso econômico das primeiras estufas plásticas implantadas no cinturão verde de São Paulo e cultivadas com hortaliças de consumo nobre como tomate cereja, melão rendilhado e pimentão amarelo, e com flores (VIDA et al., 2004).

De acordo com dados referentes ao ano de 1998, cerca de 1.390 ha foram cultivados com hortaliças em estufas no Brasil, sendo São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul os estados com maior área de produção (VECCHIA & KOCK, 1999). No Rio Grande do Sul, segundo dados da EMATER – Regional de Santa Maria, em 1997, existiam cerca de 800 estufas (17ha) em 32 municípios, com probabilidade de expansão para outros municípios (DALSSASSO, 1997).

A utilização de estufas com filme de polietileno tem sido uma alternativa técnica e econômica para minimizar o efeito negativo das baixas temperaturas no período de inverno rigoroso no sul do Brasil (FERNANDES & MARTINS, 1999). De acordo com Zambolim et al. (1999), as hortaliças comumente cultivadas em ambiente protegido na Região Sul são: abobrinha, alface, coentro, melão, morango, pepino, pimentão, salsa e tomate.

Existem várias vantagens no cultivo em estufa, além da proteção contra os fatores climáticos externos, comparando-se com o convencional, tais como: maior precocidade, produtividade e melhor qualidade das hortaliças (ZAMBOLIM et al., 1999), colheitas na entressafra, controle mais eficiente de pragas e doenças e menor perda de adubos. A produtividade do cultivo em estufa comparada a “céu aberto” é maior, haja vista a cultura do pepineiro, que passa de 2.000 para 8.000 kg, por 1000 plantas e a do tomateiro, que passa de 4.000 para 9.000 kg, por 1000 plantas

(OLIVEIRA et al., 1995).

Dentre as preocupações dos produtores em ambiente protegido estão as doenças, que tendem a se tornar mais severas, quando comparadas ao cultivo convencional principalmente com relação a produção e/ou transplante de mudas que sofrem tombamento ocasionado por fungos como *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp. e formas especializadas de *Fusarium oxysporum* (GARCÍA-JIMÉNEZ, 1998). Os patógenos geralmente são beneficiados no ambiente protegido, pois os fatores ambientais geralmente são mais favoráveis ao seu desenvolvimento: o estado nutricional das plantas, as condições de irrigação, temperatura, a maior densidade de plantas e o monocultivo (VIDA et al., 2004). O clima na estufa é mais quente e úmido em relação ao cultivo convencional, e dentre os fatores ambientais, estes são os que mais influenciam o início do desenvolvimento de doenças em plantas (AGRIOS, 1997).

Os maiores danos têm sido aqueles causados por patógenos radiculares tais como as murchas, por *F. oxysporum* (VIDA et al., 2004). Segundo Carvalho et al. (2003), o cultivo do tomateiro muitas vezes apresenta um aspecto nômade devido ao acúmulo de inóculo de patógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causador da murcha de fusário. Essa doença também é citada por Zambolim et al. (2000) como sendo das principais do tomateiro, em ambiente protegido. Segundo Melo & Piccinin (1999) a murcha de fusário é uma das principais doenças do pepineiro em estufa no estado de São Paulo, concordando com Zambolim et al. (2000) que cita como a principal doença na cultura, em cultivo protegido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4. ed. London: Academic Press, 1997.

ALTOMARE, C. et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2926-2933, 1999.

ANDERLINI, R. **A cultura do tomate**. Litexa: Lisboa, 1982. 164p.

BAKER, R.; DICKMAN, M.B. Biological control with fungi. In: METTING JR; F.B. (Ed.) **Soil Microbial Ecology**: applications in agricultural and environmental management. New York: Dekker, 1993. p. 275-305.

BASTOS, C.N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauzeiro. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.

BEDENDO, I.P. Doenças vasculares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 838-847.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 1-5.

BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las cucurbitáceas**. Observar, identificar, luchar. Madrid, Barcelona, México: Mundi-prensa, 1996. 301p.

BONKOWSI, M. et al. Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. **European Journal Soil Biology**, v. 36, p. 135-147, 2000.

CALVET, C.; PERA, J.; BAREA, J.M. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. **Plant and Soil**, v. 148, p. 1-6, 1993.

CAMARGO, L. S. **As hortaliças e seu cultivo**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1992. 252p. (Série Técnica, n. 6).

CAPALBO, D.M.F.; NARDO, E.A.B. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. v. 2. p. 351-387.

CARVALHO, A.O.; JACOB NETO, J.; CARMO, M.G.F. Alterações do pH da solução nutritiva pela fonte de nitrogênio e seus efeitos sobre a colonização de plantas de tomate por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, suplemento, p. 295, 2003.

CASTRO, V.L.S.S. et al. Avaliação de risco ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v. 4, p. 18-24, 2001.

CHANG, YA-CHUN et al. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, v. 70, p. 145-148, 1986.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983.

COTXARRERA, L. et al. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 467-476, 2002.

DALSASSO, L.C.M. **Consumo de água do tomateiro (*Lycopersicum esculentum* M.) e do pepineiro (*Cucumis sativus* L.) cultivados em estufa plástica**. 1997. 148p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.

DATNOFF, L.E.; NEMEC, S.; PERNEZNY, K. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. **Biological Control**, v. 5, p. 427-431, 1995.

DE CAL, A.; GARCIA-LEPE, R.; MELGAREJO, P. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: histological studies of infected and induced tomato stems. **Phytopathology**, v. 90, p. 260-268, 2000.

EASTBURN, D.M.; BUTLER, E.E. Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. **Mycologia**, v. 83, p. 257-263, 1991.

FERNANDES, H.S.; MARTINS, S.R. Cultivo de alface em solo em ambiente protegido. **Informe Agropecuário**, v. 20, p. 56-63, 1999.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412p.

FITTER, A.H.; GARBAYE, J. Interaction between mycorrhizal fungi and other soil organisms. **Plant and Soil**, v. 159, p. 123-132, 1994.

FREITAS, T.M. Q. **Dano, dinâmica populacional e fontes de resistência genética a *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

FREITAS, S.S.; PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v. 17, p. 105-112, 1991.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Controle de doenças fúngicas em cultivos protegidos. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 94, 1998.

GARNICA, A.C. et al. Interação ecológica entre rizobactérias e a população natural de *Trichoderma* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, suplemento, p. 240, 2004.

GORDON, T.R.; MARTYN, R.D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 111-128, 1997.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, p. 377-392, 2000.

HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G.E.; CHET., I.; BAKER, R. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. **Phytopathology**, v. 71, p. 569-572, 1981.

HOWELL, C.R. et al. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. **The Journal of Cotton Science**, v. 1, p. 15-20, 1997.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, p. 4-10, 2003.

INBAR, J. et al. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 337-346, 1994.

JONES, J.B. et al. **Compendium of tomato diseases**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1993. 75p.

KATAN, T.; SHLEVIN, E.; KATAN, J. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. **Phytopathology**, v. 87, p. 712-719, 1997.

KENNEDY, A.C. The rhizosphere and spermosphere. In: SYLVIA, D.M. et al. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. p. 389-407.

KIMATI, H.; MINAMI, K. Doenças fúngicas do tomateiro. **Agroquímica – Defesa Vegetal & Animal**, n. 18, p. 4-9, 1982.

KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**, v. 144, p. 267-272, 1992.

KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 46-95.

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

LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. **Phytopathology**, v. 74, p. 1240-1244, 1984.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 61p.

LUZ, W.C. Ecologia da espermosfera. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1998. p.167-185.

MAO, W. et al. Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. **Crop Protection**, v. 17, p. 535-542, 1998.

MATSUMURA, A.T.S et al. Sobrevivência de *Trichoderma* sp. em solo com quatro tipos de adubação orgânica. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, suplemento, p. 133, 2002.

MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 135-156.

-----. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

-----. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261 – 295, 1996.

MELO, I.S.; FAULL, J.L. Tombamento de plântulas e controle biológico de *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000. v.2. p. 237-262.

MELO, I.S.; PICCININ, E. Toxic metabolites from culture filtrate of *Fusarium oxysporum* and its effects on cucumber cells and plantlets. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 2, p. 23-26, 1999.

MENEZES, M.; SOUZA, E.E.B. Avaliação de isolados de *Trichoderma* através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida. **Fitopatologia Brasileira**, n. 20, suplemento, agosto 1995.

MESSIAEN, C.M. et al. **Enfermedades de las hortalizas**. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, 1995. 576p.

MURAYAMA, S. **Horticultura**. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1995. 321p.

NELSON, E.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 271-309, 2004.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 434p.

OLIVEIRA, J.A.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C. Efeito do tratamento fungicida em sementes de pepino, visando o controle de alguns fungos de solo, causadores de tombamento. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 401-405, 1995.

OUSLEY, M.A.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 26, p. 277-285, 1993.

PAVLOU, G.C.; VAKALOUNAKIS, D.J. Biological control of root and stem rot of greenhouse cucumber, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, by lettuce soil amendment. **Crop Protection**, v. 24, p. 135-140, 2005.

PENG, H.X.; SIVASITHAMPARAM, K.; TURNER, D.W. Chlamydospore germination and *Fusarium* wilt of banana plantlets in suppressive and conducive soils are affected by physical and chemical factors. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1363-1374, 1999.

POERSCHKE, Paulo Renato. Dados referentes ao cultivo de tomateiros no Rio Grande do Sul. EMATER Regional Santa Maria, 2003. (Comunicação pessoal)

RAMIREZ, I.S. et al. ***Trichoderma harzianum* (Cepa A34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento**. Habana: INISAV, 1995. 36p. (CID-INISAV Boletín Técnico, 4).

REIS, A. et al. Registro da raça 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* no Espírito Santo e identificação de genótipos resistentes. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, suplemento, p. 279, agosto, 2003.

ROBERTS, D.P.; LUMSDEN, R.D. Effect of extracellular metabolites from *Gliocladium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v. 80, p. 461-465, 1990.

ROBERTS, P.; KUCHAREK, T. **Florida Plant Disease Management Guide: cucumber**. Cooperative Extension Service/Institute of Food and Agricultural Sciences/University of Florida, jan. 2005. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu>> Acesso em setembro 2005.

ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Ed. UFV, 1999. 45p. (Caderno Didático nº 56).

RUPE, J.C. et al. Vertical and temporal distribution of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* in fields with sudden death syndrome of soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 245-251, 1999.

SGANZERLA, E. **Nova agricultura – a fascinante arte de cultivar com os plásticos**. 6. ed. Guaíba: Agropecuária, 1997. 342p.

SHORT, G.E.; LACY, M.L. Germination of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* chlamydospores in the spermosphere of pea. **Phytopathology**, v. 64, p. 558-562, 1974.

SILVA, A.C.F. **Uso da radiação gama para obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai e *T. viride* Pers. Fr. com capacidade melhorada no controle ao *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary**. 1997. 198p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997.

SINGH, P.P. et al. Biological control of fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. **Phytopathology**, v. 89, p. 92-99, 1999.

SIVAN, A.; HARMAN, G.E. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 23-29, 1991.

SIVAN, A.; CHET I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, p. 198-203, 1989.

SMITH, S.N.; SNYDER, W.C. Germination of *Fusarium oxysporum* chlamydospores in soils favourable and unfavorable to wilt establishment. **Phytopathology**, v. 62, p. 273-277, 1972.

SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Review**, v. 3, p. 169-175, 1998.

TELLO, J.C.; LACASA, A. Evolución racial de poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas**, v. 14, p. 335-341, 1988.

TOKESHI, H. Doenças do tomateiro. In: KIMATI *et al.* (eds.) **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 803 p.

VAN WYK, J.P.H.; MOHULATSI, M. Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma viride*. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 21-23, 2003.

VECCHIA, P.T.D., KOCK, P.S. História e perspectivas da produção de hortaliças em ambiente protegido no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 20, n. 200/202, p. 5-10, 1999.

VIDA, J.B. et al. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 355-372, 2004.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1061-1070, 1999.

ZAMBOLIM, L. et al. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. **Informe Agropecuário**, v. 20, n. 200/202, p. 114-125, 1999.

ZAMBOLIM, L. et al. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. In: ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., COSTA, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas-hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. p. 373-407.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. APS Press: St. Paul, Minnesota, 1996. 57p.

CAPÍTULO II

DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE *Trichoderma* E *Fusarium* EM SOLO CULTIVADO COM PEPINEIRO E TOMATEIRO, EM HORTA E ESTUFA.

RESUMO

Fungos como *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. fazem parte da microbiota de uma gama de solos, sendo alvo de pesquisas sobre sua ação como fitopatógeno e agente de biocontrole, respectivamente. Não existem relatos sobre a distribuição espacial dos dois gêneros em hortas e estufas para o plantio de olerícolas. Os objetivos desse trabalho foram estudar a distribuição espacial dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico, no cultivo do pepineiro e tomateiro, em horta e estufa; e quantificar e identificar os isolados de *Fusarium* spp. patogênicos as duas culturas. Para isso, foram realizadas 40 coletas de solo rizosférico (20 raízes de pepineiro e 20 de tomateiro) e 20 de solo não rizosférico, em horta e estufa. As suspensões dos solos foram diluídas, plaqueadas em meio BDA e os fungos identificados e avaliada sua presença ou ausência. Após, foi realizado teste de patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp. encontrados nas coletas, sendo 118 para o tomateiro e 119 para o pepineiro. Para o tomateiro encontraram-se diferenças significativas quando se comparou o número de pontos de coleta com a presença de *Trichoderma* em solo rizosférico (95%) com solo não rizosférico (10%), em estufa. O mesmo ocorreu para o pepineiro, pois *Trichoderma* foi encontrado em 45% das coletas de solo rizosférico comparado a 10 % em solo não rizosférico. Comparando a presença de *Trichoderma* e *Fusarium* nos diferentes pontos de coleta, tanto no cultivo do tomateiro como do pepineiro, foi encontrada diferença significativa apenas em solo não rizosférico de estufa, pois foram encontrados em 10 e 55 % dos pontos de coleta, respectivamente. Quanto ao teste de patogenicidade foram encontrados cinco isolados de *Fusarium* sp. patogênicos ao tomateiro e 6 ao pepineiro. Concluiu-se que *Trichoderma* e *Fusarium* fazem parte da microbiota rizosférica do pepineiro e o tomateiro, em horta e estufa; a população de *Trichoderma* se concentra em solo rizosférico; e pequena percentagem dos isolados de *Fusarium* foi patogênica ao tomateiro e pepineiro, tendo sido identificados como da espécie *Fusarium oxysporum*.

Palavras chave: olerícolas, rizosfera, ambiente protegido.

2.1- INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e o pepineiro (*Cucumis sativus* L.) fazem parte das principais olerícolas cultivadas em estufa e horta no Brasil. Um dos problemas no cultivo dessas olerícolas são as doenças ocasionadas por fungos de solo, como as murchas, causadas por *Fusarium oxysporum* Schlecht. Um método alternativo utilizado contra fungos de solo é o controle biológico a base de *Trichoderma* spp. que vem sendo empregado em pequenas áreas como hortas e estufas devido aos problemas econômico, de saúde humana, ambiental e deficiência de controle no ambiente solo, enfrentados pelos produtores na utilização de agroquímicos.

Fungos como *Fusarium* e *Trichoderma* fazem parte da microbiota de uma gama de solos, sendo alvo de pesquisas sobre sua ação como fitopatógeno e agente de biocontrole, respectivamente. *Fusarium* é um dos gêneros mais estudados na atualidade devido aos sérios problemas econômicos ocasionados pela sua ação como fitopatógeno e ampla distribuição geográfica. Os padrões de distribuição e densidade populacional podem estar relacionados ao clima (BURGESS et al., 1988), temperatura, tipo de vegetação, microbiota, nutrientes e tipo de solo (SAREMI et al., 1999).

Os estudos referentes à distribuição espacial e populacional de *Fusarium* são relacionados a áreas de culturas comerciais, como de soja e trigo. *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* apresentou aumento populacional, em solo não rizosférico, pela sucessão soja – aveia – soja (FREITAS, 2003), sendo observada flutuação populacional desse patógeno em solo rizosférico de soja, durante os diferentes estágios de desenvolvimento da cultura tendo seu ápice no estágio V3 (LUO et al., 2001). Segundo Rupe et al. (1999) a maior concentração de propágulos de *Fusarium* spp. foi encontrada em até 15 cm de profundidade, em solo infestado naturalmente com o fitopatógeno. Para o trigo, foi observada variação sazonal na população de *Fusarium* sp. em solo não rizosférico (BATEMAN & MURRAY, 2001). A preocupação em conhecer a distribuição espacial de patógenos de solo ocorre principalmente para grandes culturas, não sendo encontrados relatos de pequenas áreas, como hortas e estufas, visando o cultivo de olerícolas.

Trichoderma spp. tem sido utilizado como agente de biocontrole contra uma

gama de fitopatógenos causadores de doenças em várias culturas (SIVAN & CHET, 1989; TSAHOURIDOU & THANASSOULOPOULOS, 2002). Pesquisas mostram a existência de *Trichoderma* nativo na rizosfera de algumas culturas, como citrus (GESHEVA, 2002), batata (TSAHOURIDOU & THANASSOULOPOULOS, 2002), algodoeiro (SIVAN & CHET, 1989) e tomateiro (LARKIN & FRAVEL, 1998). O isolamento de possíveis antagonistas geralmente ocorre em solo rizosférico devido à habilidade dos isolados em habitar esse ambiente (COOK, 1993). Já para fungos formadores de escleródios, muitas vezes utiliza-se a própria estrutura de resistência como isca para a retirada de antagonistas de solo não rizosférico (ETHUR et al., 2005). Embora existam relatos da existência de *Trichoderma* em solo rizosférico e não rizosférico, não se encontram dados sobre sua distribuição espacial em áreas de cultivo.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a distribuição espacial dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico, no cultivo do pepineiro e tomateiro, em horta e estufa, e quantificar e identificar os isolados de *Fusarium* sp. patogênicos às duas culturas.

2.2- MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 – Distribuição espacial dos gêneros fúngicos *Trichoderma* e *Fusarium*

2.2.1.1 - Local das coletas

As coletas de solo foram realizadas em estufa e horta, localizadas na área experimental do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A escolha dos locais se deu por serem utilizados em experimentos com sucessivos cultivos de olerícolas, principalmente tomateiro e pepineiro, e ter-se observado sintomas da ocorrência de murcha de fusário em ambas as culturas.

2.2.1.1.1 – Descrição da estufa

A estufa utilizada no experimento possuía uma área de 200 m² (25 m x 8 m) e um pé-direito de 2,5 m. A estrutura era do tipo metálica e teto em arco, coberta por filme de PVC transparente provido de um sistema antigotejo.

2.2.1.2 – Implantação do experimento

O experimento foi desenvolvido no período de dezembro de 2002 a fevereiro de 2003.

O tomateiro e o pepineiro utilizados foram da variedade cereja e de conserva, respectivamente, sendo que as sementes (Bionatur®) não receberam qualquer tipo de tratamento.

As mudas de tomateiro e pepineiro foram cultivadas em bandejas de isopor de 128 células, em substrato comercial (Plantimax®), em estufa. Aos 30 dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para 8 camalhões, em estufa e horta.

Os camalhões mediam 19 m de comprimento por 45 cm de largura com intervalo de 55 cm entre os mesmos. Em cada camalhão, foram plantadas intercaladas, oito mudas de tomateiro e de pepineiro, em intervalos de 50 cm, totalizando 16 plantas. O espaço de 50 cm deixado entre as plantas foi necessário para não ocorrer contato do sistema radicular entre as duas culturas. Ao longo dos oito camalhões foram transplantadas 64 mudas de tomateiro e 64 de pepineiro, em estufa e horta.

As duas olerícolas foram cultivadas intercaladamente para poder observar-se a ocorrência de *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico de ambas culturas, em toda a extensão das áreas estudadas.

As plantas da estufa receberam manejo comumente empregado no cultivo local, ou seja, os camalhões foram cobertos por plástico preto (para evitar o desenvolvimento de plantas daninhas) com irrigação diária de 40 min por mangueiras com sistema de gotejamento.

Os camalhões da horta não foram cobertos por plásticos e a irrigação foi de acordo com a precipitação local, salvo os sete dias iniciais quando as mudas foram regadas diariamente.

Foram coletadas amostras de solo da estufa e da horta e encaminhadas ao Laboratório Central de Análises de Solos (UFSM), para análise química.

2.2.1.3 – Coletas

Para poder observar a distribuição espacial dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* foram realizadas 20 coletas de solo rizosférico do tomateiro e do pepineiro, e mais 20 de solo não rizosférico, para estufa e horta (Figura 1).

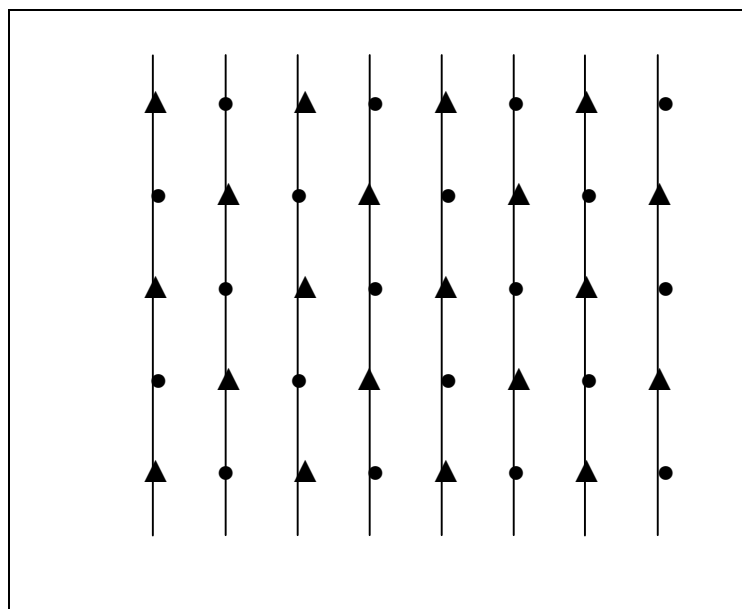


Figura 1 – Arranjo mostrando os camalhões com os pontos de coleta de solo rizosférico do pepineiro (▲) e tomateiro (●), em estufa e horta. Santa Maria – RS.

Para os 80 pontos de coleta de solo rizosférico (horta e estufa) previamente estipulados, os pepineiros e tomateiros foram retirados do solo, aos 40 dias após o transplante, com o auxílio de uma pá de corte tendo-se cuidado em retirar a raiz com o solo aderido, retirando-se manualmente o solo mais distante das raízes. As raízes das plantas juntamente com o solo aderido foram colocadas em sacos plásticos e, após, a parte aérea foi separada com a utilização de um estilete.

As 40 amostras do solo não rizosférico (horta e estufa) foram retiradas com um trado, que foi imerso em solução com hipoclorito 75 %, no intervalo das coletas. As coletas foram realizadas na beirada do camalhão entre um pepineiro e tomateiro

(distante das raízes), na profundidade de 10 cm. Segundo MOORE-LANDECKER (1996) os fungos são mais abundantes nos primeiros 10 cm do solo, sendo que seu número e diversidade decrescem com o aumento da profundidade.

Os sacos plásticos contendo as amostras de solo não rizosférico e de raízes com solo rizosférico foram conduzidas ao Laboratório de Fitopatologia da UFSM.

2.2.1.4 – Avaliação da presença dos fungos

Diluições das amostras de solo rizosférico e não rizosférico foram realizadas para a avaliação da presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium*.

O solo rizosférico foi obtido das raízes dos tomateiros e pepineiros, agitando-se as raízes dentro dos sacos plásticos onde estavam acondicionadas, até a retirada total do solo.

Para as suspensões foram pesados 10 g de solo rizosférico e não rizosférico de cada coleta e foram adicionados em frascos de vidro contendo 90 mL de água destilada e esterilizada. Os frascos foram colocados em agitador mecânico durante 30 min. A partir desta solução original foi realizada diluição de 20 vezes, ou seja, 5 mL da solução foram acrescentados em frasco com 95 mL de água destilada e esterilizada. Da diluição uma alíquota de 1 mL foi espalhada em três placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). Antes do meio de cultura ser plaqueado acrescentou-se cloranfenicol 10% (5 mL/L). As placas foram incubadas em câmara climatizada a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante três dias.

Após o período de incubação os fungos encontrados nas placas foram identificados, em nível de gênero, através de microscópios estereoscópico e ótico, com base em bibliografia especializada (BARNETT & HUNTER, 1999).

Além da identificação dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* nas coletas de solo rizosférico e não rizosférico, foi realizado o isolamento e a identificação dos fungos totais encontrados nas placas de Petri para serem utilizados em testes de biocontrole. Os fungos foram acondicionados em tubos de ensaio contendo meio BDA e mantidos em refrigeração a 5 °C.

2.2.1.5- Registro dos dados meteorológicos

A temperatura e umidade relativa do ar foram medidas diariamente por termohigrógrafo instalado dentro da estufa e para horta os dados foram retirados na Estação Meteorológica da UFSM, assim como a precipitação local.

As médias de temperatura (T_m) e umidade relativa do ar (UR_m) foram calculadas de acordo com as fórmulas $T_m = (T_9 + 2.T_{21} + T_{min} + T_{máx})/5$ e $UR_m = (UR_9 + UR_{15} + 2UR_{21})/4$.

2.2.1.6 - Análise estatística

Utilizou-se o teste dos sinais para comparar o número de pontos de coleta que apresentaram os fungos *Trichoderma* e *Fusarium* quanto à localização no solo (rizosférico e não rizosférico) e a área (estufa e horta), no cultivo do tomateiro e pepineiro. O teste dos sinais é binomial e utilizado para comparar elementos entre si com características semelhantes, onde os dados consistem de n pares de observações (x_i, y_i) que são pareados de acordo com suas afinidades. A presença dos fungos *Trichoderma* e *Fusarium*, nos pontos de coleta, foi considerada positivo (+) e a ausência negativo (-) e a comparação ocorreu entre os positivos. Quando n (número de coletas) foi menor do que 20 comparou-se direto com 5% e quando foi maior, realizou-se a aproximação normal e utilizou-se $5\% = 1,96$ (CAMPOS, 1983).

2.2.2- Patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp. ao tomateiro e pepineiro

Para esse teste foram utilizados 46 isolados de *Fusarium* spp. encontrados em solo não rizosférico para as duas culturas, mais 72 e 73 isolados retirados de solo rizosférico para o tomateiro e pepineiro, respectivamente.

2.2.2.1 – Produção de inóculo

Foram repicados 118 isolados de *Fusarium* spp. para o tomateiro e 119 para

o pepineiro em placas de Petri contendo meio NS (NASH & SNYDER, 1962). O meio seletivo para *Fusarium* consiste de 20 g de agar, 15 g de peptona, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de KH_2PO_4 e 1 g de quintono em 1 L de água. Antes do meio de cultura ser plaqueado acrescentou-se cloranfenicol 10% (5mL/L). As placas de Petri contendo os isolados de *Fusarium* spp. foram incubadas em câmara climatizada a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante 7 dias.

Após o período de incubação, foram adicionados cerca de 3 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de Petri e a superfície do meio foi raspada levemente com o auxílio de uma alça de Drigalski liberando micélio e conídios. Com auxílio da câmara de Neubauer determinou-se o número de conídios em 10^6 por mL.

2.2.2.2 – Teste de patogenicidade

Para a realização desse teste foram utilizadas sementes de tomateiro (cereja) e pepineiro (conserva), semeadas em substrato comercial em bandejas plásticas medindo 29 cm por 43 cm, sem tratamento de sementes. Após, as bandejas foram acondicionadas em câmara de crescimento, com temperaturas de $26 \pm 2^\circ C$, com fotoperíodo de 12 h.

Aos 14 dias após a semeadura, 354 plântulas de tomateiro e 357 de pepineiro foram transplantadas para bandejas de isopor de 128 células preenchidas com substrato comercial Plantimax®. Após o transplante, foi inoculado 1 mL da suspensão contendo conídios e fragmentos de micélio dos isolados de *Fusarium* spp., com o auxílio de uma pipeta volumétrica, no colo das plântulas, em direção as raízes (ROSE et al., 2003). Para o tratamento testemunha do tomateiro e pepineiro foi aplicado 1mL de água destilada e esterilizada. Foram realizadas três repetições (três plântulas) por tratamento. As bandejas de isopor foram acondicionadas em câmara de crescimento, com temperaturas de $26 \pm 2^\circ C$ e fotoperíodo de 12 h.

A avaliação foi realizada aos 15 e 30 dias após a inoculação do patógeno e constou da observação dos sintomas: plântulas tombadas, folhas amareladas e murchas e colo necrosado.

As raízes ou plântulas inteiras sintomáticas foram coletadas, imersas durante 1 min no álcool (70 %), hipoclorito de sódio (0,5 %), três imersões em água destilada e esterilizada e deixadas para secar sobre papel filtro. Após, foram colocadas em

placas de Petri contendo meio NS para ocorrer a confirmação do agente causador da doença. Os isolados de *Fusarium* spp. patogênicos às duas culturas foram reisolados das plantas sintomáticas e preservados em tubos de ensaio contendo meio NS e mantidos em temperatura de 5 °C.

Os isolados patogênicos foram encaminhados ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da UFSM para a identificação em nível de espécie. A identificação ocorreu através de análise morfológica com base em Nelson et al. (1983) e Ventura (2000).

2.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 – Distribuição espacial dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium*

Os gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* foram encontrados nos solos rizosférico e não rizosférico, no cultivo do tomateiro e pepineiro (Figura 2), nos ambientes estufa e horta.

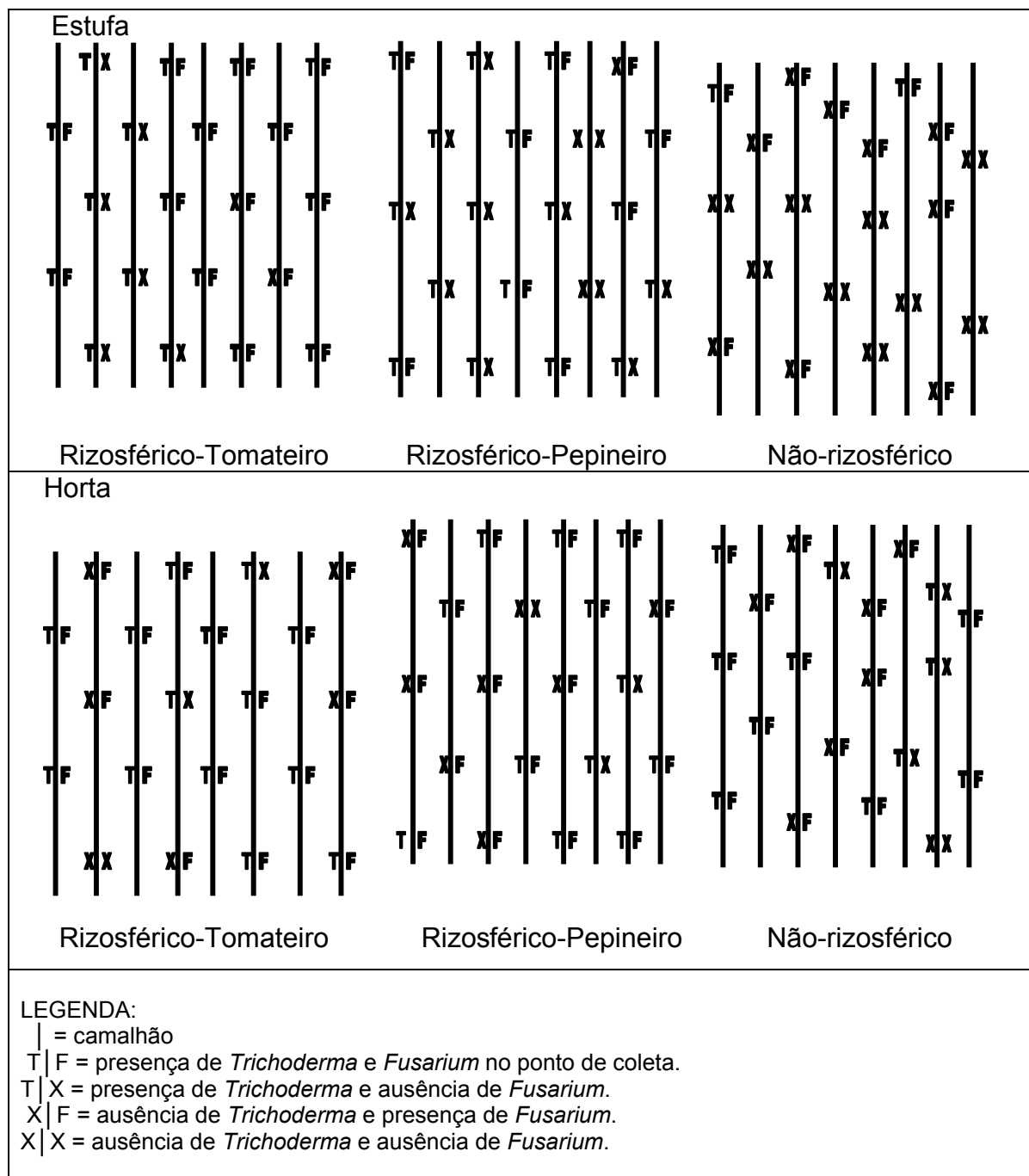


Figura 2 – Distribuição espacial dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solos rizoférico e não rizoférico, no cultivo do pepineiro e tomateiro, nos ambientes estufa e horta. Santa Maria – RS.

No cultivo do tomateiro, encontraram-se diferenças significativas quando se comparou o número de pontos de coleta com a presença de *Trichoderma* em solo rizoférico (19 pontos – 95%) com solo não rizoférico (2 pontos – 10%), em estufa (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre solo rizosférico e não rizosférico quanto ao número de pontos de coleta que apresentaram os fungos *Trichoderma* ou *Fusarium*, no cultivo do tomateiro ou pepineiro, em estufa ou horta. Santa Maria – RS.

Solo	Tomateiro - estufa							
	<i>Trichoderma</i>				<i>Fusarium</i>			
	n	(+)	(-)	αcal	N	(+)	(-)	αcal
Rizosférico	20	19	1	3,70 ^s	20	13	7	0,41 ^{ns}
Não rizosférico	20	2	18		20	11	9	
Solo	Tomateiro - horta							
	<i>Trichoderma</i>				<i>Fusarium</i>			
	n	(+)	(-)	αcal	N	(+)	(-)	αcal
Rizosférico	20	14	6	0,39 ^{ns}	20	17	3	0,35 ^{ns}
Não rizosférico	20	12	8		20	15	5	
Solo	Pepineiro - estufa							
	<i>Trichoderma</i>				<i>Fusarium</i>			
	n	(+)	(-)	αcal	N	(+)	(-)	αcal
Rizosférico	20	17	3	0,04 ^s	20	9	11	0,41 ^{ns}
Não rizosférico	20	2	18		20	11	9	
Solo	Pepineiro - horta							
	<i>Trichoderma</i>				<i>Fusarium</i>			
	n	(+)	(-)	αcal	N	(+)	(-)	αcal
Rizosférico	20	12	8	0 ^{ns}	20	17	3	0,35 ^{ns}
Não rizosférico	20	12	8		20	15	5	

- ns – não significativo para $p < 0,05$; s – significativo; αcal = α calculado.

- (+) presença do fungo nos pontos de coleta, (-) ausência do fungo nos pontos de coleta.

No cultivo do pepineiro, em estufa, também foram encontradas diferenças significativas quanto à presença de *Trichoderma* quando comparado o solo rizosférico (17 pontos – 85 %) com solo não rizosférico (2 pontos – 10 %) (Tabela 1). Na comparação entre solo rizosférico e não rizosférico Sivan & Chet (1989) encontraram $5,1 \times 10^6$ e $2,0 \times 10^6$ UFC g^{-1} de solo de *Trichoderma* spp., respectivamente, confirmando maior preferência do fungo pela rizosfera. A rizosfera é um local de grande diversidade, onde ocorre aumento na atividade e número de microrganismos e apresenta complexa interação dos microrganismos com as raízes (KENNEDY, 1998).

Não ocorreram diferenças significativas no número de pontos de coleta com a presença de *Trichoderma* spp. em solo rizosférico e não rizosférico, em horta, tanto para o pepineiro quanto para o tomateiro (Tabela 1). Esse fato pode ser explicado devido a incorporação de restos culturais no solo, pois a área, que continha tomates e plantas daninhas, foi capinada três semanas antes do plantio das mudas de pepineiro e tomateiro. Segundo Howell (2003), espécies de *Trichoderma* são facilmente isoladas de solos com restos de vegetais e outras formas de matéria

orgânica.

Tanto para o tomateiro como para o pepineiro, em solo não rizosférico também foi encontrada diferença significativa quanto à presença de *Trichoderma* nos pontos de coleta, nos diferentes ambientes: estufa (2 pontos – 10 %) e horta (12 pontos – 60 %) (Tabela 2). Esse fato pode ter ocorrido devido a falta de umidade que permaneceu entre os camalhões, na estufa, pois o sistema de irrigação por gotejamento umedece apenas a região central e as coletas foram realizadas na beirada do camalhão, mostrando que a irrigação é mais localizada em ambiente protegido do que a céu aberto (ZAMBOLIM et al., 2000). O ressecamento do solo foi observado no momento em que as coletas foram realizadas, pois houve dificuldade no manuseio do trado, o que não ocorreu em solo de horta.

Tabela 2 – Comparação entre os ambientes estufa e horta, quanto ao número de pontos de coleta de solo rizosférico e não rizosférico que apresentaram os fungos *Trichoderma* ou *Fusarium* no cultivo do pepineiro ou tomateiro. Santa Maria – RS.

Ambiente	Pepineiro – <i>Trichoderma</i>							
	Solo rizosférico				Solo não rizosférico			
	n	(+)	(-)	α cal	n	(+)	(-)	α cal
Estufa	20	17	3	0,93 ^{ns}	20	2	18	0,65 ^s
Horta	20	12	8		20	12	8	
	Pepineiro - <i>Fusarium</i>							
	Solo rizosférico				Solo não rizosférico			
	n	(+)	(-)	α cal	n	(+)	(-)	α cal
Estufa	20	9	11	1,56 ^{ns}	20	11	9	0,78 ^{ns}
Horta	20	17	3		20	15	5	
	Tomateiro - <i>Trichoderma</i>							
	Solo rizosférico				Solo não rizosférico			
	n	(+)	(-)	α cal	n	(+)	(-)	α cal
Estufa	20	19	1	0,87 ^{ns}	20	2	18	0,65 ^s
Horta	20	14	6		20	12	8	
	Tomateiro - <i>Fusarium</i>							
	Solo rizosférico				Solo não rizosférico			
	n	(+)	(-)	α cal	n	(+)	(-)	α cal
Estufa	20	13	7	0,73 ^{ns}	20	11	9	0,78 ^{ns}
Horta	20	17	3		20	15	5	

- ns – não significativo para $p < 0,05$; s – significativo; α cal = α calculado.

- (+) presença do fungo nos pontos de coleta, (-) ausência do fungo nos pontos de coleta.

Segundo observações de Sivan & Chet (1989), ocorreram diferenças na colonização das raízes do meloeiro, algodoeiro e tomateiro, por *T. harzianum* em solo irrigado e não irrigado, sendo que na escassez de água, mesmo em solo rizosférico, o agente de biocontrole apresentou redução populacional em torno de

40%, demonstrando dificuldade em se manter no ambiente.

Os nutrientes encontrados no solo de horta podem ser outra variável que interferiu para o melhor desenvolvimento de *Trichoderma* nesse ambiente. Os solos dos dois ambientes apresentaram características químicas diferentes, pois em solo de horta ocorreu maior concentração de ferro e potássio, além de matéria orgânica, embora tenha sido encontrada menor concentração de fósforo (Quadro 1). A baixa concentração de ferro no solo acarretou dificuldade no desenvolvimento e estabelecimento de *T. hamatum* na rizosfera de plantas de ervilha (HUBRARD et al., 1983).

Características	Horta	Estufa
Textura	3	4
Argila (% m/V)	27	24
pH (água)	5,5	6,2
Mat. Orgânica (% m/V)	3,4	2,5
P (mg/L)	37,7	69,5
K (mg/L)	152,0	38,0
Ca (cmol _c /L)	6,4	7,9
Mg (cmol _c /L)	2,6	2,9
Al (cmol _c /L)	0,0	0,0
CTC (cmol _c /L)	9,4	10,9
S (mg/L)	-	-
Na (mg/L)	-	-
Fe (mg/L)	210,7	115,3
Mn (mg/L)	8,2	-
Cu (mg/L)	1,7	1,3
Zn (mg/L)	2,9	6,0
B (mg/L)	-	-

Quadro 1 – Características químicas dos solos de horta e estufa, onde ocorreram as coletas de solo rizosférico e não rizosférico. Santa Maria – RS.

Isolados de *Fusarium* spp. foram encontrados em horta e estufa, em solo rizosférico e não rizosférico, mas tanto na cultura do tomateiro como na do pepineiro não foram encontradas diferenças significativas quanto ao número de coletas que apresentaram o fitopatógeno (Tabela 2).

Quanto à comparação entre *Trichoderma* e *Fusarium* nos diferentes pontos de coleta, tanto no cultivo do tomateiro como do pepineiro, encontraram-se diferenças significativas apenas em solo não rizosférico de estufa (Tabela 3), pois os dois gêneros foram encontrados em 2 (10 %) e 11 (55 %) pontos de coleta, respectivamente. Pode-se inferir que o fitopatógeno apresentou maior capacidade

de resistir ao ambiente, já que o solo mostrava-se mais seco nesse ambiente, e isso pode estar relacionado com a formação de clamidósporos. Os clamidósporos representam a principal forma de sobrevivência de espécies de *Fusarium* no solo, pois sobrevivem à ação de microrganismos e podem permanecer dormentes por longos períodos de tempo na ausência do hospedeiro (AMORIM, 1995; ZAMBOLIM et. al., 2000).

Tabela 3 – Comparação entre os gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* quanto ao número de pontos de coletas nos quais foram encontrados em solo rizosférico ou não rizosférico, no cultivo do tomateiro ou pepineiro, em estufa ou horta. Santa Maria-RS.

Fungos	Tomateiro - estufa							
	Solo rizosférico				Solo não rizosférico			
	n	(+)	(-)	αcal	n	(+)	(-)	αcal
<i>Trichoderma</i>	20	19	1	1,06 ^{ns}	20	2	18	0,11 ^s
<i>Fusarium</i>	20	13	7		20	11	9	
Fungos	Tomateiro - horta							
	Solo rizosférico				Solo não rizosférico			
	n	(+)	(-)	αcal	n	(+)	(-)	αcal
<i>Trichoderma</i>	20	14	6	0,53 ^{ns}	20	12	8	0,58 ^{ns}
<i>Fusarium</i>	20	17	3		20	15	5	
Fungos	Pepineiro - estufa							
	Solo rizosférico				Solo não rizosférico			
	n	(+)	(-)	αcal	n	(+)	(-)	αcal
<i>Trichoderma</i>	20	17	3	1,56 ^{ns}	20	2	18	0,11 ^s
<i>Fusarium</i>	20	9	11		20	11	9	
Fungos	Pepineiro - horta							
	Solo rizosférico				Solo não rizosférico			
	n	(+)	(-)	αcal	n	(+)	(-)	αcal
<i>Trichoderma</i>	20	12	8	0,93 ^{ns}	20	12	8	0,58 ^{ns}
<i>Fusarium</i>	20	17	3		20	15	5	

- ns – não significativo para $p < 0,05$; s – significativo; αcal = α calculado.

- (+) presença do fungo nos pontos de coleta, (-) ausência do fungo nos pontos de coleta.

Mesmo com as diferenças encontradas entre *Trichoderma* e *Fusarium* quanto à sua distribuição no solo, observou-se que estiveram ausentes, simultaneamente, em nove pontos de coleta (45 %) de solo não rizosférico, em estufa (Figura 1). O mesmo ocorreu apenas em um ponto de coleta (5 %) na horta, demonstrando que a forma de irrigação utilizada no ambiente protegido pode ter interferido para a maior ausência dos dois gêneros fúngicos nesse ambiente. Além disso, a temperatura média encontrada na estufa foi de 30 °C (Figura 3), mais alta do que a encontrada na horta que ficou em 25 °C (Figura 4), sendo que essa diferença pode ter

influenciado na ausência dos fungos em solo não rizosférico, na estufa, pois, aliada a forma de irrigação, pode ter acarretado maior ressecamento do solo.

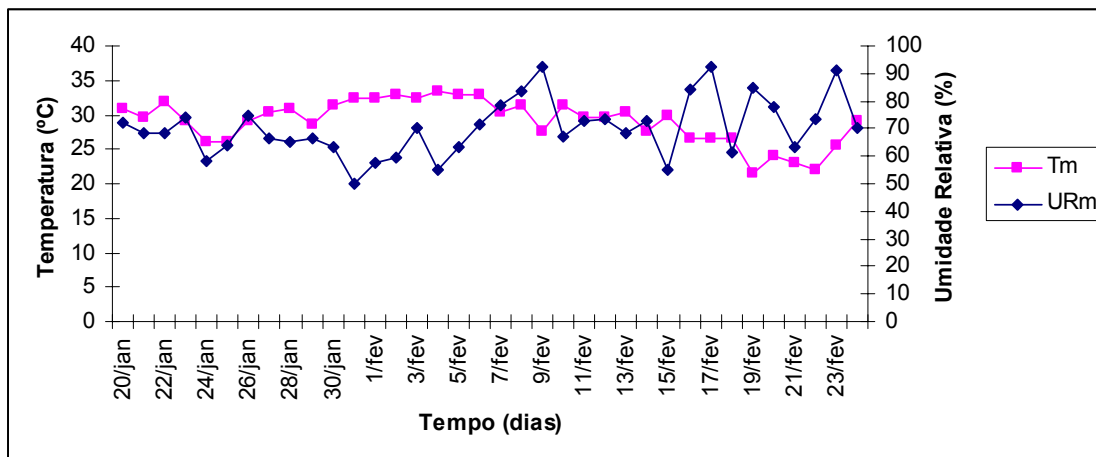


Figura 3 – Médias de temperatura (Tm) e Umidade relativa do ar (URm), em estufa, no período de janeiro a fevereiro de 2003. Santa Maria – RS.

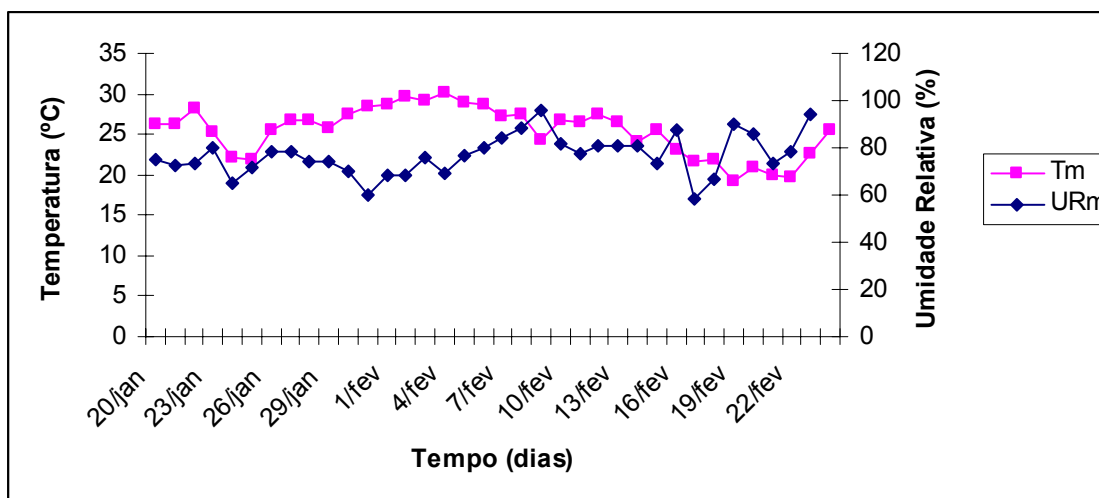


Figura 4 – Médias de temperatura (Tm) e Umidade relativa do ar (URm), em horta, no período de janeiro a fevereiro de 2003. Santa Maria – RS.

Trichoderma e *Fusarium* foram constantemente encontrados em solo rizosférico do tomateiro e pepineiro, demonstrando serem habilidosos habitantes da rizosfera. Gesheva (2002) também encontrou os dois gêneros fúngicos na rizosfera de citrus e Sivan & Chet (1989) observaram a competição entre *T. harzianum* e *F. oxysporum* na colonização da rizosfera do meloeiro, algodoeiro e tomateiro.

2.3.2 – Patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp. ao tomateiro e pepineiro

Dos 118 isolados de *Fusarium* spp. utilizados no teste de patogenicidade para o pepineiro foram encontrados três isolados em solo rizosférico de estufa e de horta, totalizando seis isolados patogênicos para essa cultura (5%). Já para o tomateiro, dos 119 isolados de *Fusarium* spp. foram patogênicos apenas três isolados de solo rizosférico de estufa e dois de solo rizosférico de horta, totalizando cinco isolados (4%). Não foram encontrados isolados patogênicos às duas culturas em solo não rizosférico, tanto de horta quanto de estufa.

Os isolados patogênicos às duas culturas foram identificados como *Fusarium oxysporum*, sendo que o principal sintoma observado nas mudas foi de murcha generalizada.

Observou-se que os isolados de *F. oxysporum* patogênicos ao tomateiro e pepineiro foram encontrados em solo rizosférico e que as plantas hospedeiras (coletadas) não manifestavam sintomas da doença. Pôde-se constatar que, apesar da presença do hospedeiro e do patógeno, o meio ambiente teve posição decisiva para que não ocorresse doença. Segundo Bedendo (1995), os fatores ambientais podem determinar o grau de predisposição do hospedeiro, influenciando desde o estabelecimento da doença numa cultura até o desencadeamento da epidemia.

A maior parte dos isolados de *Fusarium* spp. (95 %), retirados inclusive de solo rizosférico, não foram patogênicos ao tomateiro e pepineiro, sendo que os mesmos podem ser de espécies não patogênicas ou *formae speciales* diferentes. *Fusarium* spp. é um patógeno difícil de ser controlado devido a sua sobrevivência na rizosfera de plantas não hospedeiras e saprofiticamente em restos culturais (LUO et al., 2001; NETTO & DHINGRA, 1999).

2.4- CONCLUSÕES

Concluiu-se que:

- *Trichoderma* e *Fusarium* fazem parte da microbiota rizosférica do pepineiro e o tomateiro, em horta e estufa;

- a população de *Trichoderma* se concentra em solo rizosférico;
- pequena percentagem dos isolados de *Fusarium* foi patogênica ao tomateiro e pepineiro, tendo sido identificados como da espécie *Fusarium oxysporum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, L. Sobrevivência do Inóculo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1. cap. 13. p. 246-267.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth edition. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218p.

BATEMAN, G.L.; MURRAY, G. Seasonal variations in populations of *Fusarium* species in wheat-field soil. **Applied Soil Ecology**, v. 18, n. 2, p. 117-128, 2001.

BEDENDO, I.P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1. cap. 18 p. 331-341.

BURGESS, L.W. et al. Distribution of *Fusarium* species in sections *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum* and *Discolor* recovered from grassland, pasture and pine nursery soils of eastern Australia. **Mycologia**, v. 80, p. 815-824, 1988.

CAMPOS, H. **Estatística experimental não-paramétrica**. 4. ed. Piracicaba: USP/ESALQ, 1983. 349p.

COOK, R.J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogen. **Annual Review Phytopathology**, v. 31, p. 53-80, 1993.

ETHUR, L.Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n.2, p. 127-133, 2005.

FREITAS, T.M. Q. **Dano, dinâmica populacional e fontes de resistência genética a *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

GESHEVA, V. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, p. 85-88, 2002.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n.1, p. 4-10, 2003.

HUBRARD, J.P.; HARMAN, G.E.; HADAR, Y. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. **Phytopathology**, v. 73, p. 655-659, 1983.

KENNEDY, A.C. The rhizosphere and spermosphere. In: SYLVIA, D.M. et al. (eds.) **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1998. p. 389-407

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

LUO, Y., CHONG, S.K.; MYERS, O. Spatio-temporal analysis of soybean root colonization by *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in fields. **Plant Disease**, v. 85, p. 303-310, 2001.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996.

NASH, S.M.; SNYDER, W.C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. **Phytopathology**, v. 52, p. 567-572, 1962.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. Pennsylvania: State University. 1983. 193p.

NETTO, R.A.C.; DHINGRA, O.D. Hospedeiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 156-159, 1999.

ROSE, S.; PARKER, M; PUNJA, Z.K. Efficacy of biological and chemical treatments for control of fusarium root and stem rot on greenhouse cucumber. **Plant Disease**, v. 87, n. 12, p. 1462-1470, 2003.

RUPE, J.C. et al. Vertical and temporal distribution of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* in fields with sudden death syndrome of soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 245-251, 1999.

SAREMI, H.; BURGESS, L.W.; BACKHOUSE, D. Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 31, p. 941-947, 1999.

SIVAN, A.; CHET I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 198-203, 1989.

TSAHOURIDOU, P.C.; THANASSOULOPOULOS, C.C. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34. p. 767-776, 2002.

VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte II – Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 8, p. 303 – 338, 2000.

ZAMBOLIM, L. et al. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. In: Zambolim, L.; Vale, F.X.R.; Costa, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas – hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. p. 373-407.

CAPÍTULO III

SELEÇÃO MASSAL DE ANTAGONISTAS FÚNGICOS A *Fusarium solani* E *Fusarium oxysporum* EM SUBSTRATO.

RESUMO

O método utilizado para a seleção de antagonistas eficazes contra fungos de solo como *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* é de extrema importância para um programa de biocontrole. Utilizam-se geralmente testes *in vitro* para a seleção inicial de agentes de biocontrole e não se encontra na literatura metodologia que utilize solo e/ou substrato. Assim, os objetivos deste trabalho foram realizar a seleção massal de isolados fúngicos antagônicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato, para serem utilizados em programas de controle biológico, e identificar, em nível de espécie, os isolados fúngicos mais efetivos. Foram realizados dois experimentos de seleção, o primeiro para um isolado de *F. solani* e o segundo para dois isolados de *F. oxysporum*. No primeiro, utilizaram-se 98 possíveis antagonistas fúngicos, dos gêneros *Trichoderma* (73 isolados), *Penicillium* (14), *Aspergillus* (7) e *Cladosporium* (4) e, no segundo, 15 isolados fúngicos, sendo nove do gênero *Trichoderma*, dois de *Aspergillus*, dois de *Penicillium* e dois de *Cladosporium*. Foi inoculado 1 mL da suspensão do fitopatógeno (10^6 esporos/mL) em substrato, dentro de copos plásticos. Depois de cinco dias, após ter ocorrido a colonização do substrato pelo patógeno, foi acrescentado 0,5 mL da suspensão dos demais fungos (10^8 esporos/mL). Após nove dias contou-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Fusarium solani* e *F. oxysporum* em meio Nash & Snyder. Após, foi realizada a confrontação direta de três isolados de *Trichoderma* selecionados nos experimentos anteriores, com os três isolados de *Fusarium*. Os três isolados de *Trichoderma* foram identificados em nível de espécie. Como resultado, dos 98 isolados utilizados contra *F. solani*, 43% não diferiram da testemunha e 57% reduziram o seu desenvolvimento em substrato, sendo que os três melhores isolados fúngicos foram do gênero *Trichoderma*. Os três isolados de *Trichoderma* selecionados para *F. solani* também foram eficientes para os dois isolados de *F. oxysporum*. Na confrontação direta os três isolados de *Trichoderma*, embora tenham apresentado variações de antagonismo com relação aos três isolados de *Fusarium*, mostraram-se eficientes. Concluiu-se que a metodologia empregada na seleção de isolados fúngicos antagônicos a fungos de solo, em substrato, pode ser considerada uma alternativa viável na busca de antagonistas eficientes na redução da população desses patógenos em seu ambiente; e os três isolados selecionados como antagonistas a *F. solani* e *F. oxysporum* são da espécie *Trichoderma harzianum*.

Palavras chave: biocontrole, fungos de solo, *Trichoderma* spp.

3.1- INTRODUÇÃO

Fusarium solani (Mart.) Hans e *F. oxysporum* Schlecht são fitopatógenos habitantes do solo causadores de podridões de raiz e murchas, respectivamente. Esses patógenos são muito estudados devido aos danos econômicos causados no setor agrícola e sua distribuição ser cosmopolita (GHINI & NAKAMURA, 2001).

O controle das doenças causadas por patógenos de solo é dificultado devido a esse ser um ambiente complexo, no qual as medidas de controle têm sua eficiência prejudicada ou sua aplicação dificultada (BEDENDO, 1995). Mesmo assim, o controle químico é a forma de controle de fitopatógenos mais empregada, porém devido a retirada do brometo de metila do mercado e os danos causados na microbiota benéfica (GHINI, 1993), além de resíduos no ambiente, tem-se utilizado o controle biológico como alternativa viável.

O controle biológico ocorre naturalmente nos solos, em maior ou menor escala, dependendo de uma gama de variáveis, que vai desde os organismos envolvidos até suas propriedades físicas. Um dos pontos centrais na busca do controle biológico efetivo de fungos de solo é o antagonista, pois, segundo Ghini & Kimati (1989), as chances de sucesso nos programas de controle biológico estão no isolamento e seleção de microrganismos antagonísticos.

Dos trabalhos que visam a seleção de antagonistas fúngicos a fitopatógenos, a maior parte ocorre com testes *in vitro* na ausência de solo ou substrato, que de acordo com Ghini & Nakamura (2001), nem sempre apresentam correlação com os resultados obtidos em condições de campo. A explicação da maioria dos trabalhos incluírem inicialmente testes em laboratório, segundo Mariano (1993), é que por serem mais fáceis e rápidos que os efetuados com solo, permitem que uma grande população seja avaliada.

As pesquisas com *Trichoderma*, que é o gênero fúngico mais utilizado na atualidade como agente de biocontrole de patógenos de solo, nos revelam que os testes *in vitro* são mais utilizados para seleção em massa de isolados antagonísticos. Basicamente os testes utilizados são pareamento de culturas (confronto direto) e detecção de metabólitos voláteis e não voláteis, todos realizados em meios de cultura à base de agar (BELL et al., 1982; ASKEW & LAING, 1994; PATRICIO et al., 2001; DAL BELLO et al., 2002; ETHUR, et al. 2005). Quando poucos isolados

fúngicos estão envolvidos, podem-se utilizar testes *in vivo* no início do processo de seleção, como tratamento de sementes ou de solo/substrato (REIS, et al., 1995; NORONHA, et al., 1996).

Não existe relato de testes desenvolvidos em laboratório que visem a seleção massal de microrganismos com potencial antagônico contra fungos de solo, realizados na presença de solo e/ou substrato. De acordo com Howell (2003) muitos dos mecanismos importantes no controle biológico não podem ser analisados em placas de Petri, pois o desenvolvimento e a ação de antagonistas deve ser em condições de temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes próximos aos encontrados na natureza. Uma alternativa à seleção *in vitro*, para a supressividade de solos contra *Fusarium*, foi proposta por Toyota et al. (1996) e Ghini & Nakamura (2001), baseando-se no desenvolvimento do patógeno sobre agregados de solo previamente colonizados por possíveis antagonistas, sendo que a dificuldade de colonização do solo pelo patógeno identificaria os melhores antagonistas.

O aprimoramento de metodologias empregadas nos trabalhos de pesquisa sobre métodos alternativos de controle de patógenos veiculados pelo solo é fundamental para o desenvolvimento de alternativas viáveis ao seu controle (GHINI & NAKAMURA, 2001). Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram realizar seleção massal de isolados fúngicos antagônicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato, para serem utilizados em programas de controle biológico, e identificar, em nível de espécie, os isolados fúngicos mais efetivos.

3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 – Isolados dos patógenos e possíveis antagonistas

O isolado de *Fusarium solani* f. sp. *chrysanthemi* (STEFANELO, 2004) foi fornecido pelo Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os dois isolados de *F. oxysporum*, causadores de murcha, foram reisolados do pepineiro (HPSR9) e do tomateiro (HTSR11) com sintomas da doença, tendo sido coletados em solo rizosférico das respectivas culturas, em horta

(Capítulo II).

Os 98 isolados fúngicos de possíveis antagonistas foram obtidos de 20 pontos de coleta de solo rizosférico e não rizosférico no cultivo do tomateiro e pepineiro, em horta e estufa de área experimental do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (Capítulo II).

3.2.2 – Seleção de antagonistas a *Fusarium solani* em substrato

Foram utilizados 98 isolados fúngicos de possíveis antagonistas, dos gêneros: *Trichoderma* (73 isolados), *Penicillium* (14), *Aspergillus* (7) e *Cladosporium* (4) e um isolado de *Fusarium solani*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 99 tratamentos, com quatro repetições.

O fitopatógeno foi repicado para placas de Petri contendo meio NS (Nash & Snyder - 20 g de agar, 15 g de peptona, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de KH_2PO_4 , 1 g de quíntozene e 1 L de água) que foram deixadas em incubadora a 24 °C por 7 dias. Após, foram acrescentados 3 mL de água destilada e esterilizada por placa e com o auxílio da alça de Drigalsky o micélio e esporos foram removidos formando uma suspensão. As suspensões foram ajustadas para 10^6 esporos/mL contados em câmara de Neubauer.

Dois gramas de substrato Plantimax® foram adicionados em copos plásticos com capacidade para 50 mL. Após, foi inoculado 1 mL da suspensão do fitopatógeno no substrato e os copos foram fechados com papel filme e papel manteiga. Os copos foram deixados em temperatura ambiente e a cada dois dias foi acrescentado 1 mL de água destilada e esterilizada para evitar o ressecamento do substrato.

Depois de cinco dias da inoculação do patógeno, após ter ocorrido, supostamente, a colonização do substrato, foi acrescentado 0,5 mL da suspensão dos possíveis antagonistas fúngicos (10^8 esporos/mL) retirados com o auxílio de alça de Drigalsky de placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e agar), e para o tratamento testemunha foi aplicado 0,5 mL de água destilada e esterilizada. Após nove dias os dois gramas de substrato dos copos foram acrescentados a frascos de vidro com 98 mL de água destilada e esterilizada e colocados em agitador mecânico por 30 minutos. A partir desta solução original foi feita diluição de 20 vezes, ou seja,

5 mL da solução foram acrescentados em frasco com 95 mL de água destilada e esterilizada (FREITAS, 2003). Dessa diluição uma alíquota de 1 mL foi espalhada em placas de Petri contendo meio NS, para 4 placas. Antes do meio de cultura ser plaqueado acrescentou-se 5 mL de cloranfenicol 10% para cada 1 L de meio. As placas foram incubadas em câmara climatizada a 24 °C, com fotoperíodo de 12h, durante sete dias.

Após o período de incubação foi contado em cada placa o número de colônias de *Fusarium* e calculado o número de unidades formadoras de colônia (UFC)/g de substrato.

3.2.3 – Ação de isolados fúngicos sobre *Fusarium oxysporum* em substrato

O objetivo desse experimento foi selecionar isolados fúngicos para o biocontrole de *F. oxysporum* e comparar a ação dos três isolados de *Trichoderma* selecionados no experimento anterior, contra *F. solani*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 16 (testemunha e 15 isolados fúngicos) x 2 (isolados HPSR9 e HTSR11 de *F. oxysporum*), com 4 repetições. Foram utilizados 15 isolados fúngicos dos gêneros *Trichoderma* (9 isolados), *Penicillium* (2), *Aspergillus* (2) e *Cladosporium* (2); e dois isolados de *Fusarium oxysporum*. A escolha dos possíveis antagonistas fúngicos utilizados nesse experimento foi baseada em sorteio de dois isolados para cada gênero, sendo que para *Trichoderma* foram sorteados seis mais os três isolados que apresentaram melhor desempenho no experimento anterior.

O experimento foi desenvolvido e conduzido de acordo com o anterior.

3.2.4 – Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e ao teste de Tukey a 5%, para a comparação de médias. As médias em UFC de *F. solani* e *F. oxysporum* foram transformadas para $\text{LOG}_{10}(\text{UFC} + 1)$. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SOC (EMBRAPA - 1986).

3.2.5 – Pareamento de culturas

O confronto direto é um dos testes *in vitro* mais utilizado na seleção massal de isolados fúngicos para serem usados em controle biológico. Assim, procurou-se analisar e comparar a ação dos isolados de *Trichoderma* entre os experimentos. Realizou-se o pareamento de um isolado de *F. solani* e dois de *F. oxysporum* com os isolados HTSR5, ETSR20 e ETSR8 de *Trichoderma* sp. selecionados nos experimentos anteriores, de acordo com metodologia sugerida por Bell et al. (1982) e Mariano (1993).

Discos de meio contendo micélio e esporos do patógeno foram colocados em uma das extremidades de placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e agar) e após 48 h foram acrescentados os discos dos isolados de *Trichoderma* sp. na outra extremidade, com 4 repetições. As placas foram deixadas em câmara climatizada a 22 °C, com fotoperíodo de 12h.

As avaliações foram realizadas após treze dias do acréscimo do patógeno, de acordo com os critérios propostos por Bell et al. (1982) de notas e classes de antagonismo. Escala de notas: 1 (antagonista cresce por toda a placa de Petri), 2 (antagonista cresce sobre 2/3 da placa), 3 (antagonista e patógeno crescem até a metade da placa), 4 (patógeno cresce sobre 2/3 da placa) e 5 (patógeno cresce por toda a placa de Petri). Além de notas, os mesmos autores sugerem classes de antagonismo, considerando que para um isolado ser tido como antagonista eficiente deveria apresentar média de notas menor ou igual a 2 e para ser um antagonista ineficiente a média seria maior ou igual a 3.

3.2.6 – Identificação dos isolados de *Trichoderma*

A identificação, em nível de espécie, dos isolados HTSR5, ETSR20 e ETSR8 de *Trichoderma* foi realizada com base no aspecto macroscópico e microscópico das colônias em meio BDA.

Para a análise macroscópica os fungos foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA e deixados em câmara climatizada a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h. A avaliação constou do tempo (dias) que os isolados levaram para apresentar crescimento micelial total, isto é, para se desenvolver por toda a placa de Petri.

Para as medições e fotografias dos conídios e conidióforos foi realizado o

método de cultura em lâmina. Lâminas foram autoclavadas dentro de placas de Petri de vidro durante 45 min. Após, adicionaram-se quatro gotas de meio de cultura BDA com o auxílio de uma pipeta volumétrica, no centro da lâmina. Sobre o meio de cultura foi acrescentada, com uma alça, uma pequena quantia de micélio e esporos do fungo e, após, cobriu-se com uma lamínula flambada. Foram feitas quatro repetições por isolado.

As placas de Petri contendo as lâminas foram deixadas em câmara climatizada com temperatura de 22 °C, fotoperíodo de 12 h, durante quatro dias. Após, foram retiradas e analisadas em microscópio ótico, quando foram fotografados os conídios, fiálides e conidióforos dos respectivos isolados de *Trichoderma*.

As medições das estruturas dos isolados fúngicos foram realizadas com o auxílio de uma ocular com escala micrométrica (K7492) com aumento de 15 vezes. Foram medidos diâmetros de conídios, comprimento de fiálides localizadas na base e na extremidade dos conidióforos, espaço entre a inserção das fiálides no conidióforo e largura de fiálides; tendo sido medidas 40 estruturas (dez por lâmina) para cada isolado de *Trichoderma*. Observações a respeito da morfologia de conidióforo, fiálide e conídio, ocorrência de clamidósporos, ramificação e número de fiálides por inserção no conidióforo, também foram realizadas.

A identificação dos três isolados de *Trichoderma* foi realizada conforme a descrição morfológica e chave analítica proposta por Bissett (1991) que tem como base a forma e o diâmetro de conídios, tipo de ramificação dos conidióforos e o modo de disposição das fiálides.

3.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 – Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* em substrato

Dos 98 isolados fúngicos utilizados como possíveis antagonistas, 42 (43 %) não diferiram da testemunha, e os demais isolados reduziram significativamente o desenvolvimento do patógeno, sendo que três do gênero *Trichoderma* apresentaram os melhores resultados (Tabela 4).

Tabela 4 – Sobrevivência de *Fusarium solani* (Log₁₀ UFC/g de substrato) em substrato tratado com possíveis antagonistas fúngicos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*. Santa Maria – RS.

Isolado fúngico	<i>F. solani</i> – Log ₁₀ UFC/g substrato	Isolado fúngico	<i>F. solani</i> – Log ₁₀ UFC/g substrato
HS17 -1*** (P)****	10,865* a	ETSR10-2 (T)	9,416 bcdefghijklm
ES18-2 (A)	10,362 ab	ETSR1-4 (T)	9,411 bcdefghijklm
HS19-2 (C)	10,360 ab	ETSR11-4(T)	9,401 bcdefghijklm
EPSR5-3 (A)	10,356 ab	HTSR19-5 (T)	9,364 bcdefghijklmn
TESTEM	10,318 abc	ETSR14-3 (T)	9,331 bcdefghijklmno
HS15-1 (A)	10,314 abc	EPSR7-1(T)	9,286 bcdefghijklmno
HS17-1 (C)	10,309 abc	HPSR3-1 (T)	9,232 bcdefghijklmnop
HS13-3 (A)	10,302 abc	EPSR20-1(T)	9,224 bcdefghijklmnop
HS7-2 (P)	10,301 abc	EPSR3-2 (T)	9,187 bcdefghijklmnopq
ETSR12-1 (C)	10,289 abc	EPSR13-2 (T)	9,167 bcdefghijklmnopqr
HS16-2 (P)	10,286 abc	EPSR5-2 (T)	9,161 bcdefghijklmnopqr
HTSR9-2 (C)	10,267 abc	EPSR9-2 (T)	9,132 bcdefghijklmnopqr
HTSR15-2 (A)	10,264 abc	HPSR11-3 (T)	9,123 bcdefghijklmnopqrs
ETSR20-4(T)	10,264 abc	HPSR1-1 (T)	9,099 bcdefghijklmnopqrst
ETSR2-3 (A)	10,263 abc	HPSR6-3 (T)	9,034 cdefghijklmnopqrst
ES12-2 (A)	10,246 abcd	EPSR16-1(T)	8,967 defghijklmnopqrstu
HPSR6-2 (P)	10,229 abcd	ETSR20-3 (T)	8,966 defghijklmnopqrstu
HS3-3 (T)	10,095 abcde	ETSR7-1 (T)	8,900 efgghijklmnopqrstu
HTSR3-2 (P)	10,029 abcdef	ETSR4-3 (T)	8,899 efgghijklmnopqrstu
ETSR12-4 (P)	10,028 abcdef	HPSR15-5 (T)	8,868 efgghijklmnopqrstuv
ETSR20-2 (T)	9,995 abcdefg	HS10-1 (T)	8,847 efgghijklmnopqrstuv
ES17-3 (P)	9,990 abcdefg	EPSR9-3 (T)	8,836 efgghijklmnopqrstuv
HS2-3 (T)	9,988 abcdefg	HS7-3 (T)	8,813 efgghijklmnopqrstuvw
HTSR5-3 (P)	9,970 abcdefg	ETSR9-2 (T)	8,811efghijklmnopqrstuvw
HTSR11-2 (T)	9,875 abcdefg	ETSR6-1 (T)	8,791 fghijklmnopqrstuvw
ETSR15-3 (P)	9,869 abcdefgh	ETSR2-2 (T)	8,784 fghijklmnopqrstuvw
HPSR14-2 (P)	9,861 abcdefgh	ES7-2 (T)	8,761 fghijklmnopqrstuvw
HPSR17-1 (P)	9,832 abcdefgh	EPSR11-1 (T)	8,736 ghijklmnopqrstuvw
ES15-2 (T)	9,831 abcdefgh	ETSR16-1(T)	8,595 hijklmnopqrstuvw
EPSR1-3 (P)	9,793 abcdefghi	HS8-2 (T)	8,538 ijklmnopqrstuvw
ES3-1 (T)	9,751 abcdefghi	HPSR18-3 (T)	8,536 ijklmnopqrstuvw
EPSR19-2(T)	9,733 abcdefghi	ETSR11-3 (T)	8,391 jklmnopqrstuvw
HTSR12-1 (T)	9,681 abcdefghij	EPSR8-2 (T)	8,319 klmnopqrstuvw
ETSR9-1 (T)	9,664 abcdefghij	ES16-1 (T)	8,251 mnopqrstuvwxy
HTSR8-1 (T)	9,658 abcdefghij	ETSR18-2 (T)	8,130 mnopqrstuvwxy
HTSR12-4 (P)	9,657 abcdefghij	HS16-4 (T)	8,127 mnopqrstuvwxy
ETSR4-2 (T)	9,651 abcdefghij	ETSR13-3 (T)	8,125 mnopqrstuvwxy
ES9-1 (P)	9,651 abcdefghij	HPSR19-1 (T)	8,101 nopqrstuvwxy
EPSR2-4 (T)	9,647 abcdefghij	ETSR20-1 (T)	8,062 opqrstuvwxy
EPSR11-3 (T)	9,636 abcdefghij	HPSR17-2 (T)	7,955 pqrstuvwxy
ETSR7-1 (T)	9,619 abcdefghij	HS4-1 (T)	7,898 qrstuvwxy
EPSR6-1(T)	9,616 abcdefghij	EPSR6-3 (T)	7,881 rstuvwxy
ES12-1 (T)	9,583 abcdefghijk	HS1-3 (T)	7,833 stuvwxy
ETSR3-2 (T)	9,570 bcdefghijk	EPSR19-1 (T)	7,826 tuvwxxy
ES4-2 (T)	9,538 bcdefghijkl	ETSR5-1 (T)	7,732 uvwxxy
HS20-2 (T)	9,529 bcdefghijkl	ETSR1-2 (T)	7,601 vwxy
HPSR13-1(T)	9,492 bcdefghijkl	ETSR8-2 (T)	7,529 vwxy
ES17-1 (T)	9,465 bcdefghijkl	ETSR20-1 (T)	7,412 xy
HTSR16-2 (T)	9,451 bcdefghijkl	HTSR5-1 (T)	7,010 y
HTSR4-1 (T)	9,426 bcdefghijkl		

*Média da leitura de 4 placas. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

**HS17 -1 – (H) horta, (S) solo não-rizosférico (17) n° da coleta e (1) n° do isolado fúngico retirado da coleta. (E) estufa; (P) pepineiro; (T) tomateiro; (SR) solo rizosférico.

*** Gênero fúngico - (T) *Trichoderma*; (P) *Penicillium*; (A) *Aspergillus*; (C) *Cladosporium*.

Os isolados do gênero *Trichoderma* foram mais efetivos na redução da população de *Fusarium solani*, quando comparados com os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* (Tabela 4). Ao contrário de Ghini & Nakamura (2001) que, em experimento utilizando microcosmos e com acréscimo anterior dos antagonistas ao patógeno (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder), encontraram maior redução na população do patógeno com isolados de *Penicillium* sp. do que com *Trichoderma* sp. Já Toyota et al. (1996), em trabalho semelhante ao anterior (com microcosmos), utilizando como patógeno *F. oxysporum* f. sp. *raphani* Kend. et. Snyd., encontraram maior redução da população do patógeno com isolado de *Trichoderma viride*, seguido por *Penicillium claviforme* e por *Cladosporium herbarum*.

Foram selecionados, através desse método, três isolados de *Trichoderma*, HTSR5, ETSR20 e ETSR8, com potencial antagonístico a *Fusarium solani* (Tabela 4), sendo que os mesmos foram retirados de solo rizosférico do tomateiro cultivado em horta e estufa. Pode-se sugerir que o tipo de ambiente (horta e estufa) não interferiu na escolha dos isolados, mas sim, as variáveis, tipo de solo (rizosférico) e cultura (tomateiro).

Pode-se inferir que os isolados fúngicos encontrados em solo rizosférico foram mais eficientes no controle de *Fusarium solani* do que os de solo não rizosférico. Liang et al. (1996) e Dal Bello et al. (2002) preconizaram que os microrganismos, por habitarem a rizosfera, apresentam considerável potencial antagonístico na proteção de sementes e raízes contra patógenos de solo.

As plantas apresentam microbiota rizosférica própria que pode variar de acordo com as etapas do seu ciclo de vida e é influenciada por uma gama de variáveis. Gesheva (2002) encontrou diferença em UFC de fungos, bactérias e actinomicetos na rizosfera do limoeiro e da laranjeira e, também, na ocorrência de quatro espécies de actinomicetos.

Deve-se ressaltar, porém, que por esse método não apresentar um patossistema completo, semelhante a metodologia desenvolvida por Ghini & Nakamura (2001), a seleção baseia-se num efeito direto dos antagonistas na redução da população do patógeno em substrato. Segundo Toyota et al. (1996) uma estratégia para controlar a doença é prevenir a proliferação do patógeno no solo ou diminuir sua densidade populacional.

A densidade populacional do patógeno influencia na incidência e severidade

de doenças juntamente com outras variáveis, dentre as quais, temperatura (LANDA, 2001), pH do solo e genética do hospedeiro. Segundo Cook & Baker (1983) ocorre pouca ou nenhuma incidência de doença em solos onde a população de *Fusarium* sp. fica entre 100 e 6000 UFC/g⁻¹ de solo. Landa et al. (2001) demonstraram que a densidade de inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato influenciou na incidência de murcha em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Van Bruggen et al. (1986) também observaram que o aumento na densidade de inóculo de *Rhizoctonia solani* era proporcional ao aumento de *damping-off* de pré e pós-emergência no feijoeiro.

Para se conhecer o efeito dos isolados de *Trichoderma* selecionados quanto a fusariose deve-se realizar testes *in vivo*, com os hospedeiros, pois a indução de resistência é uma das formas de ação de microrganismos utilizados em controle biológico (YEDIDIA et al., 1999). Além de agir diretamente sobre *F. solani* no substrato, os isolados de *Trichoderma* sp. podem atuar, também, na indução de resistência do hospedeiro.

3.3.2 – Ação de isolados fúngicos sobre *Fusarium oxysporum* em substrato

Não ocorreu interação entre os fatores isolados fúngicos (isolados do gênero *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Trichoderma*) e patógenos (isolados de *F. oxysporum*), mas ocorreram diferenças significativas entre os isolados fúngicos (Tabela 5). Todos os isolados fúngicos reduziram a população dos patógenos, ocorrendo menor número de UFC do que no tratamento testemunha, demonstrando potencial antagonico aos isolados HPSR9 e HTSR11 de *F. oxysporum* (Tabela 5).

A redução máxima na população de *F. oxysporum* (Tabela 5), assim como na de *F. solani* (Tabela 4), foi apresentada pelos isolados do gênero *Trichoderma*, sendo que os melhores resultados foram dos isolados HTSR5, ETSR20 e ETSR8.

Tabela 5 – Sobrevivência de *Fusarium oxysporum* (Log₁₀ UFC/g de substrato) em substrato tratado com possíveis antagonistas fúngicos dos gêneros *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Santa Maria – RS.

Isolado fúngico	<i>F. oxysporum</i> - Log ₁₀ UFC/g de substrato
TESTEMUNHA	11,99 ^a
ETSR12-1 ^{**} (C) ^{***}	10,52 b
ES18-2(A)	10,51 b
HTSR9-2 (C)	10,41 b
ETSR2-3 (A)	10,39 b
HS7-2 (P)	10,37 b
ETSR15-3 (P)	10,18 bc
ES17-1 (T)	10,17 bc
EPSR11-3 (T)	10,17 bc
EPSR7-1 (T)	10,15 bc
ETSR6-1 (T)	10,12 bc
ETSR16-1 (T)	9,95 bcd
EPSR6-3 (T)	9,56 cd
ETSR20-3 (T)	9,15 de
HTSR5-1 (T)	8,59 ef
ETSR8-2 (T)	8,50 f

*Média de 4 repetições. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

** ETSR12-1 (E) estufa, (T) tomateiro, (SR) solo rizosférico, 12 – número de coleta, 1 – número do isolado encontrado na coleta. (H) horta, (P) pepineiro, (S) solo não rizosférico.

***Gênero fúngico - (T) *Trichoderma* sp.; (P) *Penicillium* sp.; (A) *Aspergillus*; (C) *Cladosporium*.

3.3.3 – Pareamento de culturas

No pareamento de culturas, após seis dias da incorporação do patógeno, observou-se que os micélios originários dos discos colocados nas extremidades das placas de Petri encontraram-se no centro das mesmas. O mesmo comportamento foi observado nos tratamentos testemunha, apenas com *F. solani* ou *F.oxysporum*.

Na avaliação final, ou seja, treze dias após a colocação do patógeno, os isolados de *Trichoderma* apresentaram comportamento variável no confronto com os três isolados de *Fusarium*, mas todos foram classificados como antagonistas eficientes (Tabela 6), de acordo com resultado encontrado por Reis et al. (1995), no qual três isolados de *Trichoderma* sp. foram classificados como eficientes e três como muito eficientes contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Resultados positivos, em confronto direto, também foram encontrados com relação a *F. graminearum* Schwabe (DAL BELLO et al., 2002).

Tabela 6 – Médias e classes de antagonismo de três isolados de *Trichoderma* sp. a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, em pareamento de culturas. Santa Maria – RS.

Isolados <i>Trichoderma</i>	<i>F. solani</i>		<i>F. oxysporum</i> (HPSR9)		<i>F. oxysporum</i> (HTSR11)	
	Nota	Classe de antagonismo	Nota	Classe de antagonismo	Nota	Classe de antagonismo
HTSR5-1	1*	Muito eficiente	1,5	Muito eficiente	2	Eficiente
ETSR20-3	2	Eficiente	2,5	Eficiente	2,5	Eficiente
ETSR8-2	1	Muito eficiente	2	Eficiente	2	Eficiente

*Média de 4 placas.

HPSR9 – isolado de *F. oxysporum* retirado do pepineiro.

HTSR11 – isolado de *F. oxysporum* retirado do tomateiro.

Porém, pela avaliação proposta por Bell et al. (1982), amplamente utilizada, os antagonistas selecionados pelo confronto direto, são aqueles que recebem nota igual a 1, ou seja, com aproveitamento total. Dentre um universo de possíveis antagonistas (o método é utilizado para a seleção massal), obviamente ter-se-á um segmento que apresentará crescimento total sobre o patógeno. Assim, os isolados HTSR5-1 e ETSR8-2 seriam selecionados como antagonistas apenas para *F. solani*, embora o isolado HTSR5-1 ainda poderia ser reconhecido como antagônico ao isolado HPSR9 de *F. oxysporum*, e o isolado ETSR20-3 não seria selecionado. Segundo Patrício et al. (2001), os isolados fúngicos selecionados por pareamento de culturas, em laboratório, apresentaram comportamento variável quando adicionados ao solo, no controle de *Rhizoctonia solani*. De acordo com Reis et al. (1995), dos três isolados de *Trichoderma* classificados como muito eficientes (notas 1 e 1,5), no confronto direto, contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, apenas um ficou entre os melhores (terceiro) no controle do patógeno, em tratamento de sementes.

3.3.4 – Identificação dos isolados de *Trichoderma* sp.

Os isolados de *Trichoderma* sp. selecionados como agentes de biocontrole foram identificados como *Trichoderma harzianum* Rifai.

Quanto ao aspecto macroscópico, pôde-se observar que os isolados se desenvolveram por toda a placa de Petri (9 cm) contendo meio BDA, em 3 dias. O micélio aéreo, flocoso e branco, se desenvolveu por toda a placa de Petri e originou gradativamente grande quantidade de conídios verdes que são responsáveis pela

coloração verde escura do fungo (Figura 5).

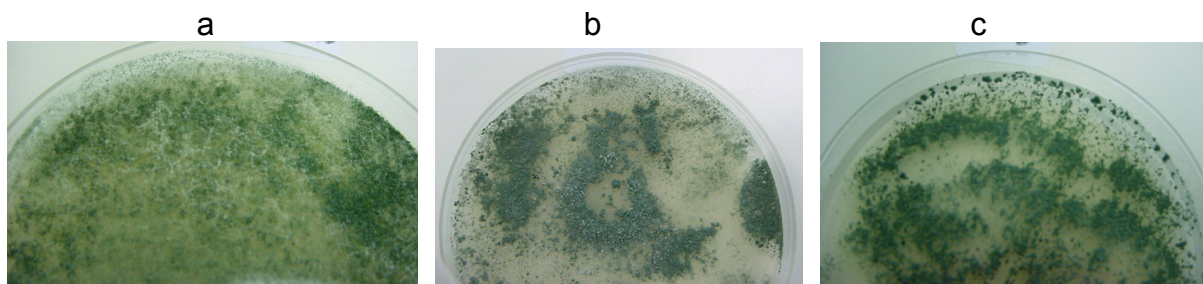


Figura 5 – Aspecto e coloração dos isolados ETSR20 (a), ETSR8 (b) e HTSR5 (c) de *Trichoderma harzianum*, em meio BDA. Santa Maria – RS. Fonte: ETHUR, 2005.

Encontraram-se semelhanças quanto às características morfológicas das colônias dos três isolados de *Trichoderma* (Figura 6).

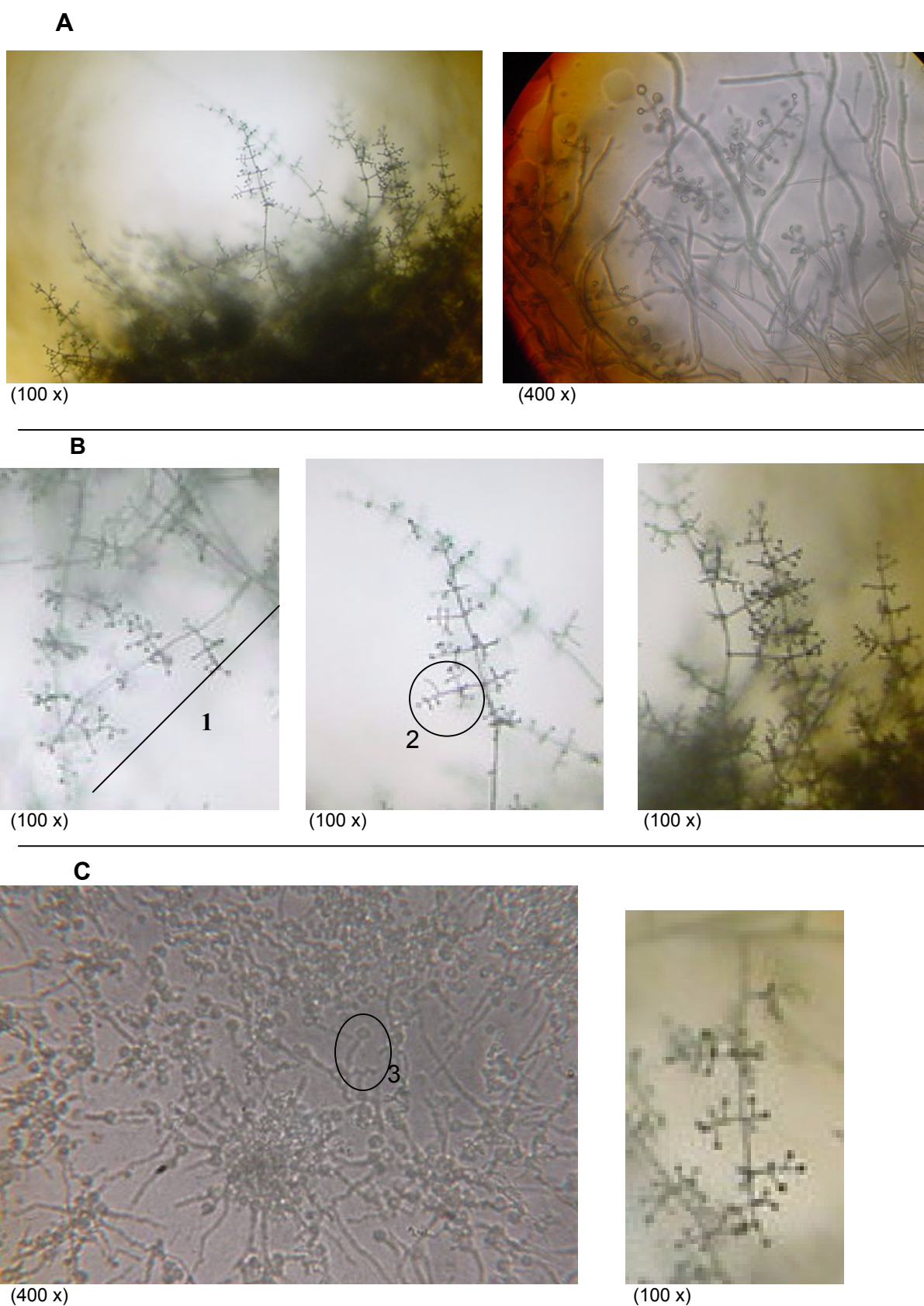


Figura 6 – Aspecto morfológico dos isolados ETSR20 (A), ETSR8 (B) e HTSR5 (C) de *Trichoderma harzianum*, em meio de cultura. Conidióforos (1), fiáides (2) e conídios germinando (3). Santa Maria – RS. Fonte: ETHUR, 2005.

Descrição morfológica dos isolados de *Trichoderma*:

- os conidióforos são hialinos, longos, ramificados desde a base e com ramificações secundárias, que geralmente são responsáveis pela maior largura na base do que na extremidade do mesmo, apresentando forma piramidal. Para cada ramificação primária ocorre a saída de uma a três fiálides de cada ponto de inserção do conidióforo, e dessas, por sua vez, também partem de uma a três fiálides por ponto de inserção, formando as ramificações secundárias (forma piramidal). Os conidióforos não apresentam alongamentos estéreis na maturidade e nenhum tipo de ornamentação.

- as fiálides são ampuliformes alongadas, com comprimentos variados, apresentando maior desenvolvimento na base do que na extremidade dos conidióforos. Em suas extremidades são encontradas pequenas pústulas compostas por conídios.

- os conídios apresentam forma subglobosa para ovóide, com parede lisa.

- os clamidósporos foram encontrados intercalados no micélio ou terminais.

As observações a respeito da morfologia e dimensões (Tabela 7) das estruturas que compõem os conidióforos foram semelhantes à descrição de Bissett (1991) para a espécie *Trichoderma harzianum*.

Tabela 7 – Dimensões das estruturas (μm) que compõem os conidióforos dos isolados HTSR5, ETSR20 e ETSR8 de *Trichoderma harzianum*. Santa Maria – RS.

Estruturas	Isolados de <i>Trichoderma harzianum</i>			Medidas (Bissett ¹)
	HTSR5	ETSR20	ETSR8	
Conídios (diâmetro)	2.0 x 1.6*	2.3 x 1.8	2.2 x 1.8	1.7-3.2 x 1.3-2.5 (média 2.4 x 1.9)
**Fiálides base do conidióforo (comprimento)	8	7	8	Até 10
**Fiálides extremidade do conidióforo (comprimento)	5	6	6	3.8 a 7.5
**Espaço entre as inserções das fiálides	2 a 7	3 a 8	3 a 7	-
**Largura de fiálides (base)	2.6	2.7	2.8	2.5 a 3.5

¹Bissett (1991).

*Média de 40 observações.

** Ramificações primárias do conidióforo

3.4- CONCLUSÕES

Concluiu-se que:

- a seleção de isolados fúngicos antagonísticos a fungos veiculados pelo solo, em substrato, pode ser considerada uma alternativa viável na busca de antagonistas eficientes na redução da população desses patógenos em seu ambiente;
- isolados de *Trichoderma harzianum* são antagonistas a *F. solani* e *F. oxysporum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASKEW, D.J.; LAING, M.D. The in vitro screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and an evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggressive strains. **Plant and Soil**, v. 159, p. 277-281, 1994.

BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 829-837.

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

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma* – III. Section *Pachybasium*. **Canadian Journal Botanical**, v. 69, p. 2373-2417, 1991.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983.

DAL BELLO, G.M.; MÓNACO, C.I.; SIMÓN, M.R. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 627-636, 2002.

ETHUR, L.Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n.2, p. 127-133, 2005.

FREITAS, T.M. Q. **Dano, dinâmica populacional e fontes de resistência genética a *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

GESHEVA, V. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. **European Journal of Soil Biology**, v.38, p. 85-88, 2002.

GHINI, R. Efeito de fungicidas sobre microrganismos não alvo. **Summa Phytopathologica**, v. 19, p. 62-63, 1993.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Método de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagonísticos a *Botrytis cinerea***. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1989. 13p. (Boletim de Pesquisa, 3).

GHINI, R.; NAKAMURA, D. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividade de solos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em microcosmos e *in vivo*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 3, p. 318-322, 2001.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, p. 4-10, 2003.

LANDA, B.B. et al. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. **Phytopathology**, v. 91, n. 8, p. 807-816, 2001.

LIANG, X. et al. Control of damping-off of safflower by bacterial seed treatment. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 18, p. 43-49, 1996.

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

NORONHA, M.A. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp para o controle de *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 156-162, 1996.

PATRICIO, F.R.A.; KIMATI, H.; BARROS, B.C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp antagônicos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 223-229, 2001.

REIS, A. et al. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 21, n.1, p. 16-20, 1995.

STEFANELO, D.R. **Doses, ambiente e forma de infecção causada por *Fusarium solani* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo (*Dendranthema grandiflora*) cv. Calábria e seu controle por *Trichoderma virens***. 2004. 81fs. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

TOYOTA, K.; RITZ, K.; YOUNG, I.M. Microbiological factors affecting the colonisation of soil aggregates by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, n. 10, p. 1513-1521, 1996.

VAN BRUGGEN, A.H.C.; WHALEN, C.H.; ARNESON, P.A. Effects of inoculum level of *Rhizoctonia solani* on emergence, plant development, and yield of dry beans. **Phytopathology**, v. 76, n. 9, p. 869-873, 1986.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p. 1061-1070, 1999.

CAPÍTULO IV

***Trichoderma harzianum* NO DESENVOLVIMENTO E NA PROTEÇÃO DE MUDAS CONTRA A FUSARIOSE DO TOMATEIRO E PEPINEIRO, EM CONDIÇÕES CONTROLADAS.**

RESUMO

A fusariose do tomateiro e pepineiro é uma doença difícil de ser controlada e busca-se no biocontrole uma alternativa para o manejo integrado de doenças. *Trichoderma* é um dos gêneros fúngicos mais estudados na atualidade para o biocontrole de patógenos veiculados pelo solo. Nesse contexto, os objetivos do trabalho foram: verificar a ação de isolados de *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro e pepineiro; identificar a melhor forma de aplicação do agente de biocontrole no controle da fusariose e identificar a ação conjunta dos tratamentos químico e biológico. Foram realizados experimentos, para o tomateiro e pepineiro, utilizando tratamento de sementes com três isolados e um mix de *T. harzianum*, para avaliar germinação, emergência e desenvolvimento de mudas. Duas formas de aplicação dos agentes de biocontrole foram utilizadas, via semente e substrato (dosagens de 0; 0,25; 0,5 e 1,0 g, por cova), sendo que para as sementes foram realizados, também, tratamentos biológico e químico, para a avaliação da incidência e severidade da fusariose, nas duas culturas. Para o pepineiro, realizou-se um experimento extra, efetuando-se tratamento biológico de semente e substrato em bandejas de isopor, com posterior transplante de mudas para vasos com inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Os resultados mostraram que o isolado HTSR5 de *T. harzianum* influenciou positivamente na germinação, emergência e produção de mudas do pepineiro e para o tomateiro apenas quanto à germinação e desenvolvimento inicial de plântulas, pois na emergência não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos. Nos experimentos com tratamento de sementes, as menores percentagens de incidência foram promovidas pelo tratamento conjunto Thiran mais HTSR5, tanto para o pepineiro quanto para o tomateiro. As dosagens de pó de *T. harzianum* que apresentaram menor incidência para o tomateiro e para o pepineiro foram de 0,5 e 1,0 g, respectivamente. No experimento extra para o pepineiro, a menor incidência e severidade foram encontradas para o tratamento de sementes com o mix e o isolado HTSR5 de *T. harzianum*. Conclui-se que: isolados selecionados de *Trichoderma harzianum* podem ser utilizados no tratamento de sementes, para a produção de mudas e redução na incidência e severidade da fusariose do tomateiro; isolados de *Trichoderma harzianum* estimulam o vigor de mudas e são uma opção para o controle da fusariose do pepineiro; o tratamento de sementes com isolados selecionados de *Trichoderma harzianum* reduzem a fusariose do tomateiro e pepineiro; o tratamento integrado de fungicida e isolados de *Trichoderma harzianum* pode ser utilizado no controle da fusariose do tomateiro e pepineiro; *Trichoderma harzianum* em tratamento de sementes ou de substrato se desenvolve na rizosfera do pepineiro.

Palavras chave: microbiolização, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, sementes.

4.1- INTRODUÇÃO

A propagação, tanto do pepineiro (*Cucumis sativus* L.) quanto do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), ocorre por sementeira direta no local de cultivo ou por transplante de mudas, obtidas através de sementeira em copinhos, bandejas de isopor ou pequenos canteiros (FILGUEIRA, 2003). Em todas as formas de cultivo dessas olerícolas pode ocorrer o contato das mudas com fungos de solo como *F. oxysporum* Schlechtend.: Fr., causador de murcha e tombamento de mudas (TOKESHI, 1997), pois no transplante podem ocorrer ferimentos de níveis variados nas raízes, o que facilita a infecção por esse patógeno (FREITAS & PIZZINATTO, 1991).

Os locais com alta produção de olerícolas, como o tomateiro, geralmente acabam privilegiando os fitopatógenos de solo (FILGUEIRA, 2003). Segundo Carvalho et al. (2003), essa cultura apresenta um aspecto nômade devido ao acúmulo de inóculo de patógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. Snyder & Hansen, agente causador da fusariose ou murcha de fusário (TOKESHI, 1997), que é altamente destrutivo tanto a campo quanto em ambiente protegido (MAO et al., 1998). Devido à alta infestação do solo por patógenos, em algumas estufas do país, tem sido feito o plantio em substrato acondicionados em sacos de cultivo, principalmente para a cultura de tomate do tipo “cereja”.

A fusariose ou murcha do pepineiro, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl: Fries f. sp. *cucumerinum* Owen não figura como principal doença para o pepineiro plantado a campo. Porém, em ambiente protegido, em estufas comerciais, tende a ser mais comum e agressiva (BLANCARD et al., 1996; ZAMBOLIM et al., 2000; ROBERTS & KUCHAREK, 2005). Segundo Melo & Piccinin (1999) a murcha de fusário é uma das principais doenças do pepineiro em estufa no estado de São Paulo. Tem ocorrência em vários países, principalmente China, Grécia, Espanha, França, Israel, Japão e Estados Unidos (AHN et al., 1998; VAKALOUNAKIS et al., 2004; ROBERTS & KUCHAREK, 2005).

As medidas de controle para patógenos de solo como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* envolvem várias práticas de manejo integrado, como rotação de culturas (TOKESHI, 1997; FILGUEIRA, 2003; ROBERTS & KUCHAREK, 2005), calagem, sementes livre de patógenos (ZITTER et al., 1996;

VIDA et al.,2004), retirada de plantas doentes e de restos culturais infectados, esterilização do solo com vapor, desinfecção do material utilizado para sementeira e cultivo (BLANCARD et al., 1996) e, principalmente, uso de cultivares tolerantes ou resistentes (MELO & PICCININ, 1999; CARVALHO et al., 2003). Porém, todas as variedades comerciais de pepino apresentam níveis de sensibilidade a murcha de fusário (BLANCARD et al., 1996) sendo que uma das soluções seria a utilização de porta enxerto resistente (ZITTER et al., 1996; VIDA et al., 2004), mas de acordo com Singh et al. (1999) esse método é trabalhoso e oneroso. Para o tomateiro, observou-se que novas raças do patógeno têm surgido superando os cultivares existentes (TELLO & LACASA, 1988). Já o controle químico, no tratamento de sementes, não apresenta efeito prolongado e quando utilizado diretamente no colo da planta infectada (BLANCARD et al.,1996) atua apenas como paliativo. Assim, busca-se no biocontrole uma alternativa para o controle de fitopatógenos no ambiente solo.

Para o controle biológico da fusariose do tomateiro e do pepineiro foram utilizadas bactérias (FREITAS & PIZZINATTO, 1991; MAO et al., 1998; LARKIN & FRAVEL, 1998; SINGH et al., 1999) e fungos (DATNOFF et al., 1995; DE CAL et al., 2000), dentre os quais, encontram-se isolados de *Trichoderma* spp. (DATNOFF et al., 1995; LARKIN & FRAVEL, 1998; YEDIDIA et al., 1999; COTXARRERA et al., 2002).

A ação de isolados de *Trichoderma* spp. contra fungos como *F. oxysporum* pode ocorrer principalmente por competição, pois a rizosfera comporta uma determinada população de microrganismos, de acordo com as exsudações liberadas pela raiz (SIVAN & CHET, 1989), sendo que a maior densidade populacional de *Trichoderma* ocorre na extremidade das raízes que é o local mais acessível à infecção por *Fusarium oxysporum* (SIVAN et al., 1987). Outras formas de ação seriam por antibiose, que é o processo que ocorre na microbiolização das sementes (LUZ, 1991) contra os patógenos causadores de tombamento de pré e pós-emergência, por micoparasitismo (HOWELL, 2003), que ocorre pela produção de quitinases e glucanases utilizadas por *Trichoderma* spp. para a degradação da parede celular de patógenos (SIVAN & CHET, 1989; SINGH et al., 1999), que pode ocorrer tanto em solo rizosférico quanto em solo não rizosférico, e por indução de defesa do hospedeiro, processo comprovado por meio de estudos histológicos, que detectaram hifas nos tecidos mais externos das raízes, e bioquímicos, devido à produção de quitinase e peroxidase, no pepineiro (YEDIDIA et al., 1999). A

habilidade de *Trichoderma* em controlar fungos de solo varia consideravelmente, sendo possível melhorar a eficiência desses agentes pela seleção de isolados com maior potencial de antagonismo, principalmente contra fitopatógenos que interferem na produção de mudas.

A germinação, emergência, desenvolvimento de plantas, florescimento e rendimento são processos que podem ser influenciados por isolados de *Trichoderma* spp. (MELO, 1996). Resultados positivos da interação entre agente de biocontrole e planta são observados quando ocorre melhor desenvolvimento vegetal, e foram encontrados para o tomateiro (CHANG et al., 1986; SIVAN & CHET, 1989; KLEIFELD & CHET, 1992) e pepineiro (CHANG et al., 1986; KLEIFELD & CHET, 1992; MELO, 1996).

De acordo com o exposto, os objetivos deste trabalho foram: verificar a ação de isolados de *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro e pepineiro; identificar a melhor forma de aplicação do agente de biocontrole no controle da fusariose; e identificar a ação conjunta dos tratamentos químico e biológico.

4.2- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos relacionados com a germinação e emergência de sementes de tomate e pepino, bem como, de proteção de mudas com isolados de *T. harzianum* contra a fusariose, foram realizados no laboratório e na câmara de crescimento do Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.2.1 – Inóculo, formulação de *Trichoderma* e fungicida

Como fitopatógenos foram utilizados: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtido de tomateiro e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* obtido de pepineiro, de plantas com sintomas típicos da doença, provenientes da área experimental do DFS/UFSM (Capítulo II). Os isolados HTSR5, ETSR20 e ETSR8 de *T. harzianum*

utilizados como agentes de biocontrole foram previamente selecionados em micro-ambiente (Capítulo III), no qual reduziram a população dos dois isolados de *F. oxysporum* utilizados nos experimentos.

- Inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

Para o preparo do inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, quatro discos de meio BDA (batata, dextrose, agar), contendo micélio e conídios do patógeno, foram colocados em frascos de erlenmeyers de 250 mL que continham 50 g de arroz previamente autoclavados durante 40 min. Após, foram levados à câmara climatizada, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h, por dez dias. Nesse período, o fungo colonizou todo o substrato. Para cada 50 g de arroz colonizado, adicionaram-se 200 mL de água destilada e esterilizada e triturou-se em liquidificador durante 5 min, sendo que para cada mL dessa suspensão foram encontradas 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e 10^7 UFC de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* em meio seletivo NS (NASH & SNYDER, 1962).

- Formulação do pó dos isolados de *Trichoderma harzianum*

Na formulação do “pó” dos isolados de *T. harzianum*, discos de BDA contendo micélio e esporos foram colocados sobre 50 g de arroz, umedecidos com 75 mL de água destilada, em frascos de erlenmeyer previamente autoclavados por 40 min. Os frascos permaneceram em câmara climatizada a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 10 dias, para a colonização do arroz. Após, ocorreu a secagem em estufa (37 °C) e o inóculo foi triturado em liquidificador até ser transformado em pó e passado por uma peneira de 40 meshes. Encontraram-se 10^8 UFC para cada g de pó de *T. harzianum* em meio seletivo para *Trichoderma*.

- Fungicida

O fungicida Thiran®, utilizado no tratamento de sementes, é um ditiocarbamato e apresenta na sua composição bissulfeto de tetrametiluram e

bissulfeto de bis-(dimetil tiocarbamoila). Thiran é utilizado para o tratamento de sementes de cereais, cucurbitáceas, hortaliças, leguminosas e oleaginosas, destinadas ao plantio (GELMINI, 1991).

4.2.2 – Germinação, emergência e desenvolvimento de mudas com sementes tratadas por isolados de *Trichoderma harzianum*

Realizaram-se dois experimentos, um para avaliar a germinação das sementes utilizando-se o método do papel filtro, e o outro, em bandejas de isopor, para avaliar a emergência e o desenvolvimento de mudas.

4.2.2.1 – Germinação

Foram utilizadas 200 sementes de tomate do tipo cereja e de pepino para conserva por tratamento, com quatro repetições de 50 sementes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. As sementes foram submetidas aos tratamentos com isolados de *T. harzianum*: ETSR8, ETSR20, HTSR5, MIX (mistura dos três isolados anteriores) e Testemunha. Para cada tratamento de 200 sementes de tomate e de pepino foram utilizados 0,02 g e 0,03 g de pó de *Trichoderma*, respectivamente, na proporção de 300 g de pó para 60 kg de sementes.

As sementes tratadas foram colocadas em caixas plásticas do tipo “gerbox” sobre duas folhas de papel filtro, umedecidas com água destilada e esterilizada. As caixas gerbox foram colocadas em câmara climatizada, em temperatura de 23 °C, por até catorze dias.

A avaliação constou de duas etapas: a primeira etapa ocorreu nos quarto e quinto dias após a implantação do experimento (primeira contagem), para o pepineiro e tomateiro, respectivamente, e constou do número de sementes germinadas, as quais foram posteriormente retiradas das gerbox; a segunda etapa ocorreu após oito e catorze dias (segunda contagem), para o pepineiro e tomateiro, respectivamente, e constou do número de sementes com germinação normal, germinação anormal, sementes mortas, comprimento de raízes e do hipocótilo das

plântulas. As épocas escolhidas para as avaliações de germinação estão de acordo com a norma proposta por Brasil (1992). Foram consideradas como germinação anormal todas as plântulas que apresentaram deficiências do tipo hipocótilo apodrecido, sem hipocótilo, hipocótilo danificado e sem raiz primária (NAKAGAWA, 1999).

4.2.2.2 – Emergência e desenvolvimento de mudas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e seis repetições, para o tomateiro, e para o pepineiro foram utilizados cinco tratamentos e seis repetições. As sementes de tomate tipo cereja foram submetidas aos tratamentos com isolados de *T. harzianum*: ETSR8, ETSR20, HTSR5 e MIX (mistura dos três isolados anteriores), além de dois tratamentos testemunha (um apenas com pó de arroz e o outro sem tratamento). Para o pepineiro não foi realizado o tratamento testemunha apenas com o pó de arroz. Para cada 96 sementes de tomate e de pepino, foram utilizados 0,01 e 0,02 g de pó de *T. harzianum*, respectivamente, na proporção de 300 g de pó para 60 kg de sementes.

As sementes tratadas foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células, com substrato Plantimax[®]. Cada tratamento constou de 96 sementes, sendo que cada semente foi semeada em uma célula, totalizando 16 células por repetição. As bandejas contendo as sementes de tomate foram acondicionadas em câmara de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h. As bandejas contendo as sementes de pepino foram acondicionadas em estufa plástica, com temperaturas que variaram em média de 12 a 22 °C.

As avaliações constaram do índice de velocidade de emergência, emergência, massa seca de cinco plântulas (secagem em estufa a 45 °C até peso constante), comprimento de parte aérea (do colo até a inserção da última folha) e comprimento de raiz das plântulas. O índice de velocidade de emergência foi obtido pelo cálculo do número de plântulas emergidas diariamente, dividido pelo número de dias transcorridos da semeadura até a data de cada avaliação. Já as demais avaliações ocorreram quando as plantas estavam com 30 dias, época em que poderiam ser transplantadas.

4.2.3 – Controle biológico da murcha de fusário do tomateiro e pepineiro

4.2.3.1 – Tratamento de sementes

Foram realizados experimentos com tratamento de sementes visando semeadura em sementeira e produção de mudas em sacos. O primeiro experimento foi efetuado em bandejas plásticas e o segundo em sacos plásticos e foram empregados os três isolados e o mix (mistura dos três isolados) de *T. harzianum* e o fungicida Thiran®.

4.2.3.1.1 – Experimentos em bandejas

Os primeiros experimentos, tanto para o tomateiro como para o pepineiro, foram realizados em bandejas, por ser um método mais rápido de implantação e ser análogo a utilização de sementeiras. As bandejas plásticas com dimensões de 29 x 43 x 8 cm, foram preenchidas com 1,5 kg de substrato e foram incorporados 100 mL da suspensão de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* por bandeja, para o tomateiro e pepineiro, respectivamente, três dias antes da semeadura.

Para o experimento com tomateiro o delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com seis tratamentos e cinco repetições. As 60 sementes de tomate cereja utilizadas por tratamento foram umedecidas com 0,5 mL de água destilada e esterilizadas e tratadas com 0,01 g de pó (300 g de pó para 60 kg de semente) dos isolados, do mix de *T. harzianum* ou do fungicida Thiran® (GIMENES – FERNANDES, 1998), e as sementes do tratamento testemunha foram apenas umedecidas. Após, foram semeadas três sementes por cova, totalizando quatro covas por tratamento em cada bandeja, no substrato infestado com o patógeno. Não foi efetuado nenhum tipo de barreira para separar os tratamentos nas bandejas, porque a aplicação dos agentes de biocontrole foi via semente e segundo Eastburn & Butler (1988) dependendo da base alimentar disponível, *T. harzianum* não se estende por mais do que poucos milímetros através do solo.

Para o experimento com pepineiro utilizou-se o tratamento químico de

sementes associado ao biológico para observar se ocorreria a soma da ação das duas formas de controle, ou se o químico agiria sobre o agente de biocontrole anulando sua ação, considerando-se que a maior parte das sementes comercializadas é tratada com produtos químicos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com onze tratamentos e cinco repetições. Para os tratamentos biológico ou químico as treze sementes de pepino foram umedecidas com 0,3 mL de água destilada e esterilizada e tratadas com 0,003 g de pó (300 g de pó para 60 kg de semente) dos três isolados, do mix de *T. harzianum* e do fungicida Thiran® (GIMENES – FERNANDES, 1998), isoladamente ou em associação, e nos tratamentos testemunha as sementes foram apenas umedecidas. As sementes que receberam os tratamentos químico e biológico foram primeiramente tratadas com Thiran® e após duas horas foram umedecidas com 0,3 mL de água destilada e esterilizada e receberam o pó de *T. harzianum*. Então, foram semeadas três sementes por cova, totalizando quatro covas por tratamento em cada bandeja, no substrato infestado com o fitopatógeno. Os tratamentos testemunha foram semeados em bandeja com e sem substrato infestado.

As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento com temperaturas de 25 \pm 2 °C para o tomateiro, durante 35 dias e de 23 \pm 2 °C para o pepineiro, durante 30 dias.

As avaliações de incidência e severidade da murcha do tomateiro e do pepineiro foram realizadas aos 35 e 30 dias, respectivamente, após a semeadura. A escala de notas utilizada foi estabelecida por Cotxarrera et al. (2002) usada para a avaliação da severidade da murcha do tomateiro, mas que neste trabalho foi utilizada, também, para avaliar o pepineiro, que se baseia em sintomas externos: 0 – plantas sem sintomas, 1 – menos de 50% das folhas amareladas (cloróticas) ou murchas, 2 – mais de 50% das folhas amareladas (cloróticas) ou murchas (plantas vivas), 3 – plantas tombadas ou mortas.

4.2.3.1.2 – Experimentos em sacos plásticos

Nesses experimentos procurou-se mudar o local de cultivo, pois as variáveis ambientais, tais como profundidade do substrato para desenvolvimento de raízes,

umidade e localização do inóculo, podem influenciar nos resultados. Assim, utilizaram-se sacos plásticos pretos com capacidade para 250 g de substrato. Os sacos foram preenchidos com substrato Plantimax® e colocados um ao lado do outro em bandejas plásticas (como suporte). A infestação do substrato ocorreu com a incorporação de 10 mL da suspensão de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* por saco, para o tomateiro e pepineiro, respectivamente, três dias antes da semeadura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com onze tratamentos e cinco repetições. As sementes de tomate cereja e pepino para conserva receberam tratamento com os três isolados e o mix de *T. harzianum* e o fungicida Thiran® ou tratamento duplo, com o agroquímico e os agentes de biocontrole, além de duas testemunhas (ambas sem tratamento, porém cultivadas em substrato infestado e não infestado). Para os tratamentos biológico ou químico as quinze sementes de tomate e pepino foram umedecidas com 0,3 mL de água destilada e esterilizada e tratadas com 0,002 e 0,003 g, respectivamente, de pó dos respectivos isolados e mix de *T. harzianum* e do fungicida Thiran®. As sementes que receberam o tratamento químico e biológico foram primeiramente tratadas com Thiran® e, após duas horas, foram umedecidas com 0,3 mL de água destilada e esterilizada e receberam o pó de *T. harzianum*. Após, foram semeadas três sementes por cova/saco, em substrato inoculado com o fitopatógeno.

Os sacos plásticos foram mantidos em câmara de crescimento com temperaturas de 25 \pm 2 °C para o tomateiro, durante 35 dias e de 23 \pm 2 °C para o pepineiro, durante 30 dias.

As avaliações de incidência e severidade da murcha do tomateiro e do pepineiro foram realizadas aos 35 e 30 dias, respectivamente, após a semeadura. Para a avaliação da doença foi utilizada a escala de notas de Cotxarrera et al. (2002) descrita no experimento anterior.

4.2.3.2 – Tratamento de substrato

Uma das formas de cultivo do tomateiro e do pepineiro é a semeadura direta no local de cultivo, e nesse caso, pode-se utilizar tratamento biológico de solo, adicionando o agente de biocontrole diretamente nas covas.

O isolado HTSR5 de *T. harzianum* foi escolhido por ter apresentado melhores resultados nos experimentos anteriores, e foram empregadas diferentes dosagens de pó para avaliar-se a quantidade de formulado que deve ser empregada para ocorrer a redução na incidência e severidade da fusariose no tomateiro e pepineiro.

Foram utilizados sacos plásticos pretos com capacidade para 250 g de substrato. Os sacos foram preenchidos com substrato Plantimax® e colocados um ao lado do outro em bandejas plásticas (como suporte). A infestação do substrato ocorreu com a incorporação de 10 mL da suspensão de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* por saco, para o pepineiro e tomateiro, respectivamente, três dias antes da semeadura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições. Foram semeadas três sementes de tomate cereja ou de pepino para conserva por cova, sendo que antes da semeadura foram adicionados 0, 0.25, 0.5 ou 1.0 g de pó do isolado HTSR5 de *T. harzianum* em substrato infestado com o fitopatógeno. Utilizou-se, também, um tratamento testemunha sem adição do agente de biocontrole em substrato não infestado com o patógeno.

A escolha das doses para serem aplicadas nas covas/substrato, foi uma média do sugerido em produtos comerciais, formulados em pó, a base de *Trichoderma* spp., e teve-se o cuidado para não utilizar dosagens altas, porque poderiam prejudicar o desenvolvimento das plantas. Conforme o aumento das doses (0, 2, 4, 6 e 8 g), de formulado em pó de *Trichoderma virens*, foi observado decréscimo na massa seca de parte aérea, em mudas de crisântemo (STEFANELO et al., 2004).

Os sacos plásticos foram mantidos em câmara de crescimento com temperaturas de 25 \pm 2 °C para o tomateiro, durante 35 dias e de 23 \pm 2 °C para o pepineiro, durante 30 dias.

As avaliações de incidência e severidade da murcha do tomateiro e do pepineiro foram realizadas aos 35 e 30 dias, respectivamente, após a semeadura. Para a avaliação da severidade da doença foi utilizada a escala de notas de Cotxarrera et al. (2002) descrita no experimento anterior.

Para o pepineiro o experimento foi realizado duas vezes porque ocorreram altas médias de severidade no primeiro experimento.

4.2.3.3 – Tratamentos de semente e substrato em bandejas de isopor com posterior transplante de mudas de pepineiro

O experimento foi efetuado com duas formas de aplicação dos agentes de biocontrole, via semente e substrato, visando semeadura em bandejas de isopor e posterior transplante de mudas, que segundo Filgueira (2003) é atualmente a forma de cultivo mais difundida para o pepineiro.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 2 (duas testemunhas, três isolados e o mix de *Trichoderma harzianum*) (formas de aplicação - semente e substrato), com cinco repetições.

- Tratamento de sementes

As 18 sementes de pepino utilizadas para cada tratamento, foram umedecidas com 0,3 mL de água destilada e esterilizada e tratadas com 0,005 g de pó (300 g de pó para 60 kg de semente) dos três isolados e do mix de *T. harzianum*. As 18 sementes utilizadas para cada um dos dois tratamentos testemunha (com e sem patógeno) foram apenas umedecidas. Após, as 18 sementes de cada tratamento foram semeadas, uma por célula, em bandejas de isopor (128 células) preenchidas com substrato Plantimax®.

- Tratamento de substrato

Foram pesados 250 g de substrato Plantimax® por tratamento, ou seja, substrato necessário para preencher 18 células da bandeja de isopor (128 células). O substrato pesado foi colocado em saco plástico transparente, e, nesse, foi adicionado de acordo com cada tratamento 2 g de pó de cada um dos três isolados e do mix de *T. harzianum*. Posteriormente agitou-se o saco plástico até ocorrer a mistura do agente de biocontrole ao substrato. Após, preencheram-se as bandejas, sendo uma para cada tratamento, com os substratos contendo os agentes de biocontrole e com o substrato não tratado para as testemunhas. Realizou-se, então, a semeadura das 18 sementes por tratamento, sendo uma semente por célula.

As bandejas de isopor foram mantidas em câmara de crescimento com temperaturas de 23 \pm 2 °C, durante 15 dias.

Vasos plásticos com capacidade para 550 g foram preenchidos com substrato Plantimax® e infestados com 10 mL da suspensão do fitopatógeno três dias antes do transplante das mudas. Três mudas de pepineiro (com quinze dias) crescidas em bandejas de isopor, com substrato ou sementes tratadas pelos isolados ou mix de *T. harzianum*, foram transplantadas para os vasos plásticos infestados com o fitopatógeno. Entretanto, um dos tratamentos testemunha ocupou vasos com substrato não infestado.

Os vasos foram mantidos em câmara de crescimento com temperaturas de 23 ± 2 °C, durante 20 dias. Foram realizadas avaliações de incidência e severidade da murcha do pepineiro, aos 20 dias após o transplante. Para a avaliação da severidade da doença foi utilizada a escala de notas adaptada de Cotxarrera et al. (2002) descrita no experimento anterior.

4.2.3.3.1 – População de *Trichoderma* na rizosfera do pepineiro

A densidade populacional do agente de biocontrole em solo rizosférico do pepineiro pode ser diferente quando a forma de veiculação for pelo substrato ou pelas sementes. Assim, procurou-se analisar a diferença populacional entre as formas de aplicação e os tratamentos, e se esse fato interferiria no controle da fusariose. Portanto, antes de ocorrer o transplante das mudas, foi retirada uma amostra aleatória de substrato das raízes (solo rizosférico) de seis plântulas de cada tratamento, além da amostra do substrato Plantimax® puro, para ser realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Trichoderma* sp. por grama de substrato.

Para a contagem do número de UFC realizaram-se diluições das amostras de substrato e plaqueamento em meios de cultura seletivos. Foram pesados 2 g de substrato de cada amostra dos diferentes tratamentos e acrescentados a frascos de vidro com 98 mL de água destilada e esterilizada e colocados em agitador mecânico por 30 minutos. A partir desta solução original foi feita diluição de 20 vezes, ou seja, 5 mL da solução foram acrescentados em frasco com 95 mL de água destilada e esterilizada. Da diluição uma alíquota de 1 mL foi espalhada, com auxílio de uma alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo meio seletivo para *Trichoderma* spp.

- Meio seletivo para *Trichoderma* – 18 g de agar, 6 g de dextrose, 200 g de

batata, 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,9 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de quintozene, 0,15 g de Rosa de Bengala, 0,1 mg de Benomil, 0,1 mg de Iprodione e 1 L de água. Os fungicidas Benomil e Iprodione foram diluídos em acetona e adicionados ao meio de cultura (0,4 mL/L de meio) para prevenir o crescimento de outras espécies de fungos.

Foram utilizadas 4 placas/repetição, sendo que as mesmas foram incubadas em câmara climatizada a 24 °C, com fotoperíodo de 12h, durante sete dias. Após o período de incubação foi contado em cada placa o número de colônias de *Trichoderma* spp. (UFC)/g de substrato.

4.2.4 – Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e ao teste de Duncan para a comparação de médias. Foi utilizada a transformação dos dados para “arco seno da raiz quadrada de $y/100$ ” nas variáveis apresentadas em percentagem e LOG_{10} (UFC + 1) para o número de UFC de *Trichoderma* spp. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SOC (EMBRAPA - 1986).

4.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 – Experimentos com tomateiro

4.3.1.1 – Germinação, emergência e desenvolvimento de mudas com sementes tratadas por isolados de *Trichoderma harzianum*

Quanto à germinação e ao desenvolvimento de plântulas do tomateiro, observou-se que o tratamento testemunha diferiu significativamente dos tratamentos com os isolados e mix de *T. harzianum*, apresentando menor percentagem de plântulas anormais e maior desenvolvimento de radícula. O isolado ETSR20 diferiu

significativamente dos demais isolados de *T. harzianum* apresentando menor comprimento de raiz e juntamente com o isolado ETSR8, menor percentagem na primeira contagem de plântulas (Tabela 8).

Tabela 8 – Germinação e desenvolvimento de plântulas em sementes de tomate tratadas com isolados de *Trichoderma harzianum*, em teste do papel filtro. Santa Maria – RS.

Tratamentos	Primeira contagem (%)	Plântulas normais (%)	Plântulas anormais (%)	Sementes mortas (%)	Comprimento hipocótilo (cm)	Comprimento radícula (cm)
ETSR8	0.5* bc	55.5 ab	33.0 a	11.5 c	4.0 b	2.9 c
ETSR20	0.0 c	36.5 b	35.0 a	31.5 a	4.3 ab	1.6 d
HTSR5	10.5 a	65.5 a	21.5 ab	13.0 bc	5.2 ab	3.9 b
MIX	4.0 b	61.5 ab	11.0 b	27.5 ab	4.3 ab	3.2 bc
Testemunha	21.0 a	80.5 a	2.2 c	17.5 abc	5.6 a	5.2 a
Média	7.2	59.9	20.5	20.2	4.7	3.4
CV	47.2%	20.3%	24.6%	26.9%	19.8%	16.4%

* Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

O número de sementes podres, dentre as mortas, não ultrapassou 1% em todos os tratamentos com os isolados de *T. harzianum*, mas observou-se, após a última avaliação (14 dias), que as sementes poderiam apodrecer devido ao total envolvimento das mesmas pelo fungo. Foi constatado no presente experimento que *T. harzianum* pode atuar como apodrecedor de sementes se as mesmas estiverem em contato com o agente de biocontrole e o ambiente apresentar umidade, pois o fungo se desenvolve rapidamente sobre o envoltório das sementes. O tratamento de sementes com *Trichoderma* sp. deve, portanto, ser efetuado pouco tempo antes das mesmas serem semeadas.

Quanto à emergência e ao desenvolvimento de plântulas de tomateiro, cultivadas em substrato, em bandejas de isopor, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos com os isolados de *T. harzianum* (Tabela 9), evidenciando que os isolados e o mix de *Trichoderma* não auxiliaram para que ocorresse melhor desenvolvimento e vigor de mudas. Embora as mudas não tenham sido transplantadas para se observar o desenvolvimento e o rendimento dos tomateiros que poderia ser diferenciado na maturidade, mostrando a influência dos isolados de *T. harzianum*. Harman (2000) utilizando aplicação de nitrogênio no solo juntamente

com o isolado T-22 de *T. harzianum*, constatou que inicialmente não ocorreram diferenças entre as áreas com e sem tratamento, mas na maturidade das plantas de milho, ocorreram diferenças no diâmetro de talos e rendimentos de grãos e silagem.

Tabela 9 – Emergência e desenvolvimento de mudas a partir de sementes de tomate tratadas com isolados de *Trichoderma* sp., cultivadas em bandejas de isopor. Santa Maria – RS.

Tratamentos	Índice de Velocidade de emergência	Emergência (%)	Massa seca* (g)	Comprimento parte aérea (cm)	Comprimento raiz (cm)
ETSR8	1.1** ns	47.8 ns	0.11 ns	6.0 ns	7.5 ns
ETSR20	1.2	50.9	0.11	6.3	7.6
HTSR5	1.1	44.8	0.16	6.2	7.2
MIX	1.3	57.3	0.13	6.0	7.4
Pó de arroz	1.3	56.2	0.14	6.3	7.3
Testemunha	1.2	49.9	0.13	6.1	7.5
Média	1.2	51.1	0.13	6.2	7.4
CV	24.3%	22.7%	42.6%	13.1%	9.0%

* média de 5 plântulas.

ns – sem diferença significativa ($p < 0.05$).

Esses resultados diferem dos encontrados por Ozbay et al. (2004) nos quais os isolados T22 e T95 de *T. harzianum* não auxiliaram na emergência do tomateiro, mas aumentaram o crescimento de plântulas. De acordo com Sudo-Martelletto et al. (2004), isolados de *Trichoderma* spp. interferiram positivamente no índice de velocidade de emergência do tomateiro, em substrato argiloso, mas apresentaram altas percentagens de plântulas anormais. Segundo Kleifeld & Chet (1992) *T. harzianum* aumentou a emergência e comprimento de plântulas de tomateiro com tratamento de sementes, sendo que a emergência foi menor (30%) quando a suspensão de conídios do agente de biocontrole foi incorporada diretamente no solo antes da semeadura. Para Ahmad & Baker (1987) o tratamento de sementes com isolado de *T. harzianum* aumentou em 20% a emergência de plântulas de tomateiro quando comparado com o tratamento testemunha, e o tratamento de sementes apresentou aumento de 20% na emergência quando comparado ao tratamento de solo.

4.3.1.2 – Controle da murcha do tomateiro por diferentes isolados de *Trichoderma harzianum*

4.3.1.2.1 – Tratamento de sementes

No experimento realizado em bandejas, observou-se que o tratamento com o isolado HTSR5 de *T. harzianum* diferiu significativamente dos demais, apresentando menor incidência de murcha e que os tratamentos com o isolado ETSR8 e Thiran não diferiram do tratamento testemunha (Tabela 10).

Tabela 10 – Incidência (%) e severidade (notas) da murcha de fusário em mudas de tomateiro, em tratamento de semente com isolados e mix de *Trichoderma harzianum* e Thiran®. Santa Maria – RS.

Tratamentos	Incidência (%)	Controle – incidência (%)	Severidade (notas)
Testemunha	98* a	-	2.0 a
HTSR5	43 c	56	1.2 c
ETSR20	62 b	37	1.2 c
ETSR8	83 a	15	1.6 b
MIX	65 b	33	1.4 bc
Thiran®	83 a	15	1.7 ab
CV	15%		9%

* Média de 5 repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Os tratamentos com os isolados e o mix de *T. harzianum* apresentaram menores notas de severidade quando comparados ao tratamento testemunha, o que não ocorreu com o tratamento com fungicida (Tabela 10). As notas referentes a severidade da murcha do tomateiro ficaram entre 1 e 2, evidenciando que as plantas estavam com folhas amareladas e murchas (comprometidas), mas estavam vivas.

O isolado HTSR5 apresentou 56% de controle da incidência da murcha do tomateiro e os tratamentos com o isolado ETSR8 e o fungicida Thiran, não apresentaram controle (Tabela 10). Larkin & Fravel (1998) encontraram variações de 35 a 75 % na atuação de diferentes isolados de *Trichoderma* sp., em tratamento de

sementes, na incidência da murcha do tomateiro. O tratamento de sementes com *T. harzianum* promoveu controle de 73 % (SIVAN et al., 1987) e 75 % (DATNOFF et al., 1995) na podridão de raiz causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, e de 87% no tombamento de mudas causado por *Pythium aphanidermatum* (SIVAN et al., 1984), em tomateiro.

A diferença, em percentagem de controle, entre o tratamento fungicida (Thiran®) e o isolado HTSR5 de *T. harzianum* foi de 41 %, semelhante ao encontrado por Reis et al. (1995) entre isolado de *Trichoderma* spp. e o fungicida Benomyl que constou de 23,3 %. Os resultados mostram, que em alguns casos, isolados de *Trichoderma* spp. podem ser mais efetivos no controle de fungos de solo do que alguns fungicidas.

Para o segundo experimento com tratamento de sementes, realizado em sacos plásticos (Tabela 11), a incidência e a severidade da fusariose foi 10 e 15 %, respectivamente, mais elevadas do que no experimento anterior, efetuado em bandejas (Tabela 10), sem comparar com os tratamentos testemunhas (substrato infestado).

Tabela 11 – Incidência (%) e severidade (notas) da murcha de fusário em mudas de tomateiro, com tratamentos biológico (isolados e mix de *Trichoderma harzianum*) e/ou químico (fungicida Thiran®) de semente. Santa Maria – RS.

Tratamentos	Incidência (%)	Severidade (notas)
Testemunha sem inóculo	0.0 **	-
Testemunha com inóculo	93 a	1.9 a
HTSR5	87 a	1.1 b
ETSR8	87 a	1.7 ab
ETSR20	87 a	1.5 ab
MIX	93 a	2.0 a
Thiran®	93 a	2.0 a
Thiran® + HTSR5	80 a	1.6 ab
Thiran® + ETSR8	93 a	1.9 a
Thiran® + ETSR20	93 a	1.8 ab
Thiran® + MIX	87 a	1.7 ab
CV	19	15

* Média de 5 repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

** A média zero não entrou na análise.

Com relação a incidência da murcha do tomateiro, não ocorreram diferenças significativas do tratamento testemunha (com inóculo) quando comparado aos tratamentos biológico e/ou químico (Tabela 11).

Quanto à severidade, a menor nota foi do tratamento com o isolado HTSR5 de *T. harzianum*, diferindo significativamente do tratamento testemunha. As notas referentes à severidade da murcha do tomateiro ficaram entre 1 e 2, como no experimento anterior (Tabela 11).

4.3.1.2.2 – Tratamento de substrato

A concentração de 0,5 g do formulado do isolado HTSR5 de *T. harzianum* foi a que apresentou menor incidência da doença (87%) (Figura 7).

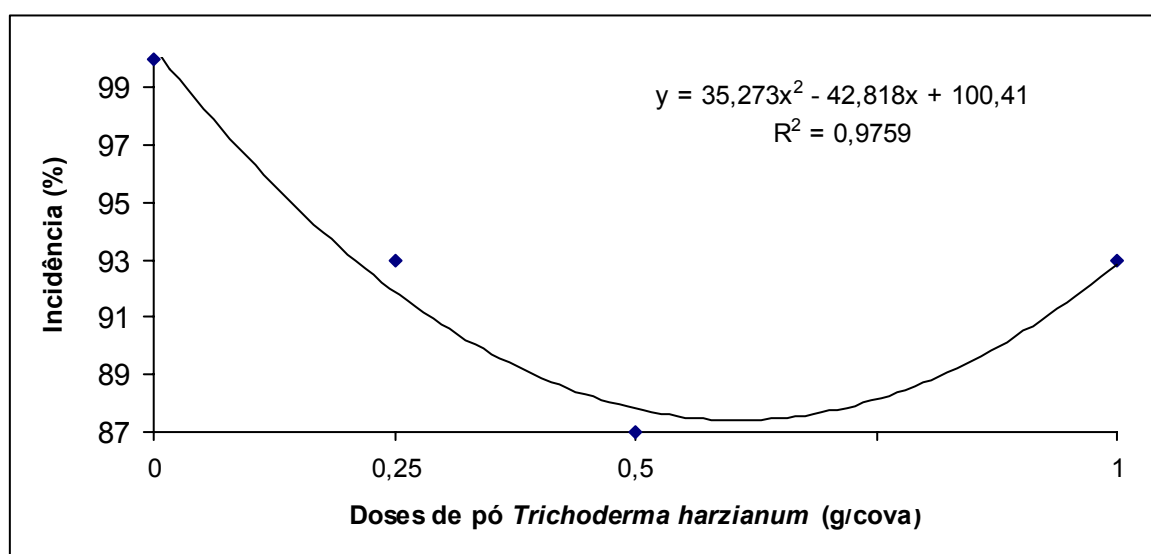


Figura 7 – Incidência (%) da murcha do tomateiro, em substrato infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em tratamento de substrato, com diferentes doses de pó (formulado) do isolado HTSR5 de *T. harzianum*. Santa Maria – RS.

O controle da incidência da murcha do tomateiro foi de no máximo 13 %, o qual foi promovido pela concentração de 0,5 g do formulado de *T. harzianum* – HTSR5. Observou-se controle de até 69 %, por dois isolados de *T. asperellum*, em solo esterilizado (COTXARRERA et al., 2002) e de 63 % em solo tratado com suspensão de *Trichoderma* spp. (LARKIN & FRAVEL, 1998), da incidência da

murcha de fusário do tomateiro. A aplicação de grânulos de *T. harzianum* (isolado T-22) no solo de estufa (DATNOFF, 1995), assim como de um isolado de *T. harzianum* à campo (SIVAN et al., 1987), promoveram proteção do tomateiro contra a podridão de raiz causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, até a maturidade da cultura.

Pôde-se constatar que a incidência da murcha do tomateiro foi alta, tanto em tratamento de semente (Tabela 11) como de substrato (Figura 7), nos experimentos efetuados em sacos plásticos, com mesma quantidade de inóculo do fitopatógeno. A incidência encontrada nesses experimentos foi maior quando comparada com o experimento em bandejas plásticas. A dosagem (pode ter sido alta) e a localização (concentrou na região onde ocorreu a semeadura) do inóculo podem ter influenciado para que ocorresse maior incidência da fusariose. Altas concentrações populacionais do fitopatógeno alteram a ação dos agentes de biocontrole e essa pode ser a explicação para a baixa percentagem de controle da fusariose principalmente no segundo experimento, com tratamento de sementes, em sacos plásticos (Tabela 11). Segundo Howell et al. (1997), a pressão excessiva do patógeno (alta concentração de inóculo) pode arruinar a efetividade do controle biológico. Para Noronha et al. (1996), o aumento da severidade da doença foi proporcional ao incremento do inóculo de *Rhizoctonia solani* e, de acordo com Sivan & Chet (1989), o nível de colonização da rizosfera do meloeiro pelo isolado T-35 de *T. harzianum* foi afetado pela densidade de inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* no solo.

Outras variáveis que podem ter influenciado nos resultados, como a temperatura adequada ao desenvolvimento do patógeno, pois os experimentos foram desenvolvidos em câmara de crescimento com temperaturas de 25 ± 2 °C e a temperatura ideal para o patógeno é de 25 a 28 °C (ZAMBOLIM et al., 1997) e o número de plantas por saco, pois não foi realizado desbaste dos tomateiros, deixando duas ou três plantas por cova.

A severidade da murcha do tomateiro variou de 1,8 a 2,8 que foram as notas da concentração de 0,5 g do formulado de *T. harzianum* – HTSR5 e da testemunha, respectivamente (Figura 8).

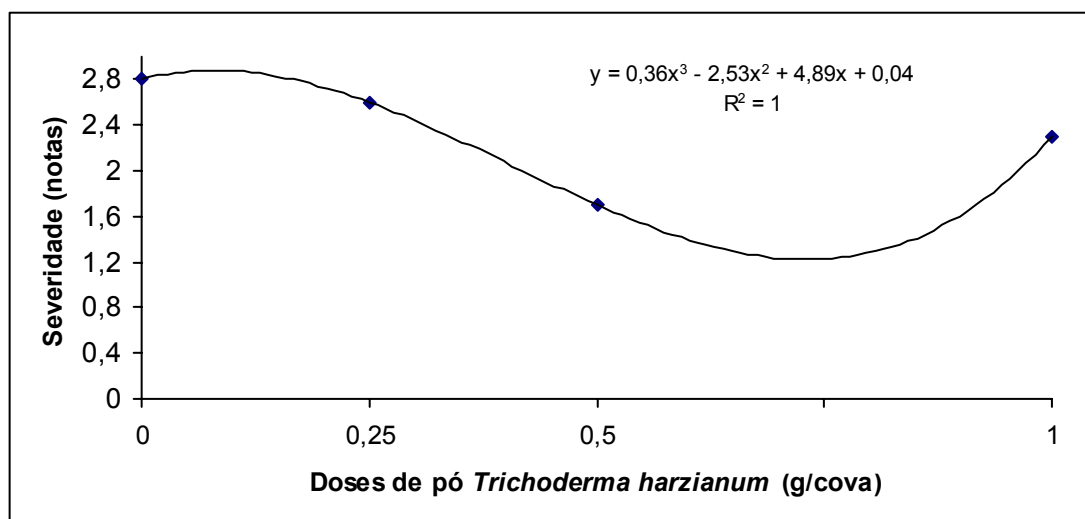


Figura 8 – Severidade (notas) da murcha do tomateiro, em substrato infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em tratamento de substrato, com diferentes doses de pó (formulado) do isolado HTSR5 de *Trichoderma harzianum*. Santa Maria – RS.

Esses resultados mostram que, nesse experimento, as plantas estavam com folhas amarelas, murchas e na maioria, mortas. Já Cotxarrera et al. (2002) encontraram notas de 0,4 a 0,8 para severidade da murcha do tomateiro, em solo natural ou esterilizado com tratamento biológico de dois isolados de *T. asperellum*.

4.3.2 – Experimentos com pepineiro

4.3.2.1 – Germinação, emergência e desenvolvimento de plântulas

Quanto à germinação e o desenvolvimento de plântulas do pepineiro, o tratamento testemunha não apresentou diferenças significativas com relação aos tratamentos com os isolados HTSR5 e ETSR8 de *T. harzianum*, embora os tratamentos com o isolado ETSR20 e o mix tenham inibido a germinação e o desenvolvimento de hipocótilo e radícula (Tabela 12).

Na percentagem de sementes mortas os tratamentos com *T. harzianum* não diferiram do tratamento testemunha (Tabela 12), demonstrando que os mesmos não foram prejudiciais, pois as sementes não sofreram danos ou apodrecimento. Em contraste com os resultados encontrados para o tomateiro (Tabela 8), nos quais o isolado ETSR20 e o mix de *T. harzianum* apresentaram maior percentagem de

sementes mortas do que a testemunha, ocorrendo diferença no comportamento do isolado para as duas culturas.

Tabela 12 – Germinação e desenvolvimento de plântulas em sementes de pepineiro tratadas com isolados e mix de *Trichoderma harzianum*, em teste do papel filtro. Santa Maria – RS.

Tratamentos	Primeira contagem (%)	Plântulas normais (%)	Plântulas anormais (%)	Sementes mortas (%)	Comprimento hipocótilo (cm)	Comprimento radícula (cm)
ETSR8	23.0*a	51.0 b	23 b	26 a	3.3 ab	5.7 a
ETSR20	0.5 b	0.5 d	72 a	27 a	0.2 c	0.6 c
HTSR5	23.0 a	58.0 ab	14 b	27 a	4.3 a	6.2 a
MIX	0 b	11.0 c	71 a	17 a	2.8 b	3.8 b
Testemunha	22.0 a	69.0 a	15 b	19 a	4.2 a	6.9 a
Média	14	37	39	23	2.9	4.6
CV	41%	12%	18%	32%	27%	19%

* Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Com relação ao índice de velocidade de emergência e a emergência do pepineiro, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos. No desenvolvimento de plântulas, os isolados HTSR5 e ETSR20 apresentaram maior comprimento de parte aérea, diferindo significativamente do tratamento testemunha (Tabela 13), em contraposição aos resultados encontrados para o tomateiro, onde não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos com os diferentes isolados e o mix de *T. harzianum* (Tabela 9).

Tabela 13 – Emergência e desenvolvimento de mudas em sementes de pepineiro tratadas com isolados de *Trichoderma harzianum*, cultivadas em bandejas de isopor. Santa Maria – RS.

Tratamentos	Índice de Velocidade de emergência	Emergência (%)	Massa seca* (g)	Comprimento parte aérea (cm)	Comprimento raiz (cm)
ETSR8	1.23 a	70.8 a	1.1 b	4.1 d	7.1 b
ETSR20	1.24 a	73.9 a	1.7 ab	4.8 ab	7.6 ab
HTSR5	1.21 a	72.9 a	2.4 a	5.1 a	8.4 a
MIX	1.10 a	61.5 a	1.7 ab	4.3 cd	8.3 a
Testemunha	1.11 a	70.8 a	1.9 ab	4.6 bc	7.6 ab
Média	1.18	70	1.8	4.6	8.1
CV	21.5%	18%	41%	8.3%	12%

* peso de 5 plântulas por repetição.

* Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Inbar et al. (1994) observaram um aumento de 24 % na altura, 96 % de área foliar e 25 % de massa seca em plântulas de pepineiro cultivadas em substrato tratado com o isolado T-203 de *T. harzianum*. O mesmo isolado, porém utilizado em tratamento de sementes, apresentou aumento de 20 % no comprimento e 15 % na massa seca de pepineiros (KLEIFELD & CHET, 1992). As formas de atuação de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento de plantas têm sido pesquisadas para uma gama de culturas. A promoção no crescimento pode estar relacionada com o controle de patógenos secundários na rizosfera, produção de hormônios pela planta, disponibilização de nutrientes do solo ou matéria orgânica e aumento na captação ou translocação de minerais (KLEIFELD & CHET, 1992). Procurando respostas para o estímulo do crescimento do pepineiro por isolado de *T. harzianum*, em meio hidropônico, Yedidia et al. (1999), constataram que a interferência no seu desenvolvimento estava na interação formada entre fungo e planta, descartando o controle de patógenos secundários na rizosfera. De acordo com Yedidia et al. (2001), ocorreu maior desenvolvimento de plantas e maior concentração de nutrientes nas folhas e raízes, com a adição de *T. harzianum* e micronutrientes no cultivo de pepineiro em meio hidropônico e em estufa. Porém, duas linhagens mutantes de *T. koningii*, hiperprodutoras de celulase, aumentaram a emergência e o peso seco de pepineiros, tendo sido sugerido que a causa seria o controle ou exclusão de patógenos menores no rizoplano (MELO, 1996).

O tratamento com o isolado ETSR20, que apresentou os piores resultados no teste de germinação, mostrou as melhores médias no índice de velocidade de emergência e emergência, além de não diferir do tratamento testemunha quanto à massa seca, comprimento de parte aérea e raiz. Isso demonstra que os resultados obtidos em testes de laboratório muitas vezes não condizem com a realidade *in vivo*, ou ainda, que o comportamento de fungos de solo como *Trichoderma* sp. pode modificar quando colocado em outro ambiente. Tais modificações podem estar relacionadas com a liberação de metabólitos prejudiciais à germinação e/ou ao desenvolvimento das plântulas. A antibiose, segundo Luz (1991), é o principal mecanismo de ação, na espermosfera, dos microrganismos aplicados na microbiolização de sementes.

4.3.2.2 – Controle biológico da murcha de fusário do pepineiro

4.3.2.2.1 - Tratamento de sementes

No primeiro experimento, com tratamento de sementes, em bandejas, ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, tanto para a incidência quanto para a severidade da murcha de fusário do pepineiro (Tabela 14). Todos os tratamentos com isolados de *T. harzianum* e/ou com o fungicida Thiran®, foram melhores do que o tratamento testemunha, controlando a incidência da doença. Pode-se salientar que três tratamentos apresentaram percentagens de controle acima de 40 %, sendo dois tratamentos biológico e químico, com o isolado HTSR5 (47 %) e MIX (42 %), e um tratamento com o isolado HTSR5 de *T. harzianum* (44 %).

Tabela 14 – Incidência e severidade (%) da murcha de fusário em pepineiro, em função do tratamento biológico (isolados e mix de *Trichoderma harzianum*) e/ou químico (fungicida Thiran®) de sementes. Santa Maria – RS.

Tratamentos	1º experimento - bandejas			2º experimento – sacos plásticos		
	Incidência (%)	Controle* (%)	Severidade (notas)	Incidência (%)	Controle* (%)	Severidade (notas)
Testemunha s/inóculo	0**	-	-	0	-	-
Testemunha c/inóculo	97*** a	-	3 a	100 a	-	3 a
HTSR5	54 b	44	1.7 b	51 ab	-	2 ab
ETSR8	69 b	29	1.7 b	83 ab	-	2.5 ab
ETSR20	72 b	26	1.7 b	67 ab	-	2 ab
MIX	71 b	27	2.1 b	67 ab	-	2 ab
Thiran®	69 b	29	1.6 b	75 ab	-	2 ab
Thiran® + HTSR5	51 b	47	1.6 b	46 ab	-	1.8 ab
Thiran® + ETSR8	70 b	28	1.9 b	83 ab	-	2 ab
Thiran® + ETSR20	70 b	28	1.4 b	42 b	58	1.4 b
Thiran® + MIX	56 b	42	1.7 b	75 ab	-	2.4 ab
CV	23%		29%	38%		45%

* Controle da incidência.

** Média zero não entrou na análise estatística.

***Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Para o segundo experimento, efetuado em sacos plásticos, o tratamento com

Thiran® e o isolado ETSR20 de *T. harzianum* apresentou menor incidência da fusariose, apresentando diferença significativa com relação aos demais tratamentos (Tabela 14).

Para Harman (2000) em quase todos os casos, os melhores resultados de colheitas foram obtidos em campos com tratamentos biológico (isolado T-22 de *T. harzianum*) e químico de sementes. O tratamento de sementes de algodão com *T. virens* mais fungicida (metalaxyl) apresentou maior sobrevivência de plântulas quando comparado aos tratamentos apenas com *T. virens* ou com o fungicida, em três localidades na Califórnia com histórico de tombamento de mudas (HOWELL, 1997). Para a planta ornamental equinácea o tratamento biológico (*Trichoderma* spp.) e químico (fungicida fludioxonil) promoveu 100% de controle do tombamento de mudas causado por *Fusarium* spp. (WANG et al., 2005). Foi obtido controle de 56, 62 e 62 % da murcha de fusário do maracujazeiro, com controle integrado de *Trichoderma* spp. e os fungicidas: prochloraz, carbendazim e benomyl, respectivamente (BATISTA et al., 2002). De acordo com Howell et al. (1997), o principal objetivo da utilização dos tratamentos biológico e químico de sementes seria desenvolver uma proteção mais longa, pela colonização e proteção do sistema radicular em desenvolvimento e redução do inóculo do patógeno no solo.

Isolados de *Trichoderma* apresentam desenvolvimento na espermosfera e na rizosfera, mesmo com a presença de fungicidas. *Trichoderma* spp. foi encontrado na espermosfera de sementes de nabo forrageiro, após 15 dias do tratamento com fungicida Thiran® e um formulado em pó, a base de *Trichoderma* spp. (CRUZ et al., 2004). Foi retirado da rizosfera, em tratamento de substrato com isolados de *Trichoderma* sp. e da água com fungicidas oxicloreto, iprodione e oxicloreto + iprodione, em sistema de floting para o cultivo de mudas de fumo (MATSUMURA et al., 2004) e no tratamento de sementes de milho com *T. harzianum* e os fungicidas Captan® e Maxim® (RESENDE et al., 2004).

As altas percentagens de incidência da murcha de fusário do tomateiro nos experimentos efetuados em sacos plásticos, não se repetiram para o pepineiro. Nos experimentos para o pepineiro o inóculo do fitopatógeno foi melhor distribuído, incorporado, no substrato contido nos sacos plásticos.

4.3.2.2.2 - Tratamento de substrato

Nos dois experimentos realizados com tratamento de substrato, a menor incidência da murcha de fusário do pepineiro ocorreu quando se utilizou 1 g de pó do isolado HTSR5 de *T. harzianum* por cova, sendo que o controle foi de 33% para o primeiro e 42% para o segundo experimento (Figura 9). Porém, para o controle da fusariose do tomateiro, encontrou-se melhor resultado na dose de 0,5 g de pó de *T. harzianum* (Figura 7), ocorrendo variação na dose-resposta para obtenção de maior controle da fusariose nas duas culturas. A explicação pode estar relacionada a maior ação do isolado HTSR5 sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* do que *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Para Reis et al. (1995), isolado de *Trichoderma* spp. apresentou 44,7 % de controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* com a aplicação de 0,5 g de pó, por cova, no feijoeiro. Usando diferentes isolados e concentrações (5 e 10 g de sementes de trigo colonizadas) de *Trichoderma* sp., Patrício et al. (2001), observaram variações de 0 a 41 % no controle de tombamento de pepineiro causado por *Pythium aphanidermatum*.

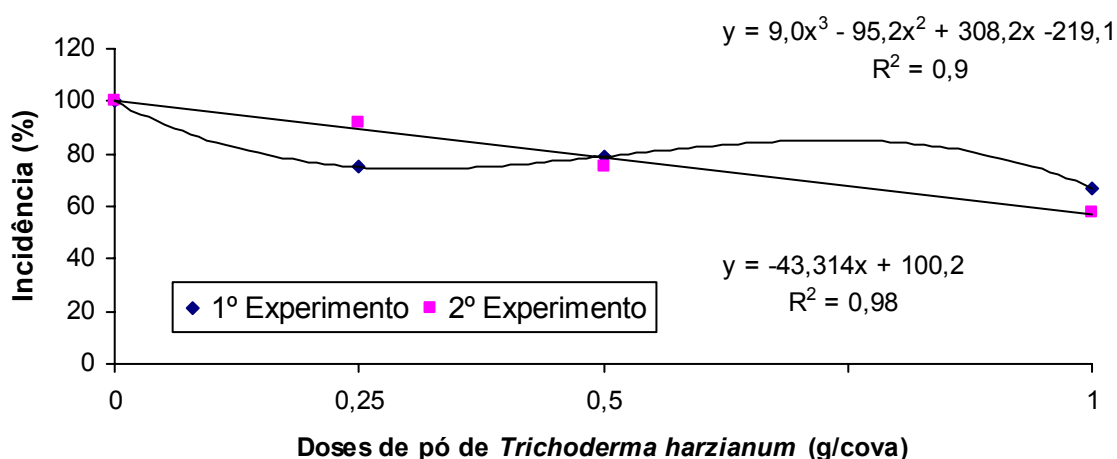


Figura 9 – Incidência (%) da murcha de fusário em pepineiro, em tratamento de substrato com diferentes doses de pó (formulado) do isolado HTSR5 de *Trichoderma harzianum*. Santa Maria – RS.

Melloni et al. (1995) observaram 40% mais na germinação de pepineiros com a adição de lixo urbano e E.M.4 (effective microorganisms) em substrato infestado com *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Segundo Rose et al. (2003) *T. harzianum*

apresentou redução de 9% no tombamento de mudas do pepineiro causado por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, em tratamento de solo com suspensão do agente de biocontrole. Já Sivan et al. (1984) observaram redução de 69% no tombamento de mudas de pepineiro em solo infestado com *Pythium aphanidermatum* usando *T. harzianum* no solo.

Para a severidade não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Nos dois experimentos, as médias de notas ficaram entre 2,4 (1 g de pó do isolado HTSR5) e 3 (0 g), sendo que nesse intervalo as plantas apresentaram murcha excessiva ou estavam mortas. Porém, no tomateiro a menor nota para a severidade ocorreu na adição de 0,5 g de pó de *T. harzianum* no solo (Figura 8).

4.3.2.2.3 – Tratamento de semente e substrato em bandejas de isopor com posterior transplante de mudas

O número de UFC de *Trichoderma* sp. em solo rizosférico de mudas do pepineiro foi encontrado em maior quantidade no tratamento com o mix e com o isolado HTSR5 de *T. harzianum*, veiculados pelo substrato. No geral, as médias do número de UFC para *Trichoderma* sp. foram maiores quando a forma de tratamento foi o substrato (Tabela 15). Porém, para Ahmad & Baker (1987) não foram encontradas diferenças significativas na densidade populacional de dois isolados de *T. harzianum* veiculados pelo solo e sementes, na rizosfera do tomateiro.

No tratamento testemunha, onde não foi adicionado *T. harzianum* nas sementes, o número de UFC não diferiu dos demais tratamentos (Tabela 15), mostrando que os propágulos de *Trichoderma* sp. encontrados no substrato puro (3,12 Log) se desenvolveram na rizosfera dos pepineiros.

Tabela 15 – Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Trichoderma* spp. em solo rizosférico de mudas de pepineiro que receberam tratamento de sementes ou de substrato com isolados ou mix de *Trichoderma harzianum*. Santa Maria – RS.

Tratamentos	Formas de tratamento LOG ₁₀ (UFC + 1)	
	Semente	Substrato
Testemunha	3,41* aA	3,67 aA
Isolado ETSR8	3,60 aA	3,69 aA
Isolado ETSR20	3,56 aA	3,67 aA
Isolado HTSR5	3,38 aB	3,98 aA
MIX (3 isolados)	3,31 aB	4,36 aA
CV	5,9%	5,9%

*Média de 4 placas/repetições. Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

No geral, houve pouca variação no número de UFC de *Trichoderma* sp. entre os tratamentos, principalmente quando a aplicação foi via sementes. Pode-se dizer que existe um ponto máximo de desenvolvimento populacional de *Trichoderma* na rizosfera, sendo que o aumento da população ocorre até o “ponto” em que o ambiente suporta. De acordo com Odum (1988) sobre padrões de crescimento populacional, a população aumenta lentamente no início (fase de estabelecimento ou de aceleração positiva), depois, mais rapidamente (aproximando-se, talvez, de uma fase logarítmica), mas logo a taxa de aumento vai diminuindo, à medida que a percentagem de resistência ambiental vai aumentando (fase de aceleração negativa), até o equilíbrio ser alcançado e “mantido”.

A resistência ambiental (fator limitante) está relacionada principalmente aos níveis de nutrientes liberados na rizosfera (SIVAN & CHET, 1989), pois segundo Rovira et al. (1974) os exudatos liberados pelas raízes apresentam baixas concentrações de carbono que é a energia requerida pela microflora rizosférica. Talvez esse seja o motivo da competitividade que é evidente no ambiente rizosférico, pois de acordo com Sivan & Chet (1989) não ocorreu redução na murcha de fusário do algodoeiro em tratamento de sementes com isolado T-35 de *T. harzianum*, quando foram adicionadas altas concentrações de glucose e asparagina (exsudatos) em substrato infestado com *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Os mesmos autores mencionaram que a competição foi a principal forma de ação de *T.*

harzianum na rizosfera, não tendo sido excluídos outros mecanismos de biocontrole.

As mudas de pepineiro produzidas com diferentes isolados e mix de *T. harzianum*, veiculados pelas sementes ou substrato, foram transplantadas para vasos plásticos com inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Nos resultados para a incidência e severidade da murcha de fusário não ocorreu interação entre os fatores, mas ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos com os isolados e o mix de *T. harzianum* (Tabela 16) e entre os dois métodos de aplicação dos antagonistas (Tabela 17).

Tabela 16 – Incidência (%) e severidade (notas) da murcha de fusário em mudas de pepineiro transplantadas de bandejas de isopor, sob diferentes tratamentos com isolados e mix de *Trichoderma harzianum*, veiculados pelas sementes ou substrato. Santa Maria – RS.

Tratamentos	Incidência (%)	Controle - incidência (%)	Severidade (notas)
Testemunha s/ inóculo	0*	-	0
Testemunha c/inóculo	93**a	-	3.0 a
Isolado ETSR8	87 a	-	2.5 ab
Isolado ETSR20	87 a	-	2.6 ab
Isolado HTSR5	60 b	35	1.9 bc
MIX (3 isolados)	54 b	42	1.6 c
CV	29%		30%

* Média zero não entrou na análise estatística.

**Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Tabela 17 – Incidência (%) e severidade (notas) da murcha de fusário em mudas de pepineiro transplantadas de bandejas de isopor, sob diferentes formas de aplicação (semente ou substrato) dos isolados e mix de *Trichoderma harzianum*. Santa Maria – RS.

Formas de tratamento	Incidência (%)	Severidade (notas)
Substrato	88* a	2.6 a
Sementes	70 b	2 b

* Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

A menor incidência e severidade da murcha de fusário ocorreram nos

tratamentos com o mix e com o isolado HTSR5 de *T. harzianum*, sendo que o controle foi de 42 e 35%, respectivamente (Tabela 16). Já Inbar et al. (1994) encontraram redução de 67% no tombamento de mudas de pepineiro, em plântulas crescidas em substrato tratado com o isolado T203 de *T. harzianum* e transplantadas para estufa comercial infestada com *Pythium* sp e *Rhizoctonia* sp. Mudas de tomateiro foram cultivadas em substrato com grânulos de *T. harzianum* T-22 e depois transplantadas para o campo com as raízes colonizadas pelo agente de biocontrole, reduzindo a ação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* e aumentando o rendimento de frutos (DATNOFF et al., 1995). Assim como mudas de pimentão produzidas com grânulos de *T. harzianum* T-22 em estufa e transplantadas para o campo sob condições ambientais inadequadas, foi observado maior sobrevivência e rendimento nas plantas tratadas do que para as não tratadas (HARMAN, 2000).

Observou-se que as maiores médias de UFC de *Trichoderma* sp. foram encontradas na rizosfera das mudas de pepineiro que receberam tratamento de substrato (Tabela 15). No entanto, as maiores médias de incidência e severidade, também, foram encontradas para essa forma de aplicação dos agentes de biocontrole (Tabela 17). Porém, de acordo com Sivan & Chet (1989), aumentando a concentração de conídios do isolado T-35 de *T. harzianum* no tratamento de solo resultou na diminuição da colonização da rizosfera por *Fusarium* sp., sendo que uma das estratégias para o controle de doenças por patógenos veiculados pelo solo é prevenir sua proliferação, mantendo sua população em níveis baixos (TOYOTA et al., 1996). Altas densidades populacionais de agentes de biocontrole no ambiente solo são importantes, principalmente em locais com alta infestação de fitopatógenos, pois tanto *Trichoderma* spp. quanto *Fusarium* spp. são fungos saprofíticos e por ocuparem o mesmo nicho certamente competirão pela ocupação do ambiente, o que fica evidenciado por Tauk (1990), que encontrou *Trichoderma* e *Fusarium* como agentes de decomposição de folheto, em área de cerrado.

A microbiolização das sementes apresentou melhores resultados, pois tanto a incidência quanto a severidade foram menores, 18 e 23 %, respectivamente, do que quando os isolados de *T. harzianum* foram veiculados pelo substrato (Tabela 17), concordando com Ahmad & Baker (1988), que observaram 20% a mais de controle em *damping off* de pré-emergência causado por *Pythium ultimum* em pepineiro quando *T. harzianum* foi aplicado via sementes. Talvez a forma de aplicação do

agente de biocontrole seja preponderante à dosagem, no controle de patógenos de solo, pois é essencial que ocorra a interação entre o agente de biocontrole e a planta e que o biocontrolador tenha a habilidade em se desenvolver e competir na espermosfera e rizosfera. A microbiolização de sementes, além de ser um método útil e promissor para o controle de patógenos das sementes e dos que sobrevivem no solo (LUZ, 1991), pode ser considerado um importante método de aplicação de biocontroladores, tendo em vista a pequena quantidade de material biológico requerido em relação àquela necessária para aplicação no solo (NORONHA et al., 1996).

A habilidade de agentes de biocontrole em colonizar a espermosfera e alcançar altas densidades populacionais durante as primeiras 24 h da germinação é importante para a proteção das sementes por infecção de patógenos (NELSON, 2004). Esporos de *Trichoderma* quando inoculados em sementes de ervilha, requereram de 10 a 14 horas para germinarem mais de 50 % dos conídios (LIFSHITZ et al., 1986). Já para *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (meloeiro) e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (algodoeiro) a germinação de clamidósporos ocorreu após 18 e 24 h de inoculação, em solo enriquecido com nutrientes e na rizosfera de mudas, respectivamente (SIVAN & CHET, 1989). A germinação de clamidósporos de *F. solani* f. sp. *pisi* na espermosfera de ervilha ocorreu em torno de 5 a 7 mm da superfície das sementes e se deu principalmente no local onde ocorre a emergência da radícula (SHORT & LACY, 1974). Assim, ocorrendo a ligação da planta com o biocontrolador no início de seu desenvolvimento, as interações ecológicas entre antagonista-hospedeiro-patógeno e o restante da microflora residente ficam menos complexas, facilitando o biocontrole (SINGH et al., 1999).

Além da espermosfera, é necessário que ocorra, também, a colonização da rizosfera para obter-se a proteção das raízes (SIVAN & CHET, 1989). O isolado T-35 de *T. harzianum*, utilizado em tratamento de sementes, foi encontrado em toda a extensão das raízes do meloeiro, algodoeiro e tomateiro, sendo que o maior número de UFC, para as três culturas, ocorreu na extremidade das raízes (SIVAN & CHET, 1989). Os exsudatos presentes na rizosfera são excretados na extremidade das raízes, e assim, a colonização dessa região por agentes de biocontrole pode reduzir a infecção por patótipos de *Fusarium* que penetram no sistema vascular de seus hospedeiros, no xilema indiferenciado situado na extremidade da raiz (SIVAN & CHET, 1989).

4.4- CONCLUSÕES

Concluiu-se que:

- isolados selecionados de *Trichoderma harzianum* podem ser utilizados no tratamento de sementes, para a produção de mudas e redução na incidência e severidade da fusariose do tomateiro;
- isolados de *Trichoderma harzianum* estimulam o vigor de mudas e são uma opção para o controle da fusariose do pepineiro;
- o tratamento de sementes com isolados selecionados de *Trichoderma harzianum* reduzem a fusariose do tomateiro e pepineiro;
- o tratamento integrado de fungicida e isolados de *Trichoderma harzianum* pode ser utilizado no controle da fusariose do tomateiro e pepineiro;
- *Trichoderma harzianum* em tratamento de sementes ou de substrato se desenvolve na rizosfera do pepineiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, J.S.; BAKER, R. Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 229-234, 1988.

AHN, I.P.; CHUNG, H.S.; LEE, Y.H. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Plant Disease**, v.82, n. 2, p. 244-246, 1998.

BATISTA, D.C. et al. Influência de fungicidas e mix de *Trichoderma* spp. no controle da murcha de fusário do maracujazeiro em campo comercial. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, suplemento, p. 227, 2002.

BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las cucurbitaceas**. Observar, identificar, luchar. Madrid, Barcelona, México: Mundi-prensa, 1996. 301p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CARVALHO, A.O.; JACOB NETO, J.; CARMO, M.G.F. Alterações do pH da solução nutritiva pela fonte de nitrogênio e seus efeitos sobre a colonização de plantas de tomate por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, suplemento, p. 295, 2003.

CHANG, YA-CHUN et al. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, v. 70, p. 145-148, 1986.

COTXARRERA, L. et al. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, nº 4, p. 467-476, 2002.

CRUZ, J.L.G. et al. Efeitos de bioprotetor e fungicida na sanidade e emergência de sementes de nabo forrageiro, aveia preta e centeio. **Anais... XIX Jornada Acadêmica Integrada**. Santa Maria, 2004.

DATNOFF, L.E.; NEMEC, S., PERNEZNY, K. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. **Biological Control**, v. 5, p. 427-431, 1995.

DE CAL, A.; GARCIA-LEPE, R., MELGAREJO, P. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: histological studies of infected and induced tomato stems. **Phytopathology**, v. 90, p. 260-268, 2000.

EASTBURN, D.M.; BUTLER, E.E. Microhabitat characterization of *Trichoderma harzianum* in natural soil: evaluation of factors affecting population density. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 20, p. 541-545, 1988.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412p.

FREITAS, S.S.; PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v. 17, p. 105-112, 1991.

GELMINI, G.A. **Agrotóxicos – legislação básica**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. 398p.

GIMENES – FERNANDES, N. et al. **Guia de fungicidas agrícolas**. 2 ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1998. 220p.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol – Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, p. 377-392, 2000.

HOWELL, C.R. et al. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. **Journal of Cotton Science**, v. 1, n.1, p. 15-20, 1997.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

INBAR, J. et al. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 337-346, 1994.

KLEIFELD, O.; CHET.I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**, v. 144, p. 267-272, 1992.

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

LIFSHITZ, R.; WHINDHAM, M.T.; BAKER, R. Mechanisms of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 76, p. 720-725, 1986.

LUZ, W.C. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: BETTIOL,W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPDA, 1991. 388p.

MAO, W. et al. Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. **Crop Protection**, v. 17, n. 6, p. 535-542, 1998.

MATSUMURA, A.; WEILER, C.A.; ALMANÇA, M.A.K. Efeito de iprodione e oxiclreto de cobre na sobrevivência de *Trichoderma* sp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, suplemento, p. 83, 2004.

MELLONI, R., DUARTE, K.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de composto de lixo urbano e/ou de E.M.4 (effective microorganisms) no desenvolvimento de pepino (*Cucumis sativus*) e no controle de fusariose. **Summa Phytopathologica**, v. 21, n.1, p. 21-24, 1995.

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

MELO, I.S.; PICCININ, E. Toxic metabolites from culture filtrate of *Fusarium oxysporum* and its effects on cucumber cells and plantlets. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 2, p. 23-26, 1999.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (eds.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina : ABRATÉS, 1999.

NASH, S.M.; SNYDER, W.C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. **Phytopathology**, v. 52, p. 567-572, 1962.

NELSON, R.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 271-309, 2004.

NORONHA, M.A. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp para o controle de *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 156-162, 1996.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1983. 434p.

OSBAY, N.; NEWMAN, S.E.; BROWN, W.M. The effect of the *Trichoderma harzianum* strains on the growth of tomato seedlings. **Acta Hortícola**, v. 635, p. 131-134, 2004.

PATRICIO, F.R.A.; KIMATI, H.; BARROS, B.C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 2, p. 223-229, 2001.

REIS, A. et al. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 21, p. 16-20, 1995.

RESENDE, M. L. et al. Inoculação de sementes de milho utilizando *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência Agrotécnica**, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.

ROBERTS, P.; KUCHARAK, T. **Florida Plant Disease Management Guide: cucumber**. Cooperative Extension Service/Institute of Food and Agricultural Sciences/University of Florida, jan. 2005. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu>> Acesso em setembro 2005.

ROSE, S.; PARKER, M; PUNJA, Z.K. Efficacy of biological and chemical treatments for control of fusarium root and stem rot on greenhouse cucumber. **Plant Disease**, v. 87, n. 12, p. 1462-1470, 2003.

ROVIRA, A.D. et al. Quantitative assessment of the rhizoplane microflora by direct microscopy. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 6, p. 211-216, 1974.

SHORT, G.E.; LACY, M.L. Germination of *Fusarium solani* f. sp. *psii* chlamydospores in the spermosphere of pea. **Phytopathology**, v., 64, p. 558-562, 1974.

SINGH, P.P. et al. Biological control of fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. **Phytopathology**, v. 89, n.1, p. 92-99, 1999.

SIVAN, A.; CHET. I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 198-203, 1989.

SIVAN, A.; ELAD, Y.; CHET. I. Biological control effects a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. **Phytopathology**, v. 74, p. 498-501, 1984.

SIVAN, A.; UCKO, O.; CHET, I. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. **Plant Disease**, v. 71, p. 587-592, 1987.

STEFANELO, D.R. et al. Dosagens de *Trichoderma virens* no controle de *Fusarium solani* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo cv. Calábria. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, suplemento, p. 103, 2004.

SUDO-MARTELLETO, R. et al. Efeito de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. sobre a emergência e desenvolvimento de mudas de tomate. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, suplemento, p. 235, 2004.

TAUK, S.M. Biodegração de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociência**, v. 20, p. 299-301, 1990.

TELLO, J.C.; LACASA, A. Evolución racial de poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas**, v. 14, p. 335-341, 1988.

TOKESHI, H. Doenças do tomateiro. In: KIMATI *et al.* (eds.) **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 871p.

TOYOTA, K.; RITZ, K.; YOUNG, I.M. Microbiological factors affecting the colonisation of soil aggregates by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, n. 10/11, p. 1513-1521, 1996.

VAKALOUNAKIS, D.J. *et al.* Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAPD. **Plant Disease**, v. 88, n.6, p. 645-649, 2004.

VIDA, J.B. *et al.* Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 355-372, 2004.

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

YEDIDIA, I. *Et al.* Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and soil**, v. 235, p. 235-242, 2001.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, vo. 65, n. 3, p. 1061-1070, 1999.

ZAMBOLIM, L.; DO VALE, F.X.R.; COSTA, H. **Controle integrado das doenças de hortaliças**. Viçosa: UFV, 1997. 122p.

ZAMBOLIM, L. *et al.* Doenças de hortaliças em cultivo protegido. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas – Hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. p. 373-407.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit disease**. St. Paul: APS Press, 1996. 87p.

CAPÍTULO V

DINÂMICA POPULACIONAL DOS GÊNEROS *Trichoderma* E *Fusarium* E DE PARTE DA MICROBIOTA DO SOLO, COM A ADIÇÃO DE *Trichoderma harzianum*, NO CULTIVO DO TOMATEIRO E PEPINEIRO.

RESUMO

Existem poucos relatos sobre a sobrevivência e ação de *Trichoderma* na microbiota nativa, quando adicionado ao solo como agente de biocontrole. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar a dinâmica populacional dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* e de parte da microbiota do solo com a adição de *Trichoderma harzianum*, no cultivo do tomateiro e pepineiro. Para isso, foram realizados experimentos no outono/inverno e primavera/verão, com o cultivo do pepineiro e tomateiro, em horta e estufa. Foi adicionado ao solo 1 g de pó por cova, do formulado dos isolados HTSR5, ETSR20 e ETSR8 e mix de *T. harzianum*, com ou sem a semeadura de sementes de tomate cereja e pepino para conserva. Foram efetuadas quatro coletas (0, 45, 90 e 135 dias) sendo que a primeira ocorreu antes do agente de biocontrole ser adicionado ao solo e/ou ter ocorrido a semeadura. Os solos não rizosférico e rizosférico do tomateiro e pepineiro foram coletados e usados para a realização de diluições. As diluições foram efetuadas para quatro meios de cultura: BDA para fungos totais e os seletivos para bactéria, *Trichoderma* e *Fusarium*. Após, ocorreu a contagem do número de UFC para os quatro meios de cultura e obtiveram-se o Log UFC/g de solo para os microrganismos alvos. Para os experimentos realizados no outono/inverno e na primavera/verão, tanto no cultivo do tomateiro quanto do pepineiro, em horta e estufa, encontraram-se alterações na densidade populacional de *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., bactérias e fungos totais. Não ocorreram diferenças entre os tratamentos de solo rizosférico e os de solo não rizosférico, pois observou-se o desenvolvimento parcial de plantas daninhas durante os 135 dias, do desenvolvimento do experimento. Para os tratamentos testemunha apenas com planta, sem a adição do agente de biocontrole e sem planta e sem o agente, as médias de Log UFC/g de solo para *Trichoderma* foram significativamente menores. Concluiu-se que: a adição de isolados de *Trichoderma harzianum* no solo de horta e estufa contribui para o desenvolvimento e estabilidade populacional de *Trichoderma* spp. em solo rizosférico, durante todo o ciclo de cultivo do tomateiro e pepineiro; e a adição dos isolados de *Trichoderma harzianum* no solo, tanto de horta quanto de estufa, pode interferir na população de *Fusarium* spp., fungos totais e bactérias.

Palavras-chave: rizosfera, bactérias, fungos, ambiente protegido, UFC.

5.1- INTRODUÇÃO

A ação de *Trichoderma* spp. como antagonista a vários fungos de solo e sua influência no desenvolvimento vegetal têm sido amplamente pesquisada (MELO, 1996; HARMAN, 2000; HOWELL, 2003; HARMAN et al., 2004), mas existem poucos relatos abordando a ação desse fungo quando adicionado no ecossistema, principalmente com relação à sua dinâmica populacional e à interferência na população da microbiota nativa.

Certamente existe controle biológico em ecossistemas naturais que evitam a ocorrência de epidemias altamente destrutivas (MELO, 1996). A problemática é que devido ao cultivo convencional e mau uso do solo, esse chamado “equilíbrio” e controle natural da população de fitopatógenos não se mantêm e, assim, necessitam-se, muitas vezes, adicionar agentes de biocontrole devido à alta incidência de doenças.

A adição de agentes de biocontrole no ambiente solo causa questionamentos principalmente quanto à sua sobrevivência e ação na microbiota nativa. De acordo com Capalbo & Nardo (2000) três fatores devem ser observados quando agentes de biocontrole são adicionados a campo, com relação ao ambiente: persistência, crescimento populacional e dispersão. Pesquisas nessa área podem sanar problemas como falhas no biocontrole de fitopatógenos, que segundo MELO (1996), freqüentemente ocorrem por falta de conhecimento da ecologia e da fisiologia dos microrganismos utilizados para esse fim, em ecossistemas naturais.

Pesquisas sobre a sobrevivência de *Trichoderma* introduzido no solo são necessárias, pois os atributos para um antagonista “eficiente”, segundo Cook & Baker (1983) são a habilidade de sobreviver, desenvolver e proliferar no solo e na rizosfera. Assim os experimentos relacionados com a sobrevivência do agente de biocontrole precisam estar voltados à realidade do cultivo de olerícolas ou de culturas comerciais, pois geralmente ocorrem em vasos (LEWIS & PAPAVIDAS, 1984; WINDELS et al., 1985) ou com variáveis extremamente controladas, incluindo solo estéril (SIVAN et al., 1984; TSAHOURIDOU & THANASSOULOPOULOS, 2002) e microcosmo (NASEBY et al., 2000).

Quanto à ação de agentes de biocontrole sobre a microbiota nativa, Vázquez et al. (2000) encontraram flutuação populacional das comunidades microbianas na

rizosfera de plantas de milho devido a adição de agentes microbianos (*Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Trichoderma*), assim como Siddiqui & Shaukat (2003), que observaram flutuação populacional de fungos nativos devido aos efeitos da adição de *Pseudomonas aeruginosa* no cultivo do tomateiro. Já Harman (2000), observou que o isolado T-22 de *T. harzianum* colonizou a raiz de diferentes culturas e deslocou a microflora, mudando a composição da microbiota. O efeito de agentes de biocontrole sobre outros organismos que não o patógeno alvo é pouco documentado e é necessário o conhecimento das conseqüências ecológicas dessa interação para ter-se segurança na sua utilização (SMITH et al., 1992).

Fusarium é um gênero fúngico formado por várias espécies e *formae speciales*, com poder de adaptação e de se manter por longos períodos no ambiente solo, o que é referendado pela sua ampla distribuição geográfica. A atenção que vem sendo dada a esse gênero é reflexo de sua importância econômica, pois é agente causal de doenças, como as murchas, em uma gama de culturas.

Fusarium spp. e *Trichoderma* spp. foram encontrados simultaneamente em diferentes situações, em ocorrência natural, como em solo rizosférico do tomateiro (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2003), decompondo folheto em área do cerrado (TAUK, 1990), e em latossolo amarelo e terra preta arqueológica na Estação Científica Ferreira Penna no Pará (BATISTA et al., 2004). Porém, a dinâmica populacional de *Fusarium* é relatada somente para culturas comerciais e para *Trichoderma* tem-se poucos registros, principalmente a campo. Pôde-se constatar que a dinâmica populacional de *Fusarium* spp. varia de acordo com uma gama de fatores, dentre os quais: sucessões ou rotações de culturas, pois ocorreu aumento populacional de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* pela sucessão soja – aveia – soja (FREITAS, 2003); diferentes estágios de desenvolvimento das plantas, constatado para *F. solani* f. sp. *glycines* durante o ciclo de cultivo de soja à campo (LUO et al., 2001); e profundidade do solo, com a maior concentração de propágulos de *Fusarium* spp. encontrada em até 15 cm de profundidade, em solo infestado naturalmente com o fitopatógeno (RUPE et al., 1999).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a dinâmica populacional dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* e de parte da microbiota do solo com a adição de *Trichoderma harzianum*, no cultivo do tomateiro e pepineiro.

5.2- MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 - Local das coletas

As coletas de solo foram realizadas em estufa e horta, localizadas na área experimental do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A estufa utilizada no experimento possuía uma área de 200 m² (25 m x 8 m) e um pé-direito de 2,5 m. A estrutura era do tipo metálica e teto em arco, coberta por filme de PVC transparente provido de um sistema antigotejo.

A horta era utilizada para o plantio de olerícolas, principalmente tomateiro e pepineiro apresentando uma área de 200 m² (25 m x 8 m).

Os dois locais foram escolhidos por ter-se retirado, desses ambientes, os três isolados de *T. harzianum* que foram introduzidos no solo como agentes de biocontrole e por ter-se analisado a distribuição espacial de *Trichoderma* e *Fusarium* e visto que os dois gêneros fúngicos ocorreram em praticamente toda a extensão das duas áreas (Capítulo II), indicando que o solo era propício ao desenvolvimento desses fungos.

5.2.2 – Formulação dos isolados de *Trichoderma harzianum*

Os isolados HTSR5, ETSR20 e ETSR8 de *T. harzianum* foram retirados de solo rizosférico do tomateiro, de horta e estufa (Capítulo II), e selecionados em laboratório, no qual reduziram a população de *F. solani* e *F. oxysporum* (Capítulo III).

Na formulação dos isolados de *T. harzianum*, discos de BDA contendo micélio e esporos foram colocados sobre 50 g de arroz, umedecidos com 75 mL de água destilada, em frascos de erlenmeyer previamente autoclavados por 40 min. Os frascos permaneceram em câmara climatizada a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 10 dias, para a colonização do arroz. Após, ocorreu a secagem em estufa (37 °C) e o inóculo foi triturado em liquidificador até ser transformado em pó e passado por uma peneira de 40 meshes. Encontraram-se 10⁸ UFC para cada g de pó de *T. harzianum* em meio seletivo para *Trichoderma*.

5.2.3 – Implantação dos experimentos

Foram realizados quatro experimentos divididos em duas épocas, sendo a primeira o outono/inverno de 2004 e a segunda, a primavera/verão de 2004 a início de 2005. Os dois experimentos, nas duas épocas, foram repetidos de forma semelhante, sendo que os camalhões não foram montados nos mesmos locais para não ocorrer a interferência de possíveis resíduos dos agentes de biocontrole adicionados ao solo, no experimento anterior.

O tomateiro e o pepineiro utilizados foram da variedade cereja e de conserva, respectivamente, sendo que as sementes (Bionatur®) não receberam qualquer tipo de tratamento. Não foram adicionados quaisquer tipos de nutrientes ou matéria orgânica (além da encontrada no próprio local) no cultivo das duas olerícolas, para ocorrer menor interferência no ambiente.

Foram utilizados quatro camalhões na horta e quatro na estufa, para o tomateiro e para o pepineiro, totalizando 16 camalhões. Os camalhões mediam 9 m de comprimento por 45 cm de largura com intervalo de 55 cm entre os mesmos. Cada camalhão foi demarcado com onze estacas maiores que delimitaram os dez tratamentos e por 30 estacas menores que indicaram as três repetições em cada tratamento.

As covas foram abertas na profundidade de 1,5 cm para o tomateiro e 2,0 cm para o pepineiro e indicadas por uma estaca menor. Foi adicionado 1 g de pó dos isolados de *T. harzianum* (HTSR5, ETSR20 e ETSR8) e o mix (mistura dos três isolados) nas covas, de acordo com os referidos tratamentos.

Os dez tratamentos consistiram de: T1- ETSR8 + planta; T2 - ETSR20 + planta; T3 - HTSR5 + planta; T4 - Mix + planta; T5 - planta; T6 - ETSR8; T7- ETSR20; T8 – HTSR5; T9 - Mix; T10 - sem tratamento e planta.

Após a adição do agente de biocontrole foi realizada a semeadura de três sementes de pepino ou de tomate por cova. Vinte dias depois da semeadura foi realizado o desbaste, sendo deixada apenas uma planta por cova/repetição.

A irrigação foi realizada durante 40 min diariamente, na estufa, por mangueiras com sistema de gotejamento e na horta foi de acordo com a precipitação local, salvo 10 dias iniciais quando os camalhões foram regados diariamente até ocorrer a total emergência das plântulas.

O controle de plantas daninhas foi manual, sendo que no local das covas sem plantas, onde era realizada a coleta de solo não rizosférico, fez-se o corte dos vegetais com tesoura para não mexer com o solo. Não foi possível controlar o desenvolvimento de plantas daninhas nas covas que deveriam ter apenas solo não-rizosférico, durante todo o período de desenvolvimento do experimento (135 dias). Para o controle de insetos foram realizadas duas aplicações de inseticida piretróide antes das plantas apresentarem 30 dias de desenvolvimento.

Foram coletadas amostras de solo da estufa e da horta e encaminhadas ao Laboratório Central de Análises de Solos (UFSC) para análise química (Anexo I).

5.2.4 – Coletas

As coletas foram realizadas em quatro épocas distintas aos 0, 45, 90 e 135 dias após a semeadura do pepineiro e tomateiro. A primeira coleta de solo ocorreu retirando-se amostras das três covas de cada repetição, por camalhão, antes de realizar-se o tratamento com os agentes de biocontrole e a semeadura (tempo zero). As demais coletas ocorreram em intervalos de 45 dias (45, 90 e 135 dias), quando foram retiradas as plantas e/ou solo de cada uma das três parcelas por repetição, nos camalhões. O tempo máximo de permanência das duas culturas foi de 135 dias. Esse período foi escolhido porque para o pepineiro, o ciclo de cultivo tem duração de aproximadamente 120 dias sendo menor do que o do tomateiro, geralmente de 180 dias (FILGUEIRA, 2003).

Dos dez tratamentos utilizados nos experimentos, apenas cinco apresentavam plantas, sendo assim, realizaram-se cinco coletas de solo rizosférico e cinco de solo não rizosférico por camalhão, para o pepineiro e para o tomateiro, separadamente.

Para as coletas de solo rizosférico em horta e estufa, os pepineiros e tomateiros foram retirados do solo, com o auxílio de uma pá de corte tendo-se cuidado no retirar a raiz com o solo. O solo que estava em torno da raiz foi retirado manualmente deixando-se apenas o que estava aderido a mesma. As raízes das plantas juntamente com o solo aderido foram colocadas em sacos plásticos e, após, a parte aérea foi separada com a utilização de um estilete.

As coletas do solo não rizosférico em horta e estufa, ocorreram com o auxílio

de um frasco de metal que foi imerso em solução com hipoclorito 75 %, no intervalo das coletas. As coletas foram realizadas na profundidade de até 7 cm, pois o pó contendo os isolados de *T. harzianum* foi adicionado nas covas nas profundidades de 1,5 e 2,0 cm.

Os sacos plásticos contendo as amostras de solo não rizosférico e de raízes com solo rizosférico foram conduzidas ao Laboratório de Fitopatologia da UFSM.

5.2.5 – Diluições das amostras de solo rizosférico e não rizosférico

O solo rizosférico foi obtido das raízes dos tomateiros e pepineiros agitando-se as raízes dentro dos sacos plásticos onde estavam acondicionadas, até a retirada total do solo.

Diluições das amostras de solo rizosférico e não rizosférico foram realizadas para solos coletados em estufa e horta, tanto no cultivo do pepineiro quanto do tomateiro.

Para as suspensões foram pesados 2 g de solo rizosférico e não rizosférico de cada coleta e, após, foram adicionados em frascos de vidro contendo 98 mL de água destilada e esterilizada. Os frascos foram colocados em agitador mecânico durante 30 min. A partir dessa solução original foi realizada diluição de 20 vezes, ou seja, 5 mL da solução foram acrescentados em frasco com 95 mL de água destilada e esterilizada. Da diluição, uma alíquota de 1 mL, por placa de Petri, foi aplicada sobre o meio de cultura e espalhada com uma alça de Drigalsky. Para todas as amostras de solo diluídas foram utilizados quatro meios de cultura: BDA para fungos totais (culturáveis em meio), NS para *Fusarium* spp., seletivo para bactérias e seletivo para *Trichoderma* spp. Antes dos meios de cultura serem plaqueados acrescentou-se cloranfenicol 10% (5 mL/L), com exceção do meio seletivo para bactérias.

Meios de cultura utilizados:

- BDA – 200 g de batata, 20 g dextrose, 18 g de agar e 1 L de água.
- NS (Nash & Snyder) - 20 g de agar, 15 g de peptona, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de KH_2PO_4 , 1 g de quintozene e 1 L de água.
- Seletivo para *Trichoderma* – 18 g de agar, 6 g de dextrose, 200 g de batata, 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,9 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de quintozene, 0,15 g de Rosa de

Bengala, 0,1 mg de Benomil, 0,1 mg de Iprodione e 1 L de água. Os fungicidas Benomil e Iprodione foram diluídos em acetona e adicionados ao meio de cultura (0,4 mL/L de meio) para prevenir o crescimento de outras espécies de fungos.

- Seletivo para bactérias – 18 g de agar e 8 g do concentrado Nutrient Broth dehydrated (Difco) para 1 L de água.

Foram utilizadas quatro placas de Petri para cada meio de cultura, totalizando 16 placas por amostra de solo. As placas foram incubadas em câmara climatizada a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h.

5.2.6 - Avaliação

A avaliação consistiu da contagem do número de UFC de microrganismos por placa de Petri, sendo que a avaliação para bactérias ocorreu após 48 h, para fungos totais após três dias, para *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. após sete dias de incubação.

5.2.7- Registro dos dados meteorológicos

A temperatura e umidade relativa do ar foram medidas diariamente por termohigrógrafo instalado dentro da estufa e para horta os dados foram retirados na Estação Meteorológica da UFSM, assim como a precipitação local.

As médias de temperatura (T_m) e umidade relativa do ar (UR_m) foram calculadas de acordo com as fórmulas $T_m = (T_9 + 2.T_{21} + T_{min} + T_{máx})/5$ e $UR_m = (UR_9 + UR_{15} + 2UR_{21})/4$.

Para o primeiro experimento foram instalados sete geotermômetros na horta e sete na estufa, nas profundidades de 2,5, 5 e 10 cm, sendo que a temperatura do solo foi medida diariamente às 9 h para poder-se comparar com a temperatura ambiente.

5.2.8 - Análise estatística

O delineamento experimental foi de blocos casualizados em esquema fatorial 10 x 4 (10 tratamentos e 4 épocas de coleta – 0, 45, 90 e 135 dias). Os dados referentes ao número de UFC foram transformados para $\text{LOG}_{10} (\text{UFC} + 1)$ e os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Para comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade e foi realizada análise de regressão a partir dos métodos dos polinômios ortogonais para comparação das diferentes épocas de coleta. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SOC (EMBRAPA - 1986).

5.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 – Experimentos realizados no outono/inverno

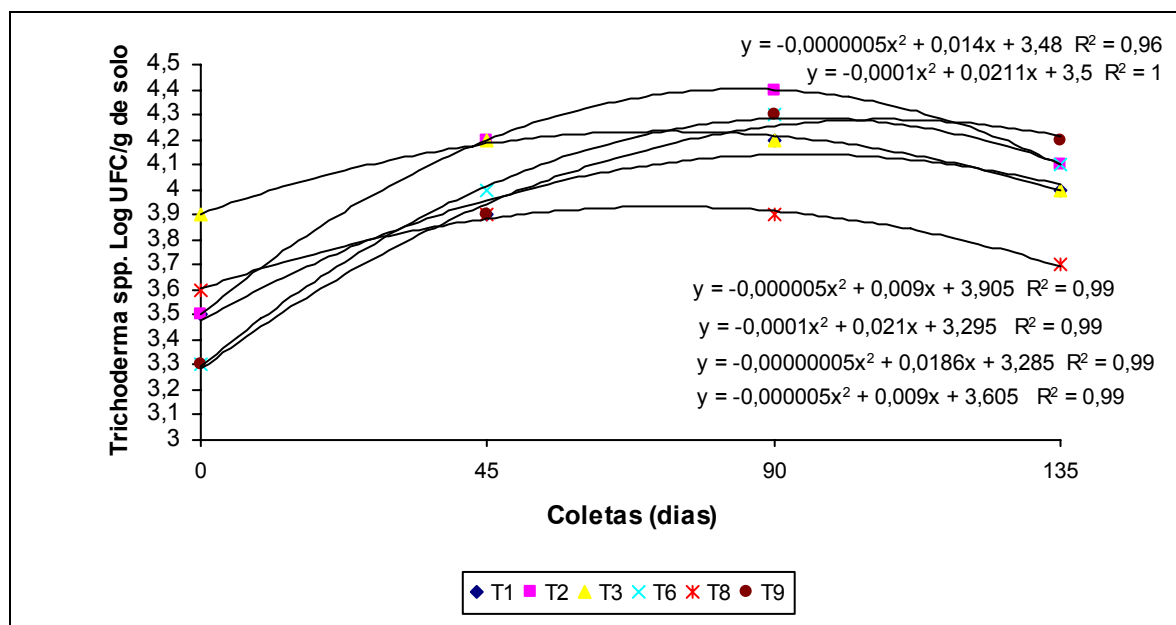
Para os experimentos realizados no outono/inverno, tanto no cultivo do tomateiro quanto do pepineiro, em horta e estufa, encontraram-se alterações na densidade populacional de *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., bactérias e fungos totais.

No cultivo do pepineiro em horta, ocorreu interação dos fatores tratamentos x épocas de coleta, apenas quanto à avaliação da população de *Trichoderma* spp. (Figura 10 – 1A), quanto à população de *Fusarium* spp. não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos e entre épocas de coleta, e para fungos totais (Figura 10 – 3A) e bactérias (Figura 10 – 4A) as diferenças foram apenas para as épocas de coleta.

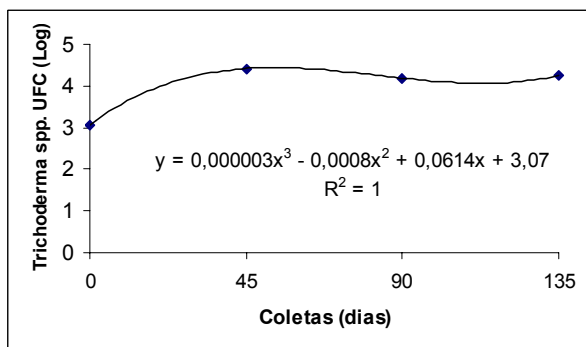
Em estufa, não ocorreu interação dos fatores para nenhum dos microrganismos avaliados, mas ocorreram diferenças significativas, em épocas de coletas, para *Trichoderma* spp. (Figura 10 – 1B), *Fusarium* spp. (Figura 10 -2B), fungos totais (Figura 10 – 3B) e bactérias (Figura 10 – 4B). Para *Trichoderma* spp. e fungos totais também ocorreram diferenças quanto aos tratamentos, porém ocorreu pouca variação entre os tratamentos com e sem planta (Tabela 18). A dificuldade em

manter as covas sem o desenvolvimento de plantas daninhas, para a coleta de solo não rizosférico, pode ser a explicação para o ocorrido.

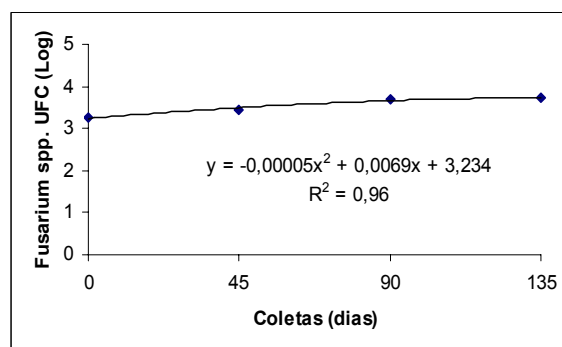
1 - A*



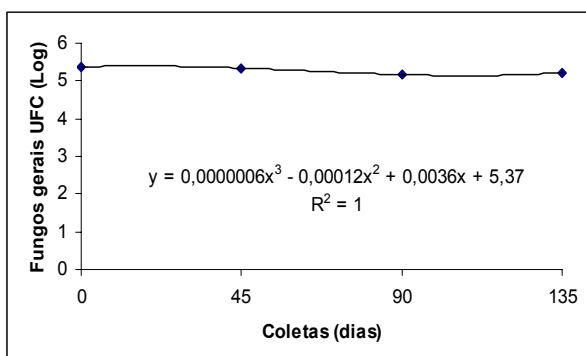
1 - B



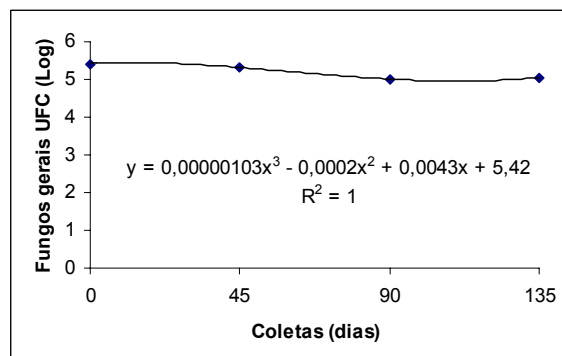
2 - B



3 - A



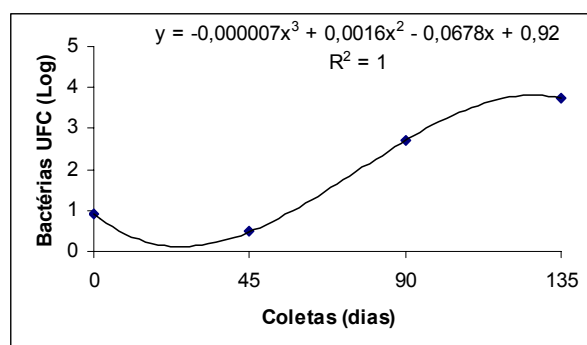
3 - B



(Continua...)

(Continuação...)

4 - A



4 - B

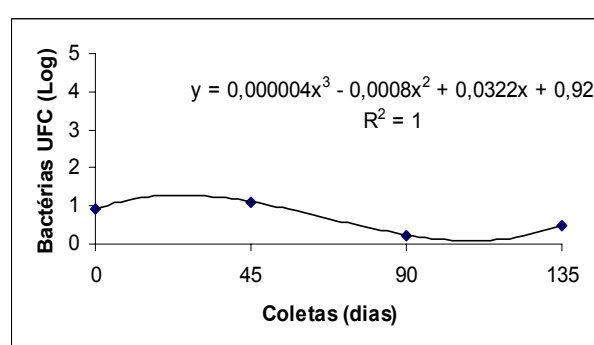


Figura 10 – População de *Trichoderma* spp. (1), *Fusarium* spp. (2), fungos totais (3) e bactérias (4), com a adição de isolados de *Trichoderma harzianum* no solo, no cultivo do pepineiro, em horta (A) e estufa (B), no outono/inverno. Santa Maria – RS. Tratamentos: T1- ETSR8 + planta; T2 - ETSR20 + planta; T3 - HTSR5 + planta; T4 - Mix + planta; T5 - planta; T6 - ETSR8; T7- ETSR20; T8 – HTSR5; T9 - Mix; T10 - sem tratamento e planta.

1A* - Nenhuma equação se adequou aos resultados dos Tratamentos 4, 5, 7 e 10.

Tabela 18 – *Trichoderma* spp. e fungos totais (Log_{10} UFC/g de solo) em solo rizosférico e não rizosférico, sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma harzianum* e mix, no cultivo do pepineiro, em estufa, no outono/inverno. Santa Maria – RS.

TRATAMENTO	<i>Trichoderma</i> spp. Log_{10} UFC/g de solo	Fungos totais Log_{10} UFC/g de solo
MIX	4.23* a	5.01 ab
ETSR20	4.20 a	4.96 b
ETSR20 + planta	4.10 ab	5.10 ab
HTSR5 + planta	4.08 ab	5.39 a
MIX + planta	4.05 ab	5.14 ab
ETSR8 + planta	4.00 ab	5.37 ab
HTSR5	3.89 ab	5.39 a
ETSR8	3.84 ab	5.26 ab
Testemunha - sem planta	3.81 ab	5.23 ab
Testemunha - planta	3.59 b	5.31 ab

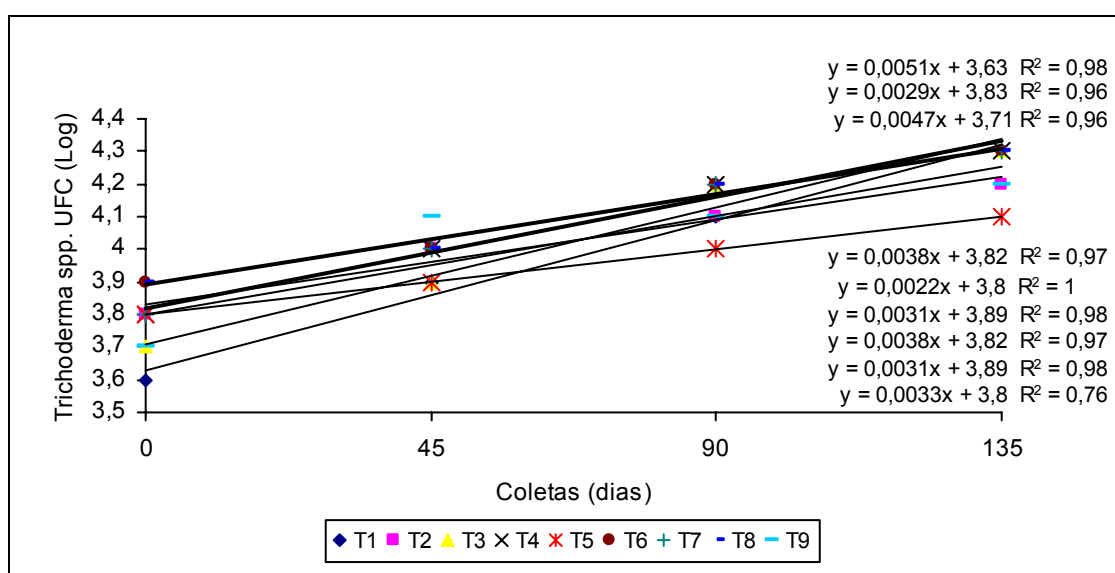
* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

No cultivo do tomateiro em horta, ocorreu interação dos fatores tratamentos x épocas de coleta, apenas quanto à avaliação da população de *Trichoderma* spp. (Figura 11 – 1A). Quanto à população de *Fusarium* spp. (Figura 11 – 2A) e fungos

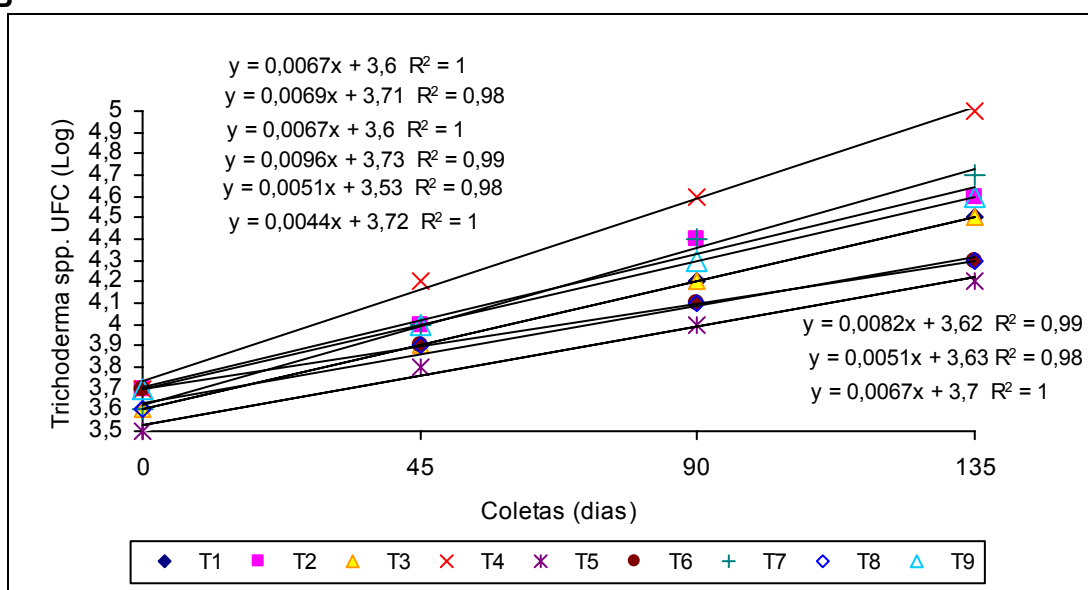
totais (Figura 11 – 3A) as diferenças foram apenas para as épocas de coleta, e para bactérias não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos e entre épocas de coleta.

Em estufa, ocorreu interação dos fatores tratamentos x épocas de coleta, apenas quanto a avaliação da população de *Trichoderma* spp. (Figura 11 – 1B). Quanto à população de *Fusarium* spp. (Figura 11 – 2B), fungos totais (Figura 11 – 3B) e bactérias (Figura 11 – 4B) as diferenças foram apenas para as épocas de coleta.

1 – A*



1 - B*



(Continua...)

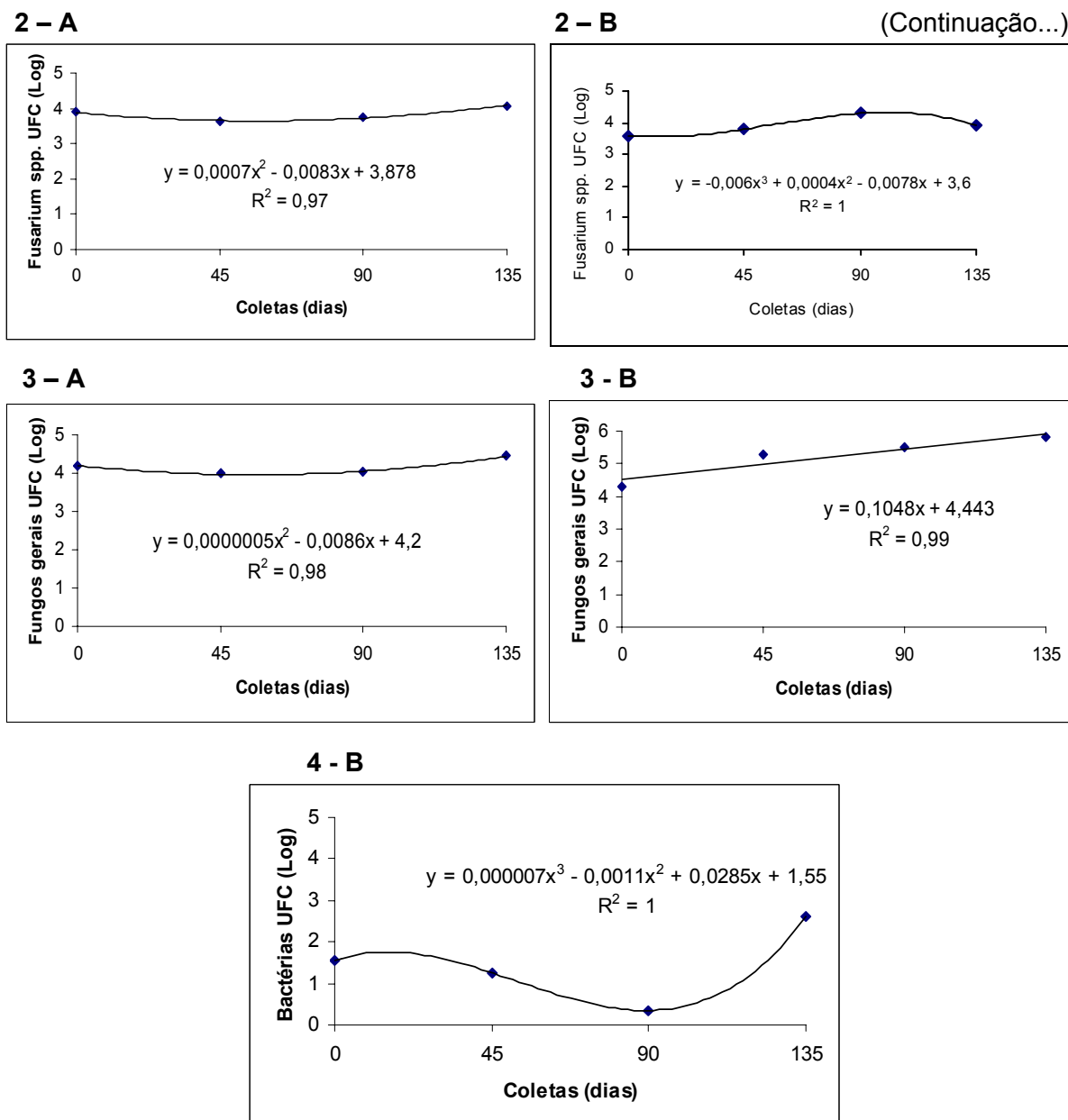


Figura 11 – População de *Trichoderma* spp. (1), *Fusarium* spp. (2), fungos totais (3) e bactérias (4), com a adição de agentes de biocontrole no solo, no cultivo do tomateiro, em horta (A) e estufa (B), no outono/inverno. Santa Maria – RS.

Tratamentos: T1- ETSR8 + planta; T2 - ETSR20 + planta; T3 - HTSR5 + planta; T4 - Mix + planta; T5 - planta; T6 - ETSR8; T7- ETSR20; T8 – HTSR5; T9 - Mix; T10 - sem tratamento e planta.

1A*, 1B* - Nenhuma equação se adequou aos resultados do Tratamento 10.

5.3.1.1- Sobrevivência e desenvolvimento populacional de *Trichoderma* spp. em experimentos no outono/inverno

A introdução dos isolados de *T. harzianum* e de plantas, pepineiro e tomateiro, fez com que ocorresse um aumento na densidade populacional de

Trichoderma spp. que se manteve até o final dos experimentos, o que pode ser observado para as coletas após o tempo zero, quando foram inoculados os isolados de *T. harzianum*, para o pepineiro (Figura 10) e o tomateiro (Figura 11), em horta e estufa. Os tratamentos com e sem planta apresentaram o mesmo comportamento, embora tenha ocorrido diferença significativa entre os mesmos.

A população de *Trichoderma* spp. no experimento com o pepineiro, em horta, mostrou um comportamento diferente do encontrado para estufa. Na horta, em geral, a população apresentou uma tendência a declinar após a última coleta, aos 135 dias (Figura 10 – 1A). Para o pepineiro em estufa, a população de *Trichoderma* spp. se manteve quase constante, numa tendência em se estabilizar (Figura 10 – 1B). Já para o experimento com o tomateiro, a população de *Trichoderma* spp. tanto em horta quanto em estufa, obteve um pequeno aumento a partir da segunda coleta, apresentando uma tendência em se estabilizar (Figura 11 – 1A e 1B). Pode-se observar que a população desse agente de biocontrole, uma vez estabelecida na rizosfera do tomateiro e pepineiro pode acompanhá-los por todo o ciclo das culturas, mesmo nas condições climáticas do outono/inverno.

O tratamento sem planta e sem a adição de isolados de *T. harzianum*, foi o único que apresentou comportamento diferenciado, pois nenhuma das equações se adequou aos resultados dos experimentos para pepineiro, em horta (Figura 10 – 1A), e tomateiro, em horta e estufa (Figura 11 – 1A e 1B), além de apresentar menor média de UFC/g de solo quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 18).

A população de *Trichoderma* spp. (Log UFC/g de solo) apresentou variações, nos experimentos para o pepineiro, de 3,3 a 4,3 Log e de 3,0 a 4,5 Log, para horta e estufa (Figura 10), respectivamente; e para o tomateiro de 3,6 a 4,3 Log e de 3,5 a 4,9 Log, para horta e estufa (Figura 11), respectivamente. Embora as diferenças tenham sido pequenas quanto ao nível populacional de *Trichoderma* (Log UFC/g de solo) em solo de horta e estufa, o maior desenvolvimento ocorreu em ambiente protegido. A temperatura e umidade podem ter influenciado para que ocorressem as diferenças no desenvolvimento populacional do agente de biocontrole, pois em ambiente protegido as temperaturas ambiental (Figura 12) e do solo (Figura 13), foram mais altas, quando comparadas com o ambiente externo (Figuras 14 e 15). Na época da condução do experimento ocorreram 412mm de chuva.

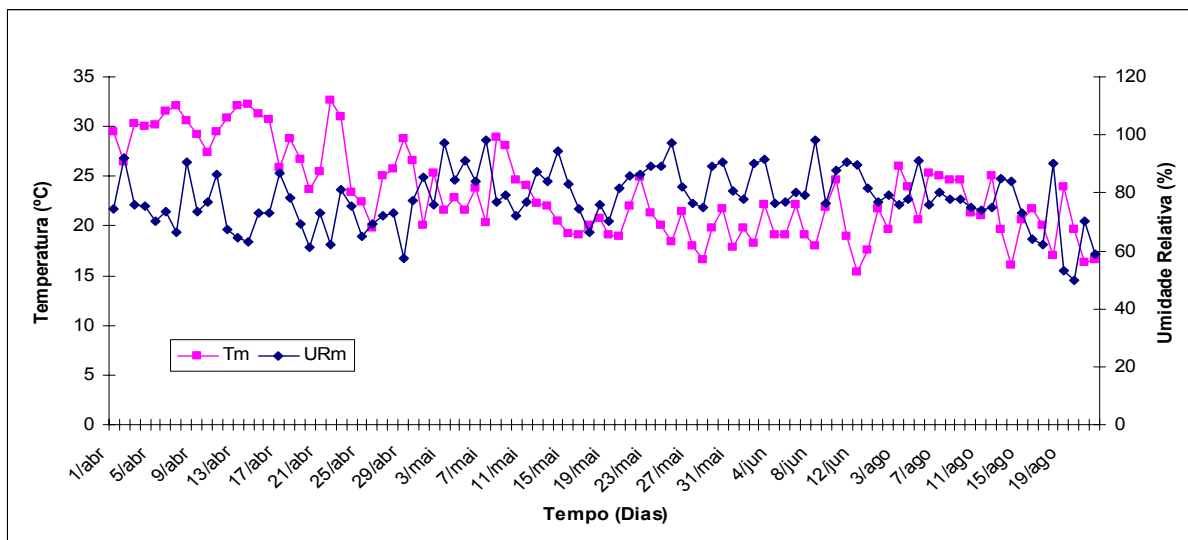


Figura 12 – Média da temperatura e umidade relativa referente aos experimentos do outono/inverno, em estufa. Santa Maria – RS.

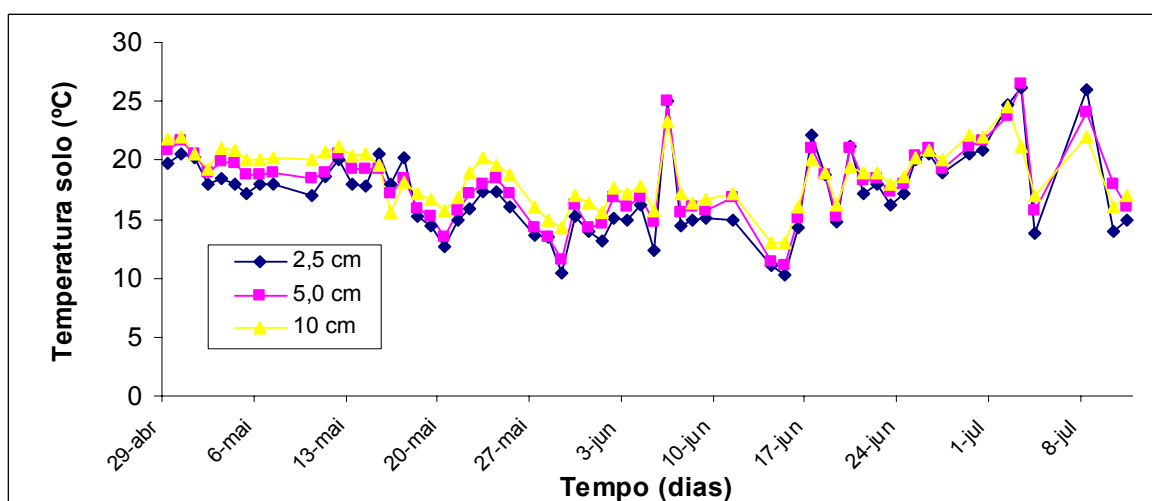


Figura 13 – Temperatura do solo medida por geotermômetros a 2,5, 5 e 10 cm de profundidade às 9 h, em estufa. Santa Maria – RS.

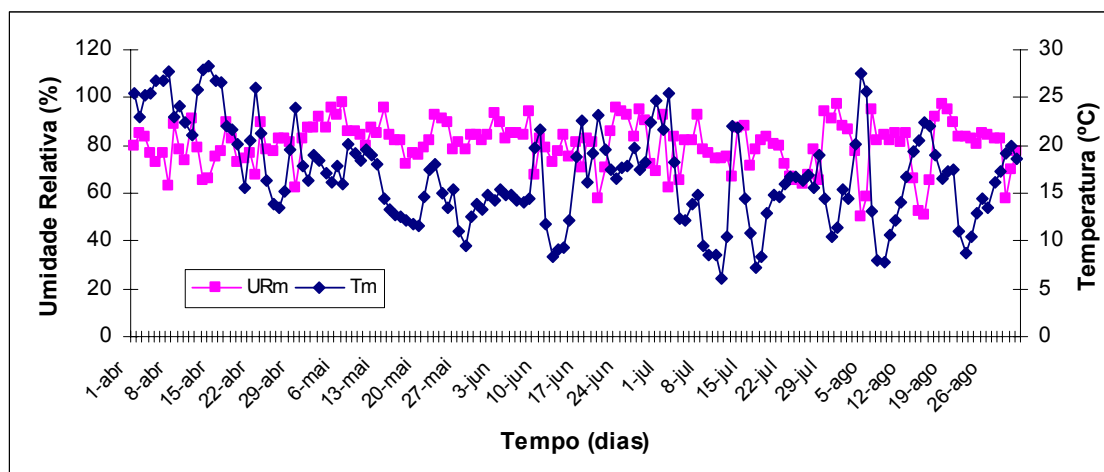


Figura 14 – Média da temperatura e umidade relativa referente aos experimentos do outono/inverno, em horta. Santa Maria – RS.

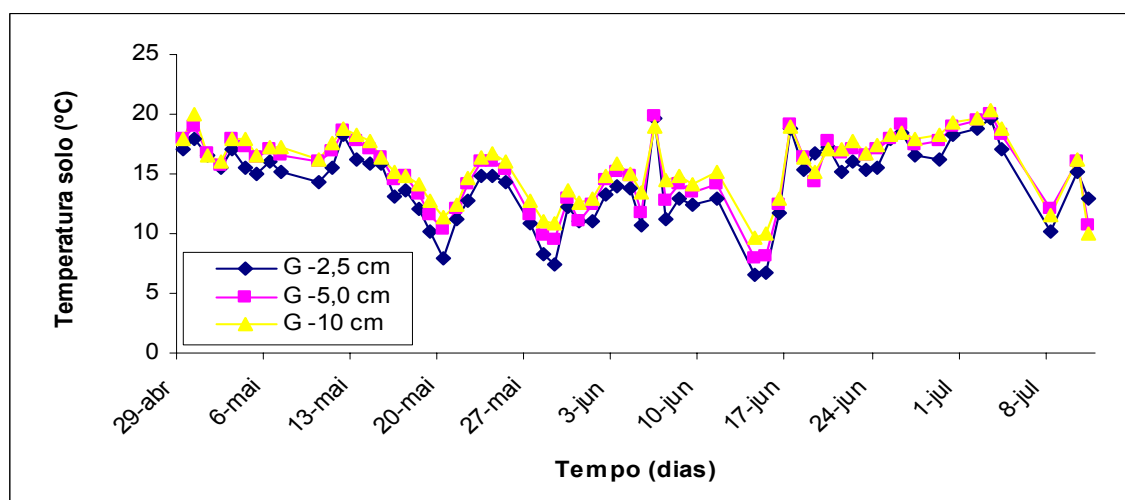


Figura 15 – Temperatura do solo medida por geotermômetros a 2,5, 5 e 10 cm de profundidade às 9 h, em horta. Santa Maria – RS.

5.3.1.2- A adição de *Trichoderma* no solo e a interferência na microbiota nativa em experimentos no outono/inverno

A adição dos agentes de biocontrole pode ter modificado a composição da microbiota nativa, mas não foi observado qualquer tipo de oscilação brusca no desenvolvimento populacional de *Fusarium* spp., fungos totais ou bactérias. Além disso, não ocorreram diferenças significativas para os tratamentos com os isolados de *T. harzianum*, com relação as populações de *Fusarium* spp., fungos totais (com uma exceção) ou bactérias, evidenciando que a adição de *Trichoderma* e de plantas pode não ter apresentado maiores influências na dinâmica populacional desta parte

da microbiota do solo.

Praticamente não ocorreu interferência da adição dos agentes de biocontrole na dinâmica populacional de *Fusarium* spp. O nível populacional de *Fusarium* spp. no experimento com pepineiro, em estufa, apresentou acréscimo, com tendência a se estabilizar após os 135 dias (Figura 10 – 2B). Para o tomateiro, em horta, apresentou decréscimo até a segunda coleta e depois acréscimo até a última coleta, e na estufa, se manteve quase constante (Figura 11 – 2A e 2B).

Para os fungos totais pôde-se constatar uma possível interferência de *Trichoderma* na fase inicial do experimento, principalmente até os 45 dias. Para o experimento com pepineiro, os fungos totais, apresentaram decréscimo populacional até os 90 dias, tanto em horta quanto em estufa, e após, tiveram acréscimo (Figura 10 – 3A e 3B). Já no experimento com tomateiro, em horta, ocorreu decréscimo até aos 45 dias que se manteve aos 90, e após, obteve acréscimo populacional; e na estufa a população permaneceu quase estável, com pequeno acréscimo (Figura 11 – 3A e 3B). Vásquez et al. (2000) também observaram acréscimo na população de fungos totais na rizosfera de plantas de milho, após 60 dias da inoculação de *T. harzianum* em substrato.

A densidade populacional das bactérias pode ter sido mais influenciada pelo ambiente do que pela adição de *Trichoderma* ao solo. Para o experimento do pepineiro, em horta, a população manteve-se constante até os 45 dias (em nível baixo) e só depois teve acréscimo (Figura 10 – 4A). Nessa fase do experimento mesmo com alta umidade do ar a temperatura ambiente estava baixa, em torno de 20 °C (Figura 14) e do solo, de 15 a 18 °C (Figura 15), o que pode ter desfavorecido o desenvolvimento bacteriano. Na estufa, a população bacteriana apresentou certo acréscimo inicial e depois decréscimo, vindo a ter melhor desenvolvimento populacional aos 135 dias (Figura 10 – 4B). Para o tomateiro, na estufa, a densidade populacional bacteriana teve decréscimo até aos 90 dias e depois acréscimo na densidade populacional (Figura 11 – 4B). Na estufa, a fase inicial não foi problemática para as bactérias, pois a temperatura estava mais alta do que a encontrada na horta, em média de 28 °C e a umidade do ar em 70 % (Figura 12).

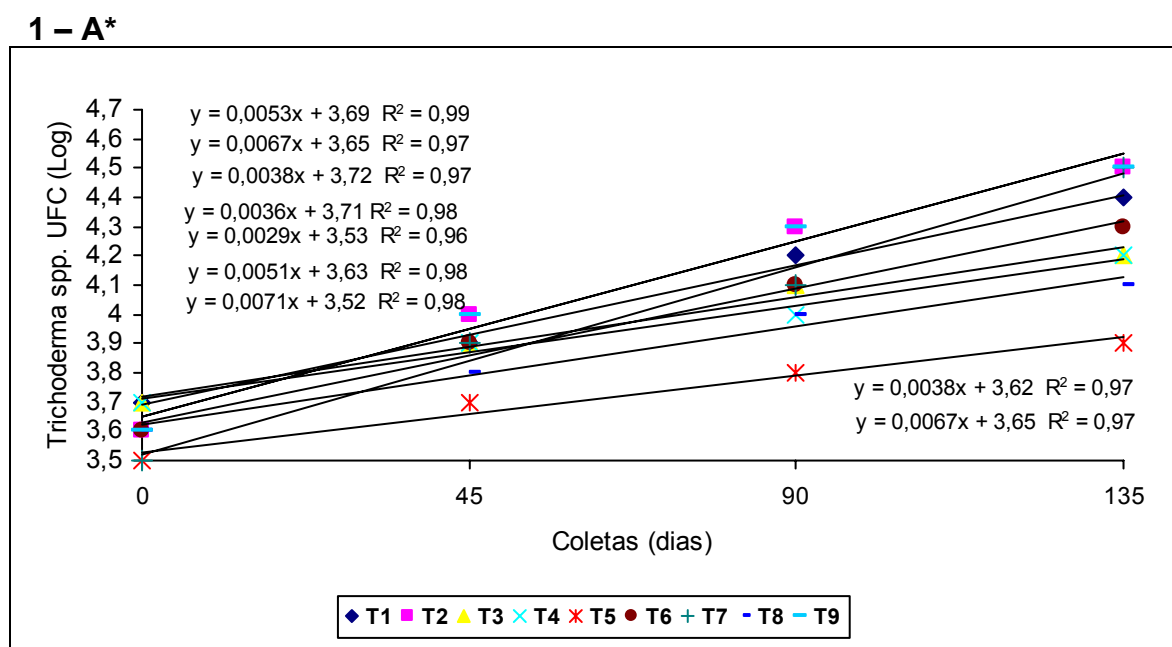
Para Vásquez et al. (2000), a densidade populacional de *Azospirillum* e *Pseudomonas* apresentou pequeno decréscimo e acréscimo, respectivamente, não significativos, na rizosfera de plantas de milho, após 60 dias da inoculação de *T. harzianum* em substrato.

5.3.2 – Experimentos realizados na primavera/verão

Para os experimentos realizados na primavera/verão, tanto no cultivo do tomateiro quanto do pepineiro, em horta e estufa, encontraram-se mudanças na densidade populacional de *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., bactérias e fungos totais.

No cultivo do pepineiro em horta, ocorreu interação dos fatores tratamentos x épocas de coleta, apenas quanto à avaliação da população de *Trichoderma* spp. (Figura 16 – 1A). Quanto à população de *Fusarium* spp. (Figura 16 – 2A) e fungos totais (Figura 16 – 3A) as diferenças foram apenas para as épocas de coleta, e para bactérias não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos e entre épocas de coleta.

Em estufa, não ocorreu interação dos fatores para nenhum dos microrganismos avaliados, mas ocorreram diferenças significativas, em épocas de coletas, para *Trichoderma* spp. (Figura 16 – 1B), *Fusarium* spp. (Figura 16 -2B), fungos totais (Figura 16 – 3B) e bactérias (Figura 16 – 4B).



(Continua...)

(Continuação...)

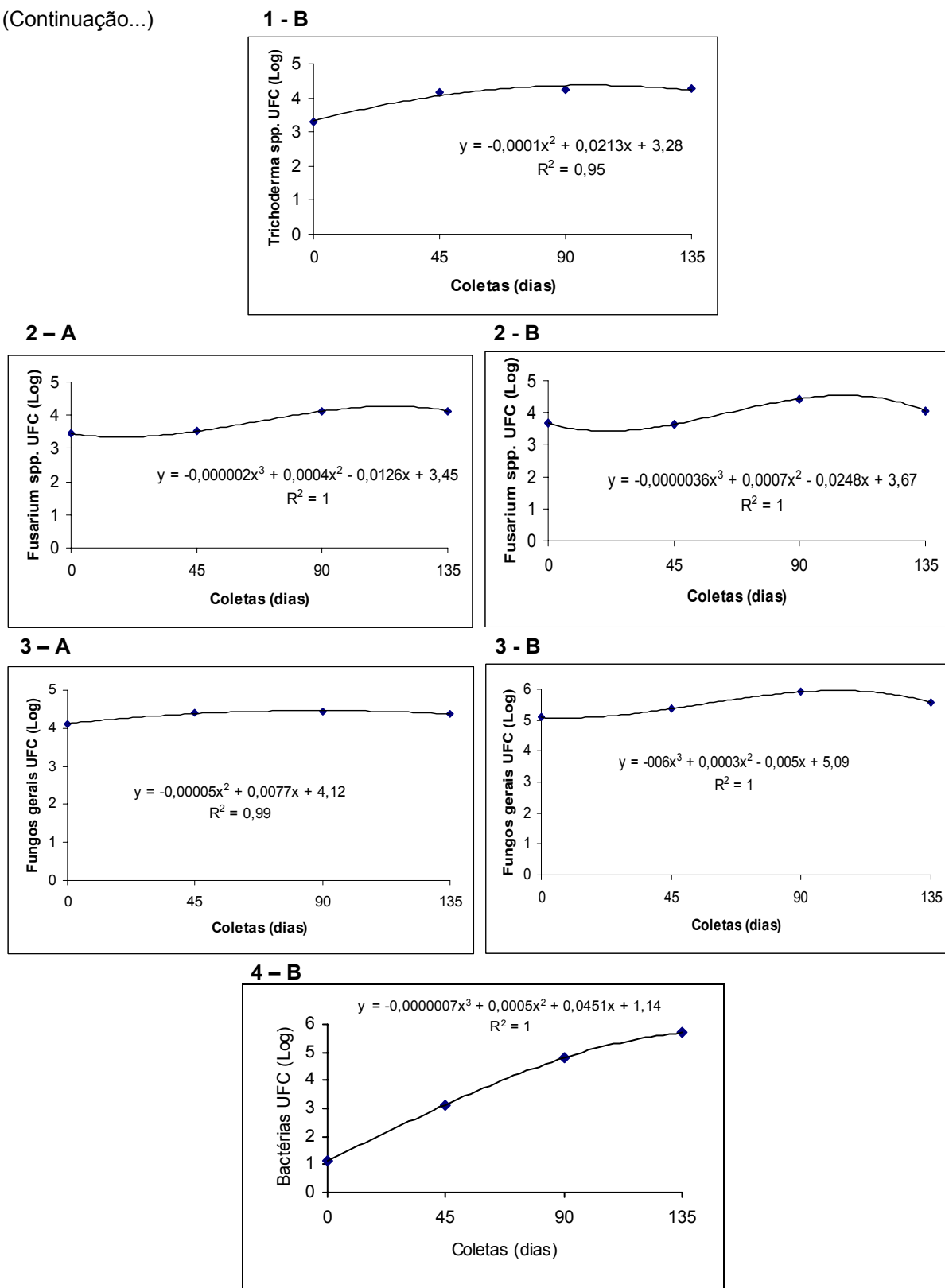


Figura 16 – População de *Trichoderma* spp. (1), *Fusarium* spp. (2), fungos totais (3) e bactérias (4), com a adição de isolados de *Trichoderma harzianum*, no cultivo do pepineiro, em horta (A) e estufa (B), na primavera/verão. Santa Maria – RS.

Tratamentos: T1- ETSR8 + planta; T2 - ETSR20 + planta; T3 - HTSR5 + planta; T4 - Mix + planta; T5 - planta; T6 - ETSR8; T7- ETSR20; T8 – HTSR5; T9 - Mix; T10 - sem tratamento e planta.

1A* - Nenhuma equação se adequou aos resultados do Tratamento 10.

A população de *Trichoderma* spp., no cultivo do pepineiro, em estufa, apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que os tratamentos com planta, ou seja, quando a coleta foi de solo rizosférico, apresentaram maior média de Log UFC/g de solo, quando comparados aos sem planta, de solo não rizosférico (Tabela 19). A menor média de Log UFC de *Trichoderma* spp./g de solo ocorreu no tratamento onde não foi adicionado agente de biocontrole nem planta.

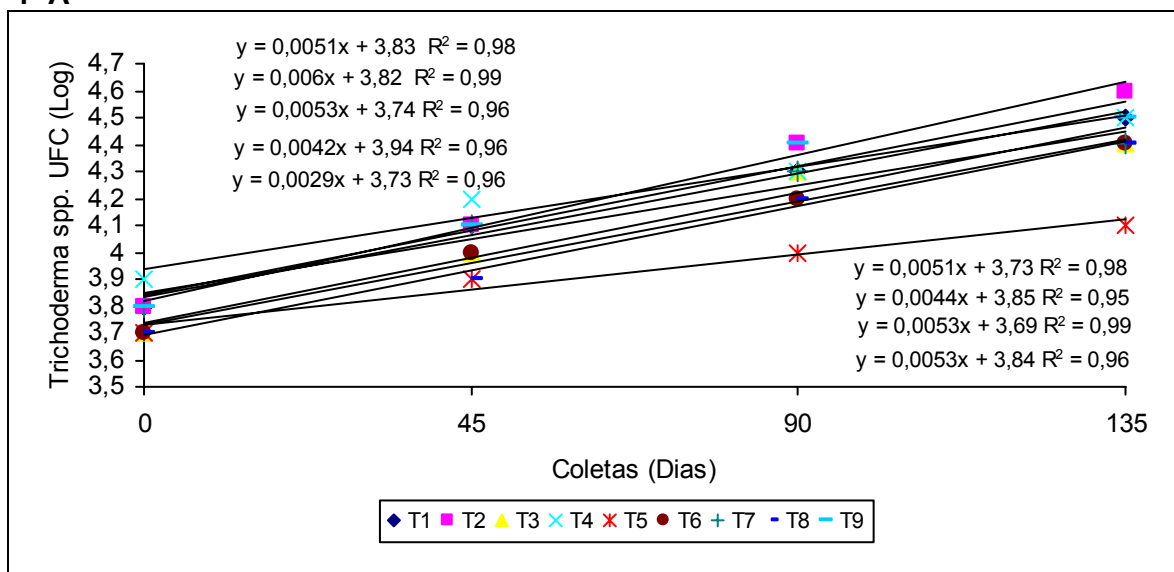
Tabela 19 – *Trichoderma* spp. (Log₁₀ UFC/g de solo) em solo rizosférico e não rizosférico, sob diferentes tratamentos com isolados e mix de *Trichoderma harzianum*, no cultivo do pepineiro, em estufa, na primavera/verão. Santa Maria – RS.

TRATAMENTO	<i>Trichoderma</i> spp. Log ₁₀ UFC/g de solo
ETSR8 + planta	4.13 a
ETSR20 + planta	4.13 a
MIX + planta	4.03 ab
MIX	4.03 ab
HTSR5 + planta	4.01 ab
ETSR8	4.00 ab
ETSR20	3.96 abc
HTSR5	3.94 abc
Testemunha - planta	3.90 bc
Testemunha - sem planta	3.78 c

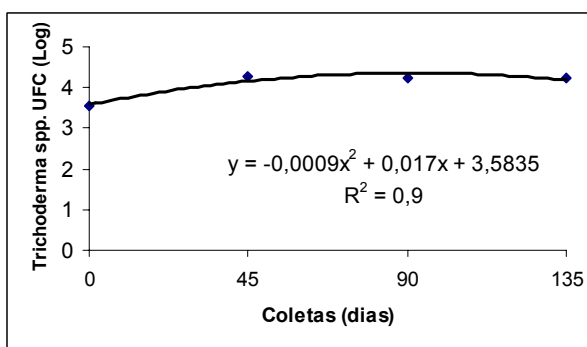
No cultivo do tomateiro em horta, ocorreu interação dos fatores tratamentos x épocas de coleta, apenas quanto à avaliação da população de *Trichoderma* spp. (Figura 17 – 1A). Quanto à população de *Fusarium* spp. (Figura 17 – 2A), fungos totais (Figura 17 – 3A) e bactérias (Figura 17 – 4A) as diferenças foram apenas para as épocas de coleta.

Em estufa, não ocorreu interação dos fatores para nenhum dos microrganismos avaliados, mas ocorreram diferenças significativas, em épocas de coletas, para *Trichoderma* spp. (Figura 17 – 1B), *Fusarium* spp. (Figura 17 -2B), fungos totais (Figura 17 – 3B) e bactérias (Figura 17 – 4B).

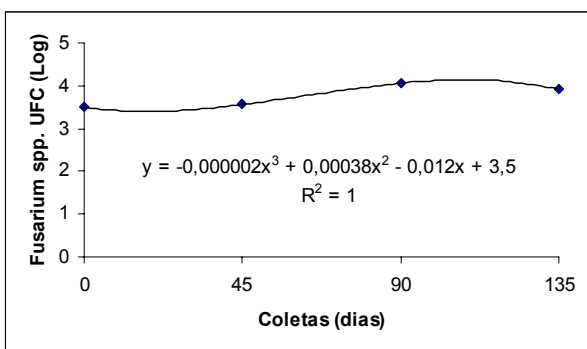
1- A*



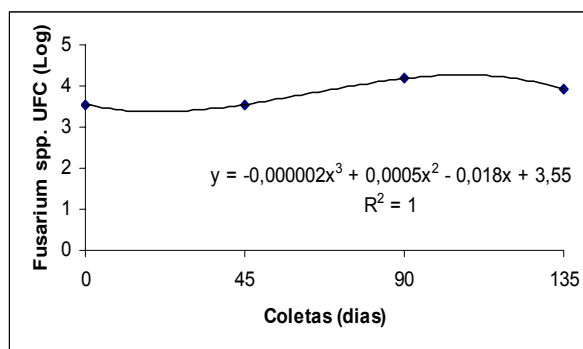
1-B



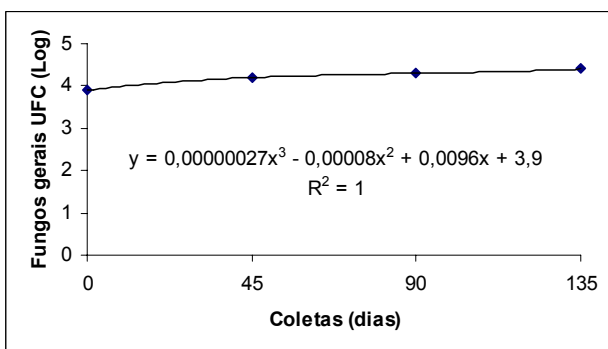
2-A



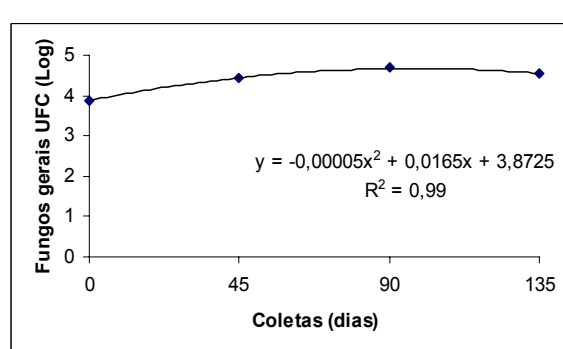
2-B



3-A



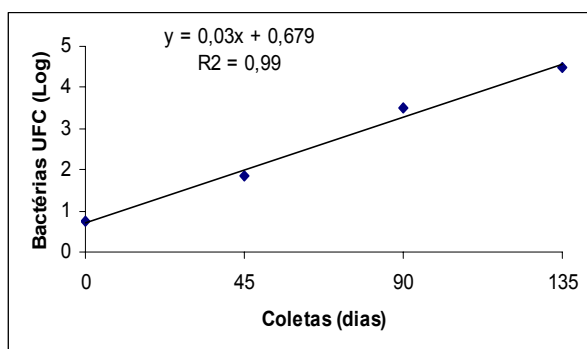
3-B



(Continua...)

(Continuação...)

4-A



4-B

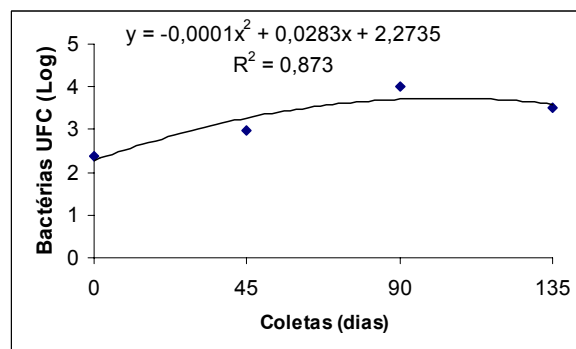


Figura 17 – População de *Trichoderma* spp. (1), *Fusarium* spp. (2), fungos totais (3) e bactérias (4), com a adição de isolados de *Trichoderma harzianum*, no cultivo do tomateiro, em horta (A) e estufa (B), na primavera/verão. Santa Maria – RS.

Tratamentos: T1- ETSR8 + planta; T2 - ETSR20 + planta; T3 - HTSR5 + planta; T4 - Mix + planta; T5 - planta; T6 - ETSR8; T7- ETSR20; T8 – HTSR5; T9 - Mix; T10 - sem tratamento e planta.

1A* - Nenhuma equação se adequou aos resultados do Tratamento 10.

Para a população de *Trichoderma* spp., no cultivo do tomateiro, em estufa, ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que os tratamentos com planta, ou seja, quando a coleta foi de solo rizosférico, apresentaram maior média de Log UFC/g de solo quando comparados aos sem planta, de solo não rizosférico (Tabela 20). O tratamento que apresentou menor média foi aquele em que não foi adicionado agente de biocontrole nem planta.

Tabela 20 – *Trichoderma* spp. (Log₁₀ UFC/g de solo) em solo rizosférico e não rizosférico, sob diferentes tratamentos com isolados e mix de *Trichoderma harzianum*, no cultivo do tomateiro, em estufa, na primavera/verão. Santa Maria – RS.

TRATAMENTO	<i>Trichoderma</i> spp. Log ₁₀ UFC/g de solo
ETSR20 + planta	4.22* a
HTSR5 + planta	4.17 ab
MIX + planta	4.14 ab
MIX	4.10 abc
ETSR8 + planta	4.09 abc
ETSR20	4.06 abcd
ETSR8	4.05 abcd
HTSR5	4.03 bcd
Testemunha - planta	3.92 cd
Testemunha - sem planta	3.88 d

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

5.3.2.1- Sobrevivência e desenvolvimento populacional de *Trichoderma* spp. em experimentos na primavera/verão

Nos experimentos realizados com o pepineiro e tomateiro, com a introdução dos isolados de *T. harzianum*, ocorreu um aumento na densidade populacional de *Trichoderma* spp. no solo, que se manteve até a última coleta. Os resultados sobre os níveis populacionais de *Trichoderma* com relação as diferentes épocas de coleta foram semelhantes, tanto para horta quanto para estufa, pois após a primeira coleta, quando ocorreu a introdução dos isolados de *T. harzianum*, ocorreu acréscimo populacional e foram ocorrendo pequenos acréscimos ou estabilização da população (Figura 16 – 1A e 1B, Figura 17 – 1A e 1B). Para a estufa, tanto no cultivo do tomateiro quanto do pepineiro, os tratamentos com ou sem planta apresentaram comportamento semelhante, embora a menor média de UFC para *Trichoderma* spp. tenha sido para o tratamento sem planta e adição do agente de biocontrole. O mesmo comportamento na dinâmica populacional de *Trichoderma* spp. foi observado por Sivan et al. (1987) em solo rizosférico de tomateiro, cultivado a céu aberto, conduzido até 168 dias após o tratamento de solo, com isolado de *T. harzianum*.

Não foram realizadas diluições do solo após a retirada das plantas (pepineiro e tomateiro) para ter-se a densidade populacional residual, que deve ter ficado ao nível da população natural (inicial) dos solos de horta e estufa. Segundo Matsumura et al. (2002) *Trichoderma* spp. adicionado em diferentes substratos (húmus de minhoca, esterco de gado, suíno e aves, além de solo não adubado) se estabeleceu apenas por um determinado tempo, e depois de 120 dias, voltou à densidade populacional inicial, encontrada naturalmente nos substratos. Assim como Sivan et al. (1984), que adicionando *T. harzianum* em diferentes substratos contendo compostos e restos culturais de algodoeiro e trigo, observaram que a população de *Trichoderma* spp. avaliada após 7 dias foi altíssima quando comparada com as avaliações após 1 ano. Pode-se inferir que a natureza se recompõe com o passar do tempo, mesmo permanecendo algum residual do agente de biocontrole.

A população de *Trichoderma* spp. uma vez estabelecida na rizosfera do tomateiro e pepineiro pode acompanhá-los durante todo o ciclo das culturas, mesmo nas condições climáticas da primavera/verão. O isolado T-41 de *T. virens* adicionado em solo infestado com *Phytophthora* se estabeleceu e se manteve na rizosfera de

framboesa (HARMAN, 2000). A rizosfera de plantas de milho e soja, que receberam tratamento de sementes com *T. harzianum*, apresentaram aumento na densidade populacional de *Trichoderma* do décimo ao vigésimo dia, de 105×10^4 para 135×10^4 e de 7×10^4 para 21×10^4 UFC, respectivamente (WINDELS et al., 1985) assim como *T. koningii* que se estabeleceu e desenvolveu na rizosfera do tomateiro realizando o biocontrole de *Sclerotium rolfsii* (TSAHOURIDOU & THANASSOULOPOULOS, 2002).

Os tratamentos com o isolado HTSR5 (T3 e T8) que apresentou melhores resultados como agente de biocontrole da fusariose do tomateiro e pepineiro (Capítulo IV) não apresentaram diferenças relevantes quanto ao desenvolvimento populacional de *Trichoderma* spp. quando comparados aos demais, com isolados ou mix de *T. harzianum*, tanto no cultivo do pepineiro quanto do tomateiro, em horta ou estufa, e nos experimentos de outono/inverno ou primavera/verão. Ahmad & Baker (1988) observaram semelhante densidade populacional, em solo rizosférico do tomateiro, de dois isolados de *T. harzianum* aplicados no solo, após nove semanas da semeadura.

O tratamento sem planta e sem a adição de isolados de *T. harzianum* (T10), nos experimentos da primavera/verão, apresentou o mesmo comportamento citado para o outono/inverno, pois nenhuma das equações se adequou aos resultados dos experimentos com tomateiro e pepineiro, além de apresentar menor média de UFC para *Trichoderma* spp. quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 19 e 20). O outro tratamento testemunha, apenas com planta (T5), pepineiro ou tomateiro, apresentou a mesma tendência dos demais tratamentos, porém obteve menores médias de UFC de *Trichoderma* em todos os experimentos, no outono/inverno e primavera/verão. Pode-se inferir que a adição dos isolados de *T. harzianum* influenciou no desenvolvimento e estabilidade populacional de *Trichoderma* spp. no solo, nos experimentos para o pepineiro e tomateiro, no outono/inverno e na primavera/verão. Segundo Lewis & Papavizas (1984), *T. viride* e *T. harzianum* adicionados ao solo, na forma de micélio jovem e de conídio, apresentaram acréscimo ou estabilidade populacional, respectivamente, até a terceira semana da inoculação e depois ocorreu decréscimo populacional até a nona semana.

A população de *Trichoderma* spp. (UFC) apresentou baixa variação, nos experimentos para o pepineiro, de 3,5 a 4,5 Log e de 3,3 a 4,2 Log, para horta e estufa (Figura 16), respectivamente; e para o tomateiro de 3,7 a 4,6 Log e de 3,5 a

4,5 Log, para horta e estufa (Figura 17), respectivamente. As diferenças entre os níveis populacionais de *Trichoderma* spp. em horta e estufa, para as duas culturas, nos experimentos do outono/inverno e primavera/verão foram mínimas, mostrando que mesmo em baixas temperaturas esse gênero tem condições de se desenvolver e manter estáveis os níveis populacionais, principalmente na rizosfera. O desenvolvimento populacional ocorrido no outono/inverno pode estar relacionado aos isolados de *T. harzianum* introduzidos no ambiente, pois foram retirados do mesmo local onde ocorreu o desenvolvimento dos experimentos. Esses isolados de *T. harzianum* podem estar adaptados a baixas temperaturas.

A população de *Trichoderma* também pode sofrer interferência quando ocorrem tratamentos de solo ou sementes com outros agentes de biocontrole. O tratamento de sementes de milho com *Chaetomium globosum* acarretou diferenças na densidade populacional de *Trichoderma* em solo rizosférico de plantas tratadas e não tratadas, na ordem de 17.000 e 34.000, respectivamente (WINDELS et al., 1985). Garnica et al. (2004) observaram que rizobactérias promotoras de crescimento inoculadas em tubetes com substrato comercial reduziram em até 28% a população natural de *Trichoderma* durante aproximadamente 25 dias e, a partir daí, observaram tendência de restauração do nível populacional do fungo.

5.3.2.2- A adição de *Trichoderma* no solo e a interferência na microbiota nativa em experimentos na primavera/verão

Com a adição do agente de biocontrole não foram observadas grandes alterações na dinâmica populacional de *Fusarium* spp., fungos totais ou bactérias. De acordo com Siddiqui & Shaukat (2003), a adição de *Pseudomonas aeruginosa*, em geral, não produziu mudanças drásticas na estrutura da comunidade fúngica, na rizosfera do tomateiro.

A introdução de isolados de *T. harzianum* pode ter influenciado na dinâmica populacional de *Fusarium* spp. Os níveis populacionais nos experimentos do pepineiro (Figura 16– 2A e 2B) e tomateiro (Figura 17 – 2A e 2 B), em horta e estufa, apresentaram estabilidade, não ocorreram mudanças na densidade populacional, mesmo com a semeadura do pepineiro e tomateiro, pois em solo rizosférico o inóculo do patógeno tende a aumentar. A densidade populacional de *Fusarium* spp. em solo rizosférico de plantas de ervilha com 42 dias e não rizosférico, foi de 0.8 x

10^4 e 1.5×10^6 colônias, respectivamente (Windels & Kommedahl, 1982). O tratamento de sementes de milho com *Chaetomium globosum* acarretou diferenças na densidade populacional de *Fusarium* em solo rizosférico de plantas tratadas e não tratadas, na ordem de 9.000 e 17.000 UFC, respectivamente (WINDELS et al., 1985).

De acordo com Sivan et al. (1987), em solo rizosférico do tomateiro, tratado com *T. harzianum*, cultivado por 168 dias a céu aberto, ocorreu pequeno decréscimo gradativo da população de *Fusarium* spp. Porém, a população de *F. udum* apresentou acréscimo populacional na rizosfera de guandu, tratadas com *T. viride*, de 0.30×10^3 para 2×10^3 , dos 15 aos 60 dias do plantio, respectivamente (UPADHYAY & RAI, 1985). Foi, também, encontrada variação na densidade populacional de *F. oxysporum* em raízes de tomateiros cultivados em solos tratados com diferentes isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e Furadan (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2003).

A falta de grande oscilação na densidade populacional de *Fusarium* vindo a diminuir consideravelmente o nível da população do patógeno a campo, não pode ser considerada como resultado negativo, pois o controle biológico segundo Cook & Baker (1983) busca “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença” e não o extermínio do patógeno. Mesmo porque, o controle biológico deve estar relacionado à “saúde” do solo, ao “equilíbrio” da biota, pois fungos fitopatogênicos como *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* e *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* foram encontrados inibindo o desenvolvimento populacional do nematóide *Filenchus misellus* (OKADA & KADOTA, 2003).

Para os fungos totais, a introdução dos isolados de *T. harzianum* não apresentou interferência negativa, pois para o pepineiro, tanto em horta quanto em estufa, ocorreu acréscimo populacional logo da introdução dos agentes e da semeadura e foi ocorrer decréscimo populacional apenas após os 90 dias da semeadura (Figura 16 – 3A e 3B). Para o tomateiro, em horta, o comportamento foi semelhante ao pepineiro e, em estufa, ocorreu estabilização da população (Figura 17 - 3A e 3B). Os resultados para fungos totais encontrados para os experimentos do outono/inverno foram diferentes dos encontrados para primavera/verão, evidenciando que a temperatura e umidade podem ter influenciado no desenvolvimento dos isolados de *T. harzianum* e de fungos totais, principalmente nos primeiros 45 dias. Nessa fase inicial dos experimentos, em baixas temperaturas

(outono/inverno), ocorreu decréscimo e em altas temperaturas (primavera/verão) acréscimo populacional de fungos totais, embora tenha ocorrido estabilização ou acréscimo populacional para *Trichoderma*, em todos os experimentos. De acordo com Windels & Kommedahl (1982) o tratamento de sementes com *Penicillium oxalicum* acarretou acréscimo na população de fungos totais, na rizosfera de ervilha, até o 42 ° dia após a semeadura a céu aberto. Também foi encontrado acréscimo da população de fungos totais em solo de microcosmos tratados com diferentes isolados de *Trichoderma* (NASEBY et al., 2000).

A densidade populacional das bactérias pode ter sido mais influenciada pelas condições climáticas do que pela adição de *Trichoderma* no solo, também, para primavera/verão. Para o experimento do pepineiro em estufa e do tomateiro em horta, ocorreu tendência de aumento populacional constante (Figura 16 – 4B e Figura 17 – 4A), e para o tomateiro em estufa, pequeno acréscimo com tendência à estabilização (Figura 17 – 4B). A tendência populacional bacteriana pode estar ligada à temperatura, a qual apresentou média de 26 °C em horta (Figura 18) e 30 °C em estufa (Figura 19), tendo ocorrido 350mm de chuva durante a condução do experimento.

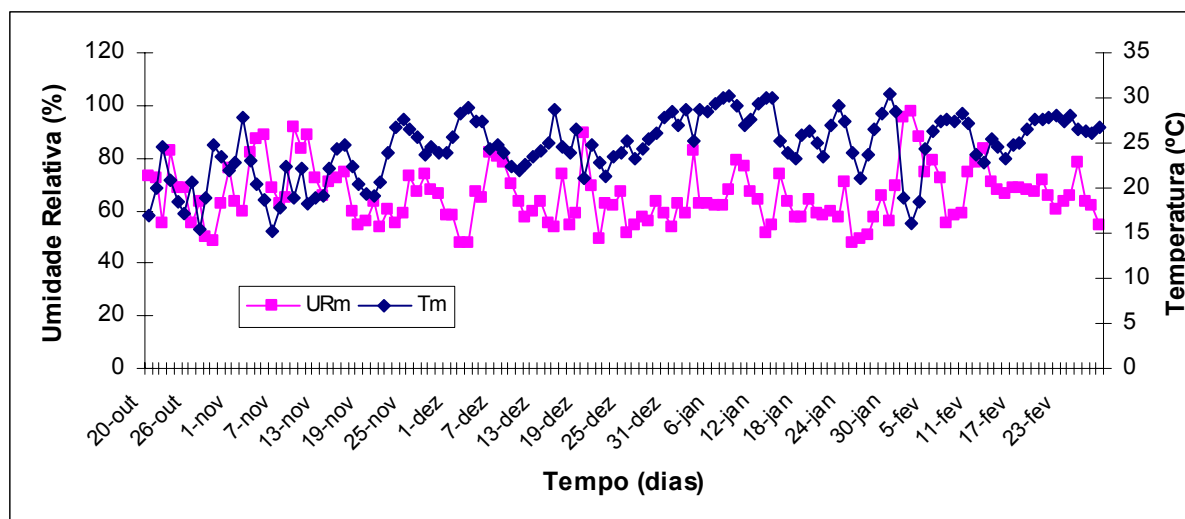


Figura 18 – Média da temperatura e umidade relativa referente aos experimentos da primavera/verão, em horta. Santa Maria – RS.

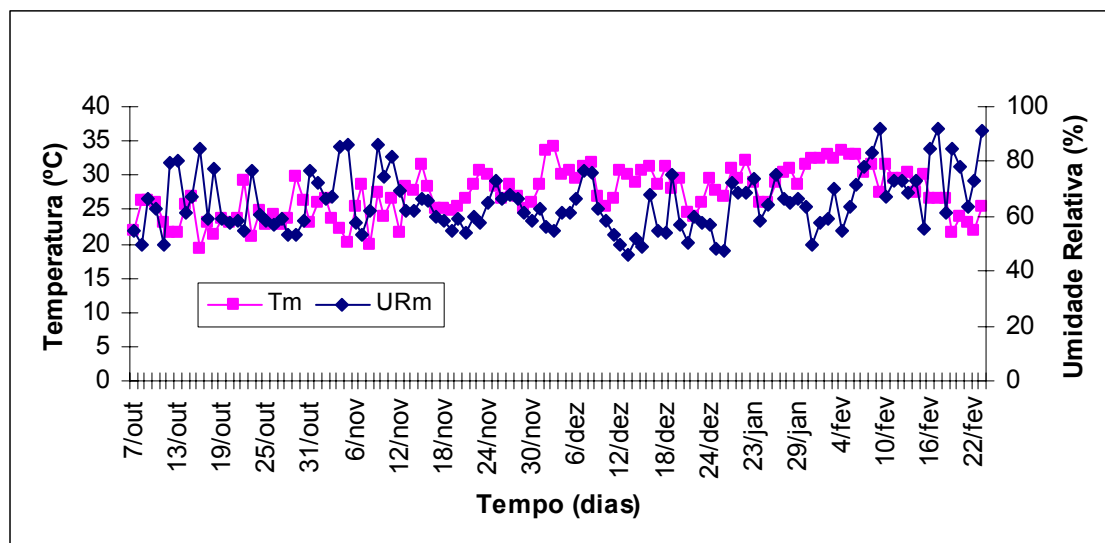


Figura 19 – Média da temperatura e umidade relativa referente aos experimentos da primavera/verão, em estufa. Santa Maria – RS.

De acordo com Windels & Kommedahl (1982), o tratamento de sementes com *Penicillium oxalicum* não afetou a densidade da população bacteriana na rizosfera de plantas de ervilha. Também foi encontrada pequena variação na densidade da população bacteriana em solo de microcosmos tratados com diferentes isolados de *Trichoderma* (NASEBY et al., 2000). Porém, o fungo micorrízico *Glomus fasciculatum* interferiu no desenvolvimento populacional bacteriano, diminuindo a biomassa bacteriana e mudando a estrutura espacial do crescimento bacteriano na rizosfera do pepineiro (CHRISTENSEN & JAKOBSEN, 1993).

5.4- CONCLUSÕES

Concluiu-se que:

- a adição de isolados de *Trichoderma harzianum* no solo de horta e estufa contribui para o desenvolvimento e estabilidade populacional de *Trichoderma* spp. em solo rizosférico, durante todo o ciclo de cultivo do tomateiro e pepineiro;
- a adição dos isolados de *Trichoderma harzianum* no solo, tanto de horta quanto de estufa, pode interferir na população de *Fusarium* spp., fungos totais e bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, J.S.; BAKER, R. Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 229-234, 1988.

BATISTA, E.B.S.; RUIVO, M.L.P.; OLIVEIRA, M.L. **População microbiana em latossolo amarelo e terra preta arqueológica na Estação Científica Ferreira Penna, Floresta Nacional de Caxiuanã, Município de Melgaço, Pará**. Belém – PA, 2004. (Boletim de pesquisa).

CAPALBO, D.M.F.; NARDO, E.A.B. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. v. 2. p. 351-387.

CHRISTENSEN, H.; JAKOBSEN, I. Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 15, p. 253-258, 1993.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412p.

FREITAS, T.M. Q. **Dano, dinâmica populacional e fontes de resistência genética a *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

GARNICA, A.C. et al. Interação ecológica entre rizobactérias e a população natural de *Trichoderma* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, suplemento, p. 240, 2004.

HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* – T22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377-392, 2000.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. **Phytopathology**, v. 74, p. 1240-1244, 1984.

LUO, Y., CHONG, S.K.; MYERS, O. Spatio-temporal analysis of soybean root colonization by *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in fields. **Plant Disease**, v. 85, p. 303-310, 2001.

MATSUMURA, A.T.S et al. Sobrevivência de *Trichoderma* sp. em solo com quatro tipos de adubação orgânica. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, suplemento, p. 133, 2002.

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

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A.; LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 161-169, 2000.

OKADA, H.; KADOTA, I. Host status of 10 fungal isolates for two nematode species, *Filenchus misellus* and *Aphelenchus avenae*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1601-1607, 2003.

RUPE, J.C. et al. Vertical and temporal distribution of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* in fields with sudden death syndrome of soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 245-251, 1999.

SIDDIQUI, I.; SHAUKAT, S.S. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on the diversity of culturable microfungi and nematodes associated with tomato: impact on root-knot disease and plant growth. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1359-1368, 2003.

SIVAN, A.; ELAD, Y.; CHET, I. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. **Phytopathology**, v. 74, p. 498-501, 1984.

SIVAN, A.; UCKO, O.; CHET, I. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. **Plant Disease**, v. 71, p. 587-592, 1987.

SMITH, E.; VAN ELSAS, J.D; VAN VEEN, J.N. Risks associated with the application of genetically modified microorganisms in terrestrial environmental. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 88, p. 263-278, 1992.

TAUK, S.M. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociência**, v. 20, n. 1-4, p. 299-301, 1990.

TSAHOURIDOU, P.C.; THANASSOULOPOULOS, C.C. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 767-776, 2002.

UPADHYAY, R.S; RAI, B. Antagonistic behavior of root region microfungi of pigeon pea against *Fusarium udum*. In: PARKER, C.A. et al. (Eds.) **Ecology and management of soilborne plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. p.131-133.

VÁZQUEZ, M.M. et al. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 261-272, 2000.

WINDELS, C.E et al. The role of seeds in the delivery of antagonists into the rhizosphere. In: PARKER, C.A. et al. (Eds.) **Ecology and management of soilborne plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. p.141-143.

WINDELS, C.E.; KOMMEDAHL, T. Rhizosphere effects of pea treatment with *Penicillium oxalicum*. **Phytopathology**, v. 72, p. 190-194, 1982.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que:

- os isolados de *Trichoderma* com maior habilidade em competir e se desenvolver tanto em solo rizosférico, quanto em solo não rizosférico, são aqueles retirados da rizosfera;

- o método de seleção em substrato foi eficiente para a seleção massal de isolados de *Trichoderma* a serem utilizados como agentes de biocontrole de fungos patogênicos veiculados pelo solo;

- os três isolados de *Trichoderma harzianum* selecionados, em substrato, apresentaram habilidade em reduzir a população de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* e foram eficientes no controle da fusariose do tomateiro e pepineiro, além de influenciarem no aumento e estabelecimento da densidade populacional de *Trichoderma* na rizosfera, durante o ciclo do tomateiro e pepineiro;

- o tratamento de sementes pode ser considerado um método viável de aplicação de *Trichoderma harzianum* para o controle de fungos de solo;

- no manejo integrado de doenças, isolados de *Trichoderma* podem ser utilizados, juntamente com fungicidas, para o tratamento de sementes, contra fitopatógenos de solo;

- sementes tratadas com *Trichoderma harzianum* podem ser utilizadas na produção de mudas em bandejas de isopor, pois no momento do transplante o agente de biocontrole está presente na rizosfera das mesmas;

- *Trichoderma harzianum* pode ser adicionado ao solo, sem causar impacto ambiental sobre fungos e bactérias;

- o desenvolvimento e a dispersão de *Trichoderma* ocorrem principalmente em solo rizosférico, sendo que não há motivo de preocupação com um desenvolvimento descontrolado no meio ambiente, devido a adição desse agente de biocontrole no solo.

Ações de pesquisa:

- controle biológico da fusariose com os três isolados de *Trichoderma harzianum* em diferentes locais e com diferentes isolados de *Fusarium oxysporum*.

- diferentes doses e frequência de aplicação dos isolados de *Trichoderma harzianum*;
- marcar isolados de *Trichoderma harzianum* e monitorar efeito residual;
- efeito da temperatura na sobrevivência dos isolados de antagonistas;
- caracterização molecular dos três isolados de *Trichoderma harzianum*;
- verificar a ação dos isolados de *Trichoderma harzianum* na absorção de nutrientes pelo tomateiro e pepineiro;
- utilizar os isolados de *Trichoderma harzianum* no controle de outros fungos de solo e com outras culturas.

ANEXO I

Características químicas dos solos de horta e estufa – Experimento outono/inverno.

Características	Horta	Estufa
Textura	3	4
Argila (% m/V)	27	24
pH (água)	5,5	6,2
Mat. Orgânica (% m/V)	3,4	2,5
P (mg/L)	37,7	49,5
K (mg/L)	152,0	138,0
Ca (cmol _c /L)	8,4	6,9
Mg (cmol _c /L)	2,6	2,9
Al (cmol _c /L)	0,0	0,0
CTC (cmol _c /L)	9,4	10,0
S (mg/L)	11,0	15,0
Cu (mg/L)	1,2	1,5
Zn (mg/L)	1,6	1,1
B (mg/L)	1,0	1,7

Características químicas dos solos de horta e estufa – Experimento primavera/verão.

Características	Horta	Estufa
Textura	4	4
Argila (% m/V)	24	25
pH (água)	6,3	4,2
Mat. Orgânica (% m/V)	3,3	3,3
P (mg/L)	33,0	27,0
K (mg/L)	200,0	144,0
Ca (cmol _c /L)	9,2	4,7
Mg (cmol _c /L)	3,9	1,8
Al (cmol _c /L)	0,0	2,3
CTC (cmol _c /L)	13,6	9,2
S (mg/L)	15,0	15,0
Cu (mg/L)	1,8	1,7
Zn (mg/L)	1,6	1,4
B (mg/L)	1,4	1,6