CONTROLE DA PODRIDÃO DE RAIZ (*Pythium aphanidermatum*) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM ALFACE HIDROPÔNICA

ÉLIDA BARBOSA CORRÊA

2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ÉLIDA BARBOSA CORRÊA

CONTROLE DA PODRIDÃO DE RAIZ (*Pythium aphanidermatum*) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM ALFACE HIDROPÔNICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do titulo de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Wagner Bettiol

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL
2006

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da UFLA

Corrêa, Élida Barbosa.
Controle da podridão de raiz (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento em alface hidropônica / Élida Barbosa. Corrêa. -- Lavras : UFLA, 2006.
93 p. : il.

Orientador: Wagner Bettiol.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Alface. 2. Hidroponia. 3. Doença fungica. 4. Controle biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.5285

ÉLIDA BARBOSA CORRÊA

CONTROLE DA PODRIDÃO DE RAIZ (*Pythium aphanidermatum*) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM ALFACE HIDROPÔNICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 2 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning	UFLA
Dr. Amaury da Silva dos Santos	Instituto Biológico, Campinas/SP

Prof. Dr. Wagner Bettiol

EMBRAPA/CNPMA

(orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Sidnei e Vilma, e ao
meu irmão, Rod,
pela confiança, força, amor e
sonhos compartilhados.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, e ao meu querido anjo da guarda.
À Universidade Federal de Lavras, pela realização do curso.
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico (CNPq), pelo apoio financeiro.
À Embrapa Meio Ambiente, pela infra-estrutura para a realização dos trabalhos.
Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, por tantos ensinamentos, orientação e amizade.
Ao Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza, pela co-orientação e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Ludwig Pfenning, pela amizade e aprendizado.
Ao Prof. Dr. John Sutton, pela amizade e ajuda científica, mesmo a longa distância.
Ao Prof. Dr. Itamar Soares Melo, pelos conselhos e amizade.
À Dra. Raquel Ghini, pela ajuda e conselhos.
À Dra. Carmen Zotarelli, do Instituto de Botânica, pelos ensinamentos quanto ao gênero *Pythium*.
Ao Dr. Marcelo Morandi, pela ajuda nas análises estatísticas e amizade.
Aos profissionais da SIT (Cleonice, Isabel, Sandro e Fernanda) e da biblioteca (Victor e Maria Amélia), da Embrapa Meio Ambiente, por tanta ajuda no transcorrer do período.
Aos profissionais dos Campos Experimentais da Embrapa Meio Ambiente (Abrahão, Waldemore, Tadeu, Henrique, Antônio, Laércio, Brasilino, Valdecir e Vicente), pela paciência, boa vontade, aprendizado, interesse e constante desejo de melhoria.
Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Rosely, João Luiz, Elke e Márcia Maria, por tantos "socorros" no desenvolvimento dos trabalhos e outros.
À Renata (secretária do DFP), pela compreensão e boa vontade.
Ao Bruno e Carlos, da Qualifértil, pela colaboração e doação dos materiais de hidroponia.
Ao Alaor, pela "doação" do computador.
Aos meus amigos do 'coração', Lucianas (Maria, Reyes, Ávila), Dagma, Rayris, Louise, Flávio, Helena, Jean, Nina, Amanda, Daniela, Liliana, Giseli, Cristina, Sarah, Alexandre, Pablo, Cris, João, Eduardo, Zayame, Heloísa, Isabeli, Kelly, Kátia e Góes, tão presentes na minha vida e tão importantes nestes dois anos de mestrado e durante o resto da vida.

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
1 INTRODUÇÃO 1
2 REFERENCIAL TEÓRICO 5
2.1 Cultivo da alface hidropônica 5
2.2 Podridão de raiz causada por *Pythium* spp. 6
2.3 *Pythium* 8
2.4 Fonte de inóculo e disseminação de *Pythium* 9
2.5 Infecção por *Pythium* spp. 9
2.6 Colonização e sintomatologia 10
2.7 Controle da podridão de raiz induzida por *Pythium* spp. 10
2.8 Controle biológico 11
2.9 Promoção de Crescimento 14
3 MATERIAL E MÉTODOS 17
3.1 Produção de alface em sistema hidropônico 17
3.2 Preparação da solução nutritiva e monitoramento da condutividade elétrica, pH e temperatura 18
3.3 Microrganismos utilizados 20
3.4 Produção dos microrganismos 21
3.5 Avaliação da promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico 25
3.5.1 Promoção de crescimento com *Trichoderma* sp. 25
3.5.2 Promoção de crescimento com *Clonostachys rosea* 26
3.5.3 Promoção de crescimento com *Bacillus subtilis* 27
3.5.4 Promoção de crescimento com *Paenibacillus lentimorbus* 27
3.5.5 Promoção de crescimento com *Saccharomyces cerevisiae* 27
3.5.6 Promoção de crescimento com Polyversum® 28
3.5.7 Promoção de crescimento com o produto comercial P.S.B Solan® 28
3.5.8 Promoção de crescimento com fertilizante à base de fermentado de peixe 29
3.6 Avaliação do potencial de controle biológico de *Pythium aphanidermatum* em plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico 29
3.6.1 Potencial de *Clonostachys rosea* no controle da doença 29
3.6.2 Potencial de *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e Polyversum® no controle da doença 32

3.6.3 Potencial de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus*, P.S.B e fermentado de peixe no controle da doença 32
3.7 Análise estatística 33
4 RESULTADOS 34
4.1 Promoção de crescimento 34
4.1.1 Promoção de crescimento com *Trichoderma* sp. 34
4.2.1 Promoção de crescimento com *Clonostachys rosea* 40
4.1.3 Promoção de crescimento com *Bacillus subtilis* 43
4.1.4 Promoção de crescimento com *Paenibacillus lentimorbus* 44
4.1.5 Promoção de crescimento com *Saccharomyces cerevisiae* 46
4.1.6 Promoção de crescimento com Polyversum® 48
4.1.7 Promoção de crescimento com P.S.B Solan 50
4.1.8 Promoção de crescimento com fertilizante à base de fermentado de peixe 52
4.2 Controle biológico de *Pythium aphanidermatum* 56
4.2.1 Controle biológico de *Pythium aphanidermatum* com *Clonostachys rosea* 56
4.2.2 Potencial de *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e Polyversum® no controle da podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum*. 64
4.2.3 Potencial de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus*, PSB e fermentado de peixe no controle da podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* 69
5 DISCUSSÃO 75
5.1 Promoção de crescimento 75
5.2. Controle biológico 79
6 CONCLUSÕES 85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

RESUMO

CORRÊA, Élida Barbosa. **Controle da podridão de raiz (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento em alface hidropônica**. UFLA: 2006, 93 p. (Dissertação em Fitopatologia).[1]

Devido às características do sistema hidropônico, a podridão de raiz causada por *Pythium* é limitante para a cultura, não existindo fungicidas registrados para esse patossistema e as técnicas de controle disponíveis apresentam alto custo e baixa eficiência. Além disso, por ser um sistema de alto custo, é importante incrementar o crescimento das plantas. Assim, o presente trabalho teve por objetivo estudar a capacidade de agentes de controle biológico (*Trichoderma* sp., *Clonostachys rosea*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus* e *Saccharomyces cerevisiae*) e dos produtos P.S.B® Solan, Polyversum® e fermentado de peixe (Fishfértil®) em controlarem a podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* e promoverem o crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. *C. rosea*, *Trichoderma* sp., *P. lentimorbus*, *S. cerevisiae*, Polyversum®, P.S.B® e fermentado de peixe não promoveram o crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. As concentrações de 10^7 conídios/mL de *Trichoderma* sp., 10% do meio de cultura fermentado por *B. subtilis* ou não fermentado pelas bactérias, 250, 500 e 1000g/50L de solução nutritiva do fermento biológico Itaiquara (*S. cerevisiae*) e 100, 150 e 250mL/100L de fermentado de peixe (Fishfértil®) foram prejudiciais ao desenvolvimento das plantas. Meio de cultura fermentado por *B. subtilis* na concentração de 1% promoveu o crescimento de plantas de alface. *C. rosea* controlou a podridão de raiz causada por *P. aphanidermatum* em plantas de alface cultivada em sistema hidropônico e diminuiu a porcentagem de recuperação de *P. aphanidermatum* nas raízes das plantas em 29% e 43%, nos tratamentos com *C. rosea* aplicado três dias antes e no momento da infestação com o patógeno e três dias antes, no momento e três dias após a infestação dos tanques com o patógeno, respectivamente.

[1] Comitê Orientador: Wagner Bettiol – Embrapa Meio Ambiente (Orientador), Edson Ampélio Pozza – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

CORRÊA, Élida Barbosa**. Control of root rot (*Pythium aphanidermatum*) and growth promotion in lettuce crops in hydroponic system.** UFLA: 2006, 93 p. (Dissertation – M.Sc. in Phytopathology).[2]

Due to the characteristics of hydroponic systems, root rot caused by *Pythium* is limiting for the crop. There are no fungicides registered for this pathossystem and available control techniques are expensive and little efficient. As it is a high-cost system, enhancement of plant growth is imperative. The present work aimed to study the capacity of biological control agents such as *Trichoderma* sp., *Clonostachys rosea*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus* and *Saccharomyces cerevisiae*, and products like P.S.B® Solan, Polyversum® and Fishfértil®, a product based on fermented fish, in a hydroponic system to control root rot caused by *Pythium aphanidermatum* and to promote lettuce growth. *C. rosea*, *Trichoderma*, *P. lentimorbus*, *S. cerevisiae*, Polyversum®, P.S.B® and Fishfértil® did not promote lettuce growth in the hydroponic system. The concentrations of 10^7 conidia/mL of *Trichoderma* sp.; 10% of culture medium fermented by *B. subtilis* or not; 250, 500 and 1000g/50L of nutrient solution of biological ferment Itaiquara (*S. cerevisiae*); and 100, 150 and 250mL/100L of Fishfértil® were harmful to the plant development. A culture medium fermented by *B. subtilis* in the concentration of 1% promoted lettuce growth. *C. rosea* controlled the root rot caused by *P. aphanidermatum* in lettuce grown in hydroponic system and reduced the percentage of recovery of *P. aphanidermatum* in 29% (first trial) and 43% (second trial) in the treatments with *C.rosea*, delivered three days before and at the moment of infestation with the pathogen for the first trial and three days before, at the moment and three days after infestation with the pathogen for the second trial.

[2] Guidance Committee: Wagner Bettiol – Embrapa Meio Ambiente (Adviser), Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-adviser)

1 INTRODUÇÃO

A cultura da alface possui grande importância econômica no Brasil e no mundo, sendo a hortaliça mais consumida e cultivada (Bueno, 1998). Seu cultivo pode ser realizado da forma convencional, orgânica ou hidropônica e concentra-se nos cinturões verdes próximos aos grandes centros urbanos.

Devido à antecipação do ciclo da cultura, à elevada qualidade, à homogeneidade, à maior durabilidade em pós-colheita e à programação da produção, o cultivo hidropônico da alface vem crescendo entre os produtores de hortaliças (Yanez, 2000; Zinnen, 1988).

Apesar de oferecer inúmeras vantagens, o cultivo hidropônico é uma técnica que exige cuidado especial quanto à sanidade das plantas por parte dos produtores, pois é um sistema com baixa diversidade biológica, elevada densidade e uniformidade genética de plantas, características que favorecem o desenvolvimento de epidemias. Além disso, devido à solução nutritiva circular por todo o sistema, a disseminação dos patógenos é eficiente (Paulitz, 1997; Stanghellini, 1988; Zinnen, 1988).

Podridões radiculares são os principais problemas que acometem culturas desenvolvidas em hidroponia. Dentre os mais importantes e destrutivos patógenos de diferentes culturas em sistemas hidropônicos destacam-se as espécies pertencentes ao gênero *Pythium* (Utkhede et al., 2000). Diversas espécies de *Pythium* são capazes de causar podridão de raiz em diferentes culturas em sistemas hidropônicos. No entanto, *Pythium ultimum* e *Pythium aphanidermatum* são as espécies mais comuns e destrutivas que afetam a cultura da alface hidropônica (Stanghellini & Rasmussem, 1994).

A principal medida de controle da doença é o impedimento da entrada do patógeno no sistema de produção por meio de mudas sadias, água de boa

qualidade, materiais e ferramentas não contaminadas (Paulitz & Bélanger, 2001; Sutton, et al., 2000).

Após a entrada de *Pythium* no sistema hidropônico, medidas culturais podem ser adotadas para a desinfestação do sistema (limpeza por meio de soluções de cloro) e da solução nutritiva (remediação com radiação ultravioleta, filtração e elevadas temperaturas). No entanto, medidas de desinfestação da solução nutritiva têm se mostrado pouco efetivas, pois não afeta a população do patógeno presente diretamente na zona de infecção e somente a população que se encontra na solução nutritiva (Khan et al., 2003).

O controle químico da doença não é recomendado, pois não existe fungicida registrado para a cultura. Além disso, estudos demonstraram que a aplicação de fungicidas causa fitotoxidez em plantas de alface (Paulitz & Belánger, 2001; Utkhede et al., 2000).

Devido às perdas causadas por podridões radiculares, provocadas por espécies de *Pythium* em cultivos hidropônicos e à falta de medidas eficientes de controle, torna-se necessário a busca por alternativas para o controle da doença economica e tecnicamente viáveis e ecologicamente corretas.

Recentemente, vários autores demonstraram a potencialidade de utilização do controle biológico como uma alternativa para conter os danos causados pela doença (Chatterton et al., 2004; Khan et al., 2003; Liu et al., 2002; Paulitz & Bélanger, 2001; Punja & Yip, 2003; Utknede et al., 2000).

Microrganismos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas, Bacillus, Trichoderma, Clonostachys* e *Saccharomyces* e isolados de *Pythium oligandrum* são estudados com comprovada eficiência no controle biológico em diversos patossistemas (Khan et al., 2003; Paulitz & Bélanger, 2001; Piccinin, 1995; Utkhede et al., 2000; West et al., 2003).

Clonostachys rosea demonstrou capacidade no controle de diversas doenças, como a podridão de raiz em ervilha, causada por um complexo de

fitopatógenos, incluindo *Pythium* spp. (Xue, 2003). Produto à base de *C. rosea* está sendo registrado no Canadá e Estados Unidos para o cultivo hidropônico com a finalidade de controlar *Pythium* em pepino e tomate (J.C. Sutton, 2005, comunicação pessoal). Espécies de *Trichoderma* são reconhecidas como agentes de controle biológico de *Pythium*. Devido a esta característica, existem produtos formulados e registrados para controle da doença como o Rootshield™ (*Trichoderma harzianum,* isolado T-22) e o SoilGard® (*Trichoderma virens*) nos Estados Unidos e Canadá (Paulitz & Belánger, 2001). Polyversum® é um produto comercial formulado com *Pythium oligandrum*, registrado para controle biológico de *Pythium*. *P. oligandrum* é um micoparasita agente de controle biológico de diversos fungos fitopatogênicos e tem a capacidade de induzir a resistência de plantas (Picard et al., 2000). Entre as leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* é um promissor agente de biocontrole de doenças e agente indutor de resistência de plantas. A aplicação de *S. cerevisiae* reduziu a incidência da antracnose incitada por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão, quando aplicada 24 horas antes da inoculação do patógeno (Cia et al., 2004). Dentre as bactérias, *Pseudomonas chlororaphys* e *Bacillus subtilis* foram relatadas como eficientes agentes de controle de *Pythium* em sistemas hidropônicos (Paulitz & Bélanger, 2001).

Muitos dos microrganismos reconhecidos como agentes de controle biológico de doenças de plantas também são capazes de promover o crescimento de plantas. Quantum-4000®, YIB®, Kodiak® e Kodiak® plus são produtos existentes no mercado do exterior, formulados com *Bacillus subtilis* e registrados como promotores de crescimento e com eficiência para controlar doenças em diversas culturas (Luz, 1996). *C. rosea* e *P. oligandrum* também foram relatados como promotores de crescimento de plantas (Al-Rawahi & Hancock, 1998; Liu & Sutton, 2002).

Produtos orgânicos constituídos de hidrolisados de peixe foram eficientes no controle de *Pythium*. Dramm Corp® é um produto constituído de peixe hidrolisado que, aplicado na concentração de 0,2%, promove crescimento e controla a podridão de raiz em pepinos cultivados em sistemas hidropônicos no Canadá (J.C. Sutton, 2005 comunicação pessoal). Além disso, disponibilizam nutrientes para as culturas.

O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade de agentes de controle biológico (*Trichoderma* sp., *Clonostachys rosea*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus*, *Saccharomyces cerevisiae*) e dos produtos P.S.B Solan®, Polyversum® e fermentado de peixe em promoverem o crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico e controlarem a podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultivo da alface hidropônica

Hidroponia é um termo derivado de duas palavras de origem grega: *hidro* – água e *ponia* – trabalho.

O cultivo hidropônico é uma técnica de cultivo protegido na qual o solo é substituído por uma solução nutritiva que contém macro e micronutrientes necessários para o desenvolvimento da planta. Este tipo de cultivo apresenta algumas vantagens, como a antecipação do ciclo da cultura e maior homogeneidade das plantas, razão pela qual vem sendo amplamente utilizado e difundido entre os produtores de hortaliças e plantas ornamentais.

Alface, rúcula, agrião, tomate, morango, salsa, cebolinha, aipo, menta, manjericão e pepino são as principais culturas produzidas em sistemas hidropônicos no Brasil (Furlani, 1999).

O cultivo da alface hidropônica no Brasil é realizado predominantemente no sistema de cultivo *nutrient film technique* ou NFT, que se caracteriza em uma técnica de fluxo laminar de solução nutriente (Furlani, 1998).

Além de ser a hortaliça mais consumida entre os brasileiros, a alface destaca-se como a principal hortaliça produzida em sistemas hidropônicos, devido à elevada qualidade do produto final que se apresenta mais tenro, limpo e com maior longevidade após a colheita, pois é comercializado com as raízes (Yañez, 2000). O destino final deste produto são as grandes redes de supermercados, empresas processadoras de verduras que adquirem o produto por peso, varejões e feiras.

2.2 Podridão de raiz causada por *Pythium* spp.

Sistemas de produção hidropônicos oferecem ambiente favorável ao progresso de epidemias, pois, além da proximidade entre as plantas e da baixa diversidade genotípica, estes sistemas possuem baixa diversidade biológica. Assim, fitopatógenos, uma vez introduzidos no ambiente, podem desenvolver-se plenamente, sem competição com outros microrganismos. Além disso, são eficientemente transportados por meio da circulação da solução nutritiva (Paulitz, 1997; Zinnen, 1988).

Podridão de raiz causada por espécies de *Pythium* é o principal problema patológico de vegetais cultivados em sistemas hidropônicos, podendo acarretar na destruição da cultura (Utkhede et al., 2000). Stanghellini & Russel (1971) atribuíram perda de 100% na produção de mudas de tomate hidropônico a *P. aphanidermatum*.

Nos diversos estados brasileiros onde se pratica hidroponia a podridão de raízes causada por *Pythium* foi diagnosticada como a principal causa de perdas econômicas por parte dos produtores. No estado do Pará, Santos et al. (2005) realizaram o primeiro relato sobre a ocorrência de *Pythium* causando apodrecimento de raízes e murcha das folhas em cultivos hidropônicos de alface. Em um levantamento realizado no Norte do estado do Paraná no período de 2003 a 2005, a podridão radicular causada por *Pythium* foi o principal problema da cultura da alface hidropônica, sendo o verão o período mais crítico (Severino et al., 2005).

A podridão de raiz causada por *Pythium* spp. também é considerada uma ameaça para a produção de biomassa vegetal em veículos espaciais e instalações extraterrestres, pois, o fitopatógeno já foi isolado de materiais vegetais de veículos espaciais que estavam operando na órbita da Terra (Jenkis et al., 2000; Novikova, 2001; Schuerger, 1998).

A fase de maior suscetibilidade das plantas à podridão de raiz é o inicio de desenvolvimento. No entanto, em todos os períodos de desenvolvimento das plantas, as raízes novas podem ser parasitadas (Paulitz & Belánger, 2001).

Verifica-se maior incidência e severidade da doença nos meses de verão, sendo a temperatura um fator importante no seu desenvolvimento. Elevadas temperaturas favorecem o patógeno e ocasionam estresse nas plantas, diminuindo a sua resistência natural. Plantas em estado de estresse e floração são mais suscetíveis ao ataque de *Pythium* devido ao aumento da exsudação radicular (Hamlen et al., 1972). Yanez (2000) verificou que a 30^{o}C isolados de *P. helicoides* provocaram a morte de sementes de alface em germinação, e que na temperatura de 21^{o}C, os isolados induziram subdesenvolvimento de plântulas acompanhado ou não de necrose dos tecidos radiculares.

Ao mesmo tempo em que *Pythium* spp. causa enormes perdas na cultura, ele também pode causar infecções subclínicas. Essas infecções levam a uma redução de produção, não havendo exibição de sintomas óbvios da doença nas plantas, ocasionando a não detecção da doença pelo produtor (Utkhede et al., 2000). Em estudo do efeito de diferentes densidades de inóculo de *P. aphanidermatum* no progresso da podridão de raízes em pepino, foi observado que, nas concentrações de 2 x 10^5 a 2 x 10^6 UFC/100L, ocorre o escurecimento das raízes das plantas e que, na concentração de 2 x 10^6 UFC/100L, todas as plantas morrem entre 7 e 28 dias após a inoculação. Baixas concentrações do patógeno levaram a uma redução de crescimento e produção (Menzies et al., 1996).

Pythium pertencente ao grupo F foi encontrado colonizando raízes de tomate hidropônico, sem exibição de sintomas aparentes quando as plantas desenvolviam-se em condições ideais. No entanto, alguns isolados são capazes de causar severas necroses, principalmente em plantas sob estresse (Chérif et al., 1996; Rey et al., 1997; Rey et al., 1998).

2.3 *Pythium*

Espécies de *Pythium* foram reclassificadas como pertencentes ao Reino Chromista. Algumas características que compreendem a classificação destes microrganismos neste Reino são a produção de esporos assexuais com flagelos heterocontos (tipo tinsel e chicote), denominados zoósporos, produção de esporos sexuais de parede espessa chamados oósporos, constituição da parede celular de celulose, fase vegetativa diplóide e crista mitocondrial tubular (Corliss, 1994; West et al., 2003).

Espécies de *Pythium* são os principais agentes causais de podridões radiculares em sistemas hidropônicos, pois são microrganismos altamente adaptados ao ambiente aquático. Devido a produção de zoósporos apresenta uma vantagem biológica para disseminação e estabelecimento do seu ciclo de vida (Paulitz & Bélanger, 2001).

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzp., *P. debaryanum* Hesse, *P. dissotocum* Drechsler, *P. irregulare* Buisman, *P. myriotylum*, *P. ultimum* Trow e outras espécies pertencentes ao grupo F e G foram diagnosticados como agentes causais de podridões radiculares de pepino, tomate, alface e espinafre em sistemas hidropônicos (Bates & Stanghellini 1984; Favrin et al., 1998; Jenkins & Averre, 1983; Menzies et al., 1996). *Pythium helicoides* e espécies de *Pythium* pertencentes ao grupo F e T foram isolados de raízes de alface hidropônica, exibindo ou não sintomas da doença de diferentes procedências do estado de São Paulo (Yanez, 2000). No entanto, de acordo com Stanghellini & Rasmussen (1994), *P. ultimum* e *P. aphanidermatum* são as espécies encontradas com maior freqüência e agressividade que afetam a cultura da alface hidropônica.

2.4 Fonte de inóculo e disseminação de *Pythium*

A introdução do fitopatógeno em culturas hidropônicas ocorre por meio de água utilizada para preparo da solução nutritiva, solos e resíduos vegetais contaminados. Estes podem ser veiculados por ferramentas contaminadas, poeira e sapatos (Martin & Loper, 1999; Owen Going et al., 2003; Rey et al., 1997). Entretanto, mudas contaminadas é a principal forma de disseminação do patógeno a curtas e longas distâncias.

Substratos utilizados para a produção de mudas também podem ser fontes de inóculo. Favrin et al. (1988) reportaram a contaminação da casa de vegetação com *Pythium* por meio de turfa contaminada.

Insetos vetores também podem atuar como agentes de disseminação de *Pythium*. S*catella stagnalis* é uma mosca freqüentemente encontrada em sistemas hidropônicos e sua alimentação é constituída basicamente de algas. Além destes insetos se alimentarem de algas, também se alimentam de raízes de pepino colonizadas por *P. aphanidermatum* (Goldberg & Stanghellini, 1990). Segundo os mesmos autores, larvas e adultos são capazes de transmitir o fitopatógeno para plantas sadias.

2.5 Infecção por *Pythium* spp.

A infecção por *Pythium* pode ocorrer por meio de diversas estruturas, como esporângios, zoósporos, micélio e oósporos. Esporângios e oósporos podem germinar diretamente pela formação do tubo germinativo ou indiretamente produzindo zoósporos. No entanto, as principais estruturas de infecção são zoósporos e micélio (Endo & Colt, 1974; Stanghellini, 1988). A infecção por zoósporos na superfície das raízes segue as etapas de atração, fixação, encistamento, germinação do cisto e orientação do tubo de germinação. A infecção por zoósporos na epiderme radicular pode ocorrer em um período de cinco minutos, seguida de rápido desenvolvimento na zona de elongação das

raízes (Stanghellini & Rasmussen, 1994). Isolados virulentos podem produzir inóculo secundário para outras plantas dentro de 24 horas (Johnstone, 2001).

2.6 Colonização e sintomatologia

A colonização de raízes de plantas cultivadas em sistemas hidropônicos por *Pythium* spp. segue um estádio biotrófico e outro necrotrófico de desenvolvimento. Owen-Going et al. (2003) verificaram que a colonização de *P. aphanidermatum* e *P. dissotocum* em raízes de plantas de pepino inicia-se com um estádio biotrófico, sem desenvolvimento de sintomas aparentes, seguindo para um estádio necrotrófico. Na fase necrotrófica, as raízes tornam-se descoloridas, adquirindo diferentes tons de marrom (*P. aphanidermatum*) e amarelo (*P. dissotocum*).

Alterações estruturais, como mudanças arquiteturais nos sistemas radiculares, subdesenvolvimento, engrossamento e proliferação de raízes, também ocorrem nas raízes parasitadas por esses patógenos em diferentes tipos de culturas desenvolvidas em sistemas hidropônicos, como pepino, crisântemo e alface (J. C. Sutton; W. Liu; M. Johsntone; N. Ortiz-Uribe, 2002-2003, observações não publicadas, Owen-Going et al., 2003). Sintomas na parte aérea das plantas afetadas por *Pythium* incluem subdesenvolvimento, diminuição da aérea foliar, murchamento e diminuição na frutificação (Zheng et al., 2000). Embora considerado um patógeno de zonas corticais das raízes, espécies de *Pythium* podem se desenvolver em tecidos vasculares, como *Fusarium* e *Verticillium* (Chérif et al., 1991).

2.7 Controle da podridão de raiz induzida por *Pythium* spp.

A principal forma de controle da doença é a preventiva, evitando a entrada do patógeno no sistema, principalmente, por meio da utilização de água de boa qualidade e mudas sadias.

O controle da doença por meio de cultivares resistentes ainda não é possível, pois, não existem cultivares com esta característica disponível no mercado.

Métodos culturais, como a esterilização ou a desinfestação da solução nutriva por meio da radiação UV (Stanghellini et al., 1984), filtragem (Goldberg et al., 1992), ozonização e o uso de surfactantes (Stanghellini & Miller, 1997), têm a utilização comercial limitada (Menzies & Bélanger, 1996; Paulitz, 1997; Paulitz & Bélanger, 2001) e possuem o inconveniente de não afetar a população do patógeno presente na zona de infecção (Khan et al., 2003). Tanaka et al. (2003) desenvolveram um sistema automatizado de aquecimento solar para tratamento térmico da água para controle de fitopatógenos e conseguiram eliminar *Pythium*, *Fusarium*, *Phytophthora* e *Rhizoctonia solani*, trabalhando na faixa de 60^{O}C.

Métodos químicos, como a utilização de fungicidas, não são recomendados, pois, não possuem registro para a cultura e podem causar fitotoxicidade. Utkhede et al. (2000) testaram a capacidade de fosetyl-Al e metalaxyl em controlar a podridão de raiz causada por *Pythium* em alface sob cultivo hidropônico e demonstraram que os fungicidas foram fitotóxicos às plantas, causando redução de peso de parte aérea e radicular. Segundo Cohen & Coffee (1986), a aplicação destes fungicidas é eficiente no controle de doenças causadas por espécies de *Pythium* onde o substrato de cultivo utilizado é o solo. Este efeito fitotóxico observado nas plantas em cultivo hidropônico pode ser explicado pela ausência de poder tamponante do solo, encontrado na solução nutritiva (Utkhede et al., 2000).

2.8 Controle biológico

O controle biológico da podridão de raiz causada por espécies de *Pythium* vem sendo estudado e insere-se neste contexto como uma medida

promissora e eficiente de controle da doença (Chatterton et al., 2004; Khan et al., 2003; Liu et al., 2002; Paulitz & Bélanger, 2001; Punja & Yip, 2003; Sutton, 2003; Utkhede et al., 2000).

Além de não apresentar os inconvenientes do controle químico, como a contaminação do ambiente e, conseqüentemente do homem, a utilização do controle biológico em hidroponia tem a vantagem da atuação de agentes de biocontrole ser diretamente na zona de infecção do fitopatógeno, pois, ambos os microrganismos competem pelos exsudados presentes na zona radicular.

Dentre os microrganismos promissores estudados para controle da doença, encontram-se *Pseudomonas chlororaphis Tx-1* Chatterton et al., 2004; Khan et al., 2003), *Pseudomonas fluorescens 63-28* (Liu et al., 2002; Paulitz & Bélanger, 2001), *Comamonas acidovorans* C-4-7-28 (Liu et al., 2002), *Bacillus cereus* HYU06 (Liu et al., 2002), *Bacillus subtilis* BACT-O (Utkhede et al., 2000), *Gliocladium catenulatum* J1446 (Punja & Yip, 2003), *Trichoderma* spp. (Paulitz & Bélanger, 2001), *Pythium oligandrum* (Picard et al., 2000) e *Clonostachys rosea* (Liu & Sutton, 2002).

Khan et al. (2003) demonstraram o elevado antagonismo desempenhado por *Pseudomonas chlororaphis* Tx-1 a *P. aphanidermatum* e a capacidade do isolado bacteriano em controlar a podridão de raiz de pepino cultivado em sistema hidropônico.

A avaliação da capacidade *in vitro* de 604 isolados rizobacterianos provenientes de plantas de pepino hidropônicos de diferentes localidades do estado de Québec, Canadá, foi realizada por meio da inibição do crescimento micelial e da germinação de zoósporos de *Pythium* para o controle da podridão de raiz *in vivo*. O melhor teste *in vitro* para selecionar os isolados foi o de inibição de germinação de zoósporos, pois, os cinco melhores isolados no controle da doença *in vivo* foram os melhores isolados *in vitro*. Bactérias podem

reduzir a podridão de raiz interferindo no estádio inicial da doença como na atração, adesão, encistamento e germinação dos zoósporos nas raízes das plantas. Dentre os isolados rizobacterianos avaliados, o isolado que melhor controlou a doença foi responsável pela redução do número de zoósporos encistados e germinados na superfície das raízes (Paulitz et al., 1992).

A aplicação do produto comercial Boost® (*Bacillus subtilis*), a $1x10^9$ UFC/L, aumentou a produção de alface na presença de *P. aphanidermatum* cultivado em sistema hidropônico em 21,5% a 28,4%, quando comparado à testemunha inoculada (Utkhede et al., 2000).

O isolado de *Clonostachys rosea* (ACM941) foi capaz de controlar a podridão de raiz em ervilha, causada por um complexo de fitopatógenos, incluindo *Alternaria alternata*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, no campo (Xue, 2003). *C. rosea* também é capaz de suprimir o desenvolvimento e a esporulação de *Botrytis cinerea* em tecidos vegetais por meio de hiperparasitismo, competição por nutrientes e pela colonização dos tecidos senescentes (Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997).

Espécies de *Trichoderma* são microrganismos padrões nos estudos de controle biológico. Atualmente, existem diversos produtos registrados à base de *Trichoderma* para controle de doenças e, inclusive, para o controle da podridão de raiz induzida por *Pythium* (Howell, 2003; Paulitz & Bélanger, 2001).

Também pertencentes ao Reino Chromista existem micoparasitas, como *Pythium oligandrum*, *Pythium acanthicum* e *Pythium periplocum*, que são capazes de suprimir o desenvolvimento de vários patógenos de plantas veiculados pelo solo (Al-Rawahi & Hancock, 1998; Benhamou et al., 1997; Madsen & Neergaard, 1999). Picard et al. (2000) demonstraram a potencialidade da utilização de *P. oligandrum* e das enzimas celulolíticas produzidas por esta espécie no controle de patógenos como *Phytophthora* e *Pythium* spp., em

cultivos protegidos. A aplicação de *P. oligandrum* em plantas de tomate inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-licopersici* controlou a doença por meio da indução de resistência nas plantas e do micoparasitismo desempenhado pelo agente de controle biológico (Benhamou et al., 1997).

A aplicação da bactéria *Paenibacillus macerans* na microbiolização de sementes de trigo foi capaz de proteger as plantas contra os patógenos *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera tritici-repentis* (Luz, 1996).

Produtos orgânicos podem ser eficientes no controle de doenças. El Ghaouth et al. (1994) aplicaram quitosana na concentração de 100 ìL e 400ìL em plantas de pepinos cultivados em sistema hidropônico e verificaram o controle da podridão de raiz induzida por *P. aphanidermatum* e a indução de alguns mecanismos de defesa como barreiras estruturais nos tecidos radiculares e a produção de enzimas antifúngicas como quitinases e â-1,3-glucanase nas raízes e folhas. O produto Dramm Corp®, formulado à base de peixe hidrolisado, tem-se mostrado eficiente no controle da podridão de raiz causada por *Pythium* e *Fusarium oxysporum* em plantas de pepino, promovendo o desenvolvimento vigoroso do sistema radicular (J.C. Sutton, comunicação pessoal, 2005).

2.9 Promoção de Crescimento

A aplicação de rizobactérias promotoras de crescimento destaca-se como um dos métodos mais promissores de incremento na produção agrícola e na biodegradação de poluentes em solos (Van Veen et al., 1997). Microrganismos promotores de crescimento de plantas são capazes de colonizar a zona radicular e atuar como agentes de controle biológico de fitopatógenos.

A promoção de crescimento das plantas por estes organismos é realizada por mecanismos diretos de promoção de crescimento ou por mecanismos indiretos, como a eliminação da população de microrganismos deletérios na zona radicular. No entanto, a maioria dos microrganismos estudados atualmente

é capaz de promover o crescimento das plantas por meio do mecanismo indireto (Luz, 1996).

A aplicação de *Pseudomonas corrugata* e *Pseudomonas fluorescens* subgrupo C promoveu o crescimento das plantas em 134%, quando comparado à testemunha livre da bactéria e do patógeno (Paulitz et al., 1992). Paulitz et al. (1997) constataram que, dentre os três isolados bacterianos capazes de promover o crescimento de plantas de pepino hidropônico, dois possuíam capacidade de controlar a doença em condições de casa de vegetação. Os autores sugerem que a capacidade dos isolados em controlar a doença pode ser explicada pela capacidade de promover o crescimento das plantas, compensando, dessa forma, os danos causados pelo fitopatógeno.

O isolado de *Bacillus subtilis* (OG), reclassificado como *Paenibacillus lentimorbus* (OG), demonstrou capacidade em promover crescimento em diversas plântulas (citros, pepino e tomate) e controlar a podridão de raiz causada por *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plântulas de citros (Amorim & Melo, 2002 e Melo et al., 1995).

Estudando a colonização de raízes de tomateiro por rizobactérias promotoras de crescimento e antagônicas a *P. aphanidermatum* e *Rizoctonia solani* em microscopia eletrônica de varredura, Melo et al. (2004) verificaram que o isolado de *Bacillus* (AD13) se desenvolveu em regiões lesionadas de zonas de crescimento e base da região pilífera. Esta característica de crescimento do isolado (AD13) pode inibir o processo de infecção de fitopatógenos que penetram por ferimentos, resultando em controle da doença.

Rizobactérias promotoras de crescimento do gênero *Bacillus* produzem uma ampla gama de antibióticos e são utilizadas como agentes de controle biológico de diversos fitopatógenos nas mais diferentes culturas (Dunleavy, 1955, Landy et al., 1948; Michener & Smell, 1949; citados por Luz, 1996).

A capacidade de espécies de *Trichoderma* em promover o crescimento direto, aumentar a germinação e o florescimento de plantas foi demonstrada por diversos autores, como Baker (1989), Linch et al. (1991), Martins & Melo (1989), Okleifeld & Chet (1992), Paulitz et al. (1986), citados por Melo (1996). *Trichoderma harzianum* (T-203) aplicado no solo de cultivo de plantas de pepino foi capaz de promover o crescimento das plantas. No entanto, quando este mesmo isolado foi aplicado em plantas de pepino cultivadas em hidroponia, a absorção de nutrientes como zinco, fósforo e manganês foram incrementada, resultando em plantas com maiores níveis destes nutrientes na parte aérea (Yedidia et al. 2001).

Na avaliação da efetividade de agentes de controle biológico em suprimir a podridão de raiz causada por *P. aphanidermatum* e *P. dissotocum*, em plantas de pepino cultivadas em sistema hidropônico, *Clonostachys rosea* (PG-710) protegeu as plantas contra a infecção e promoveu o crescimento das plantas, na presença do patógeno (Liu & Sutton, 2002). Com a aplicação de *C. rosea* (isolado IK726) para controle de *Pythium tracheiphilum* em couve chinesa, ocorreu o controle do patógeno e as plantas ganharam incremento de 10% na produção (Moller et al., 2003).

Al-Rawahi & Hancock (1998) demonstraram a capacidade de *P. oligandrum* na promoção de crescimento em plantas de pepino e no controle biológico de *Verticilium dahliae*. Os autores atribuíram ao mecanismo de promoção de crescimento o sucesso de controle biológico do fitopatógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção de alface em sistema hidropônico

Para a produção de alface, sementes da cultivar crespa Vera, produzidas pela empresa Sakata Seed América, foram semeadas em espumas fenólicas 2,0 x 2,0 x 2,0cm (Green-up – Atlanta) e mantidas nestas até atingirem o ponto de desenvolvimento para a transferência para o berçário. O tempo médio entre a semeadura e o ponto de transplante foi de, aproximadamente, 16 dias. Após esse período, as células da espuma fenólica foram destacadas e as mudas transferidas para um sistema de produção de mudas denominado berçário.

O berçário contém 10 canaletas de 6,4m de comprimento, 1,5m de largura e 1,22m de altura, e 60 furos de 3cm diâmetro por canaleta, com 30% de declividade. O sistema é alimentado por uma bomba de máquina de lavar roupa, com uma caixa como reservatório com capacidade para 100L de solução nutritiva. As plântulas permaneciam no berçário até atingirem o ponto de transferência para o sistema definitivo, em média, 19 dias.

O sistema de produção definitivo de alface utilizado no experimento é constituído de dois tipos, sob e fora do telado (Figura 1). Sob telado (SST), o sistema é formado de duas mesas de 1,22m de altura e 1,5m de largura e 15% de declividade. Cada mesa possui seis canaletas de 5,9m de comprimento, com 23 furos de 5cm de diâmetro. Cada canaleta possui um tanque sob a mesa para a solução nutritiva a qual é reciclada por uma bomba de aquário submersa da marca Sarlo Better, modelo B500, com capacidade para 540L/h e tanques reservatórios de solução nutritiva com capacidade para o volume de 50L. O sistema fora do telado (SFT) é semelhante ao sob telado. No entanto, as bombas utilizadas para este sistema pertencem à marca Resun modelo SP-2500 L e têm a

capacidade de 1400L/h e os tanques reservatórios de solução nutritiva possuem a capacidade de 100L de água.

3.2 Preparação da solução nutritiva e monitoramento da condutividade elétrica, pH e temperatura

A preparação da solução nutritiva foi feita em água não clorada, por meio da diluição de um kit composto com macro e micronutrientes para a produção de alface hidropônica (produzido pela Qualifértil – Comércio e Representações Ltda). A condutividade elétrica (CE) da solução nutritiva do berçário foi mantida em 0,7mS. Por outro lado, a do sistema definitivo foi mantida em 1,5 mS, com monitoração a cada 4 dias.

O monitoramento da temperatura da água foi realizado diariamente, no período da manhã e da tarde, por meio de um termômetro Chektemp. Também foram medidas diariamente as temperaturas máximas e mínimas do ar, com auxílio de um termômetro de máxima e mínima.

O pH da solução nutritiva foi determinado a cada quatro dias, conjuntamente com a medição da condutividade elétrica.

FIGURA 1. Sistema de produção definitivo de alface hidropônica: A) sistema de produção fora do telado, e B) tanques e canaletas do sistema de produção sob telado.

3.3 Microrganismos utilizados

Utilizaram-se no trabalho dois isolados de *P. aphanidermatum*, provenientes da coleção de culturas da Embrapa Meio Ambiente (CCMA 242) e do Instituto de Botânica de São Paulo (SPC 1973), obtidos de plantas de pepino.

Os agentes de controle biológico utilizados foram: *Clonostachys rosea*, isolado Cr61, obtidos de plantas de morango da cidade de Bento Gonçalves, RS; *Trichoderma* sp. obtido em solo cultivado com algodão no município de Roda Velha, BA; *Bacillus subtilis,* isolado AP-3, descrito por Bettiol (1988); *Paenibacillus lentimorbus*, isolado da rizosfera de feijoeiro da região de Guairá, SP todos mantidos na coleção de culturas da Embrapa Meio Ambiente; *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico Itaiquara, produzido na Usina Itaiquara de Açúcar e Álcool S.A, no município de Tapiratiba, SP); *Pythium oligandrum* (Polyversum®, produzido pela Biologisches Pflanzen Hilsfs-Und Starkungsmittel e introduzido pela Biocontrol Ltda, com Registro Especial Temporário).

Além dos agentes de controle biológico, foram estudados mais dois produtos: Fishfértil® (fertilizante orgânico obtido pela fermentação de pescados frescos marinhos, indicado como ativador do metabolismo geral das plantas e usado para aumentar a resistência das plantas - Gerbi Ltda, Tabela 1) e o produto P.S.B Solan®, fornecido pela Enzimac Indústria Orgânica Ltda, como sendo uma formulação de *Rodopseudomonas*. P.S.B® é um produto orgânico indicado para controle de diversas doenças foliares e radiculares e, como agente promotor de crescimento de plantas, sua utilização é realizada por produtores de alface hidropônica para controle da podridão de raiz causada por *Pythium*. De acordo com o representante comercial da empresa, sua formulação é realizada por meio da fermentação da bactéria *Rodopseudomonas* sp. em resíduo da indústria Fleischmann. No entanto, a bactéria isolada do produto foi identificada como

Bacillus sphaericus, por meio da análise de ácidos graxos realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental, da Embrapa Meio Ambiente.

TABELA 1. Atributos do produto Fishfértil®

	P/P	**(P/V)**
Nitrogênio	1%	11,5g/L
P_2O_5 sol. emH_2O	2%	23g/L
Cálcio	1%	11,5g/L
Ferro	0,25%	2,88g/L
Manganês	0,05%	0,58g/L
Molibdênio	0,01%	0,12g/L
Carbono orgânico	18%	207g/L

3.4 Produção dos microrganismos

Para a produção de inóculo de *P. aphanidermatum* utilizaram-se três técnicas: 1) produção de micélio, 2) produção de micélio e zoósporos e 3) produção de zoósporos.

1) Para a produção de micélio, *P. aphanidermatum* foi mantido em placas de Petri contendo aproximadamente 20mL do meio de cultura V8 (100mL de suco de tomate V8 e 16g de ágar em 900mL de água destilada). Para tanto, as culturas foram incubadas por cinco dias a 25°C ± 1°C, sob regime de luz continua.

2) Para a produção de micélio e zoósporos, foi utilizada a técnica de produção de zoósporos descrita por Rahimian e Banihashemi (1979). O cultivo de *Pythium* foi realizado em meio de cultura V8 na concentração de 10% por 48 horas, sob regime de luz fluorescente a 25°C ± 1°C. Decorrido o período, o meio contido nas placas foi cortado em tiras de 1 cm de espessura e metade do conteúdo de uma placa foi transferido para outra placa. Adicionaram-se em cada

placa, 20mL de água destilada e as culturas foram incubadas por mais 48 horas sob regime de luz fluorescente a 25°C ± 1°C. Após 48 horas, a água das placas foi novamente trocada e as culturas foram incubadas por mais quatro horas, a 20°C ± 1°C para liberação dos zoósporos. O micélio e os zoósporos foram utilizados para inoculação das plantas (Figura 2).

3) Para a produção de zoósporos, *P. aphanidermatum* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura suco de tomate (V8 acrescido de 2g de $CaCo_3$/1000mL) durante quatro dias em regime de luz continua, a 25°C ± 1°C. Decorrido este período, o meio de cultura com crescimento micelial foi cortado em tiras de aproximadamente 1cm de largura e metade do conteúdo foi transferida para outra placa vazia. Adicionoram-se, em cada placa de Petri, aproximadamente 20mL de água destilada autoclavada e seguiu-se a incubação em regime de luz continua, a 25°C ± 1°C, durante mais quatro dias. Após a incubação das culturas no período descrito o líquido das placas foi retirado e substituído por mais 20mL de água destilada autoclavada, após aproximadamente 4 horas ocorreu a liberação dos zoósporos (Figura 3). A concentração utilizada para a inoculação foi ajustada para $1x10^4$ zoósporos/mL.

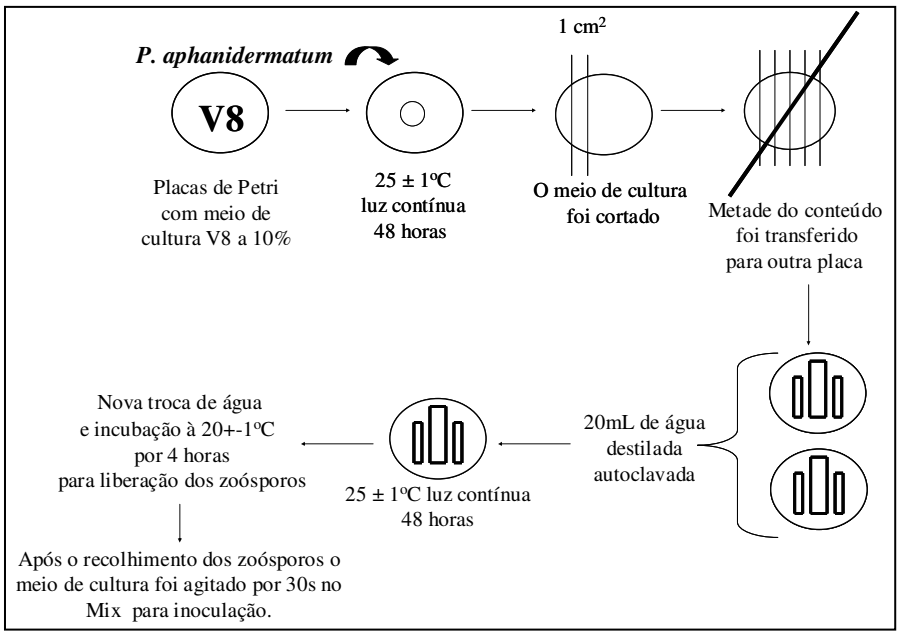

FIGURA 2. Produção de zoósporos e micélio de *Pythium aphanidermatum*

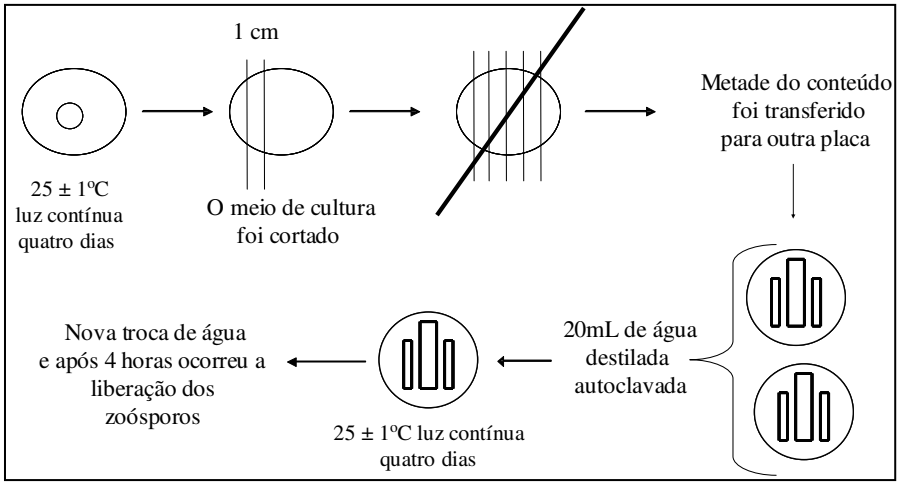

FIGURA 3. Produção de zoósporos de *Pythium aphanidermatum*

Clonostachys rosea foi multiplicado em sacos de polipropileno (25x35cm) contendo arroz com casca. Anteriormente à inoculação com *C. rosea* o arroz foi lavado e cozido por aproximadamente 1 hora em água destilada. Após o resfriamento e retirada do excesso de água do arroz por meio de escoamento, foram adicionadas 600g de arroz por cada saco de polipropileno. Os sacos de polipropileno foram autoclavados em dois dias alternados por 30 minutos. Após as autoclavagens, adicionaram-se 10mL de uma suspensão contendo $2x10^7$ conídios/mL de *Clonostachys* por saco e procedeu-se à incubação em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, a $25^{O}C \pm 1°C$, por 10 dias. Transcorrido o período, em cada saco foi aberto um orifício para instalação de uma janela com papel filtro esterilizado e incubado por mais vinte dias.

A produção de *Trichoderma* foi realizada em substrato à base de arroz. Adicionaram-se, em sacos de polipropileno (25x35cm), 400g de arroz + 125mL de água destilada. Após autoclavagem por 20 minutos, adicionaram-se nos sacos 10mL de suspensão (10^6conídios/mL) do fungo obtida pela diluição de uma placa de Petri, tomada com o crescimento do fungo em um litro de água destilada autoclavada. Depois de 14 dias de incubação a $25^{O}C \pm 1°C$, sob luz constante e homogeneização em dias alternados, o inóculo foi utilizado nos experimentos.

A produção de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus lentimorbus* foi realizada em meio de cultura líquido (0,5% de milhocina + 0,5% de melaço + 0,3% de fosfato monobásico), em fermentador Microferm (Produzido pela New Bronswick Scientific C.O INC) ou em shaker, a 180 rpm, por cinco dias. Para tanto, 1000 mL de inóculo foram transferidos para o meio de cultura contido no fermentador.

3.5 Avaliação da promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico

3.5.1 Promoção de crescimento com *Trichoderma* sp.

Para a avaliação da capacidade de *Trichoderma* em promover o crescimento em plantas de alface foram aplicadas suspensões do fungo para atingir as concentrações de 10^7, 10^6, 10^5, 10^4 e 10^3 e 0 conídios/mL de *Trichoderma* nos tanques de solução nutritiva, após 24 horas da transferência das plantas do berçário para o sistema definitivo. As plantas utilizadas neste experimento permaneceram 12 dias na espuma fenólica, 24 dias no berçário e 11 dias no sistema definitivo (SFT) na qual, o *Trichoderma* foi aplicado. A avaliação das plantas foi realizada após 11 dias, determinando-se a massa fresca da parte aérea e do sistema radicular. Também foi determinada a massa seca do sistema radicular. O ensaio foi desenvolvido durante os meses de junho e julho de 2005.

Um segundo ensaio com *Trichoderma* foi realizado, tendo a metodologia sido à mesma descrita no ensaio anterior, somente com algumas mudanças no período em que as plantas permaneceram na espuma fenólica (22 dias), no berçário (20 dias) e 17 no sistema definitivo. A avaliação das plantas foi realizada após 17 dias, determinando-se a massa fresca e seca das plantas. Neste segundo ensaio, também foi realizada a monitoração da população de *Trichoderma* na solução nutritiva. Para tanto, amostras da solução nutritiva dos tanques foram diluídas em série (10^{-3}) e uma alíquota de 100ìL foi transferida para meio de Martin (1g de KH_2PO_4; 0,5g de $MgSO_4.7H_2O$; 5,0g de peptona; 10g de dextrose; 0,03g de rosa bengala; 16 g de ágar em 1000mL de água destilada e 0,03g de sulfato de estreptomicina adicionado após autoclavagem) contido em placas de Petri. As placas foram mantidas a $25^{O}C \pm 1°C$, no escuro. Transcorridas 24 horas foram contados os números de colônias por placa. O ensaio foi desenvolvido durante o período de julho e agosto de 2005.

Ainda um terceiro ensaio foi realizado com esse antagonista, tendo a mesma metodologia sido descrita anteriormente. Nesse ensaio, as plantas permaneceram na espuma fenólica por 17 dias, no berçário por 13 dias e 21 dias no sistema definitivo. O ensaio foi desenvolvido nos meses de agosto e setembro de 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas.

3.5.2 Promoção de crescimento com *Clonostachys rosea*

Na avaliação da capacidade de *C. rosea* em promover o crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, testaram-se as mesmas concentrações utilizadas para os ensaios com *Trichoderma*. As plantas permaneceram na espuma fenólica por 17 dias, no berçário por 13 dias e no sistema definitivo, sob telado, por 21 dias, quando foram determinadas as massas fresca e seca das plantas. A população de *Clonostachys* na solução nutritiva foi determinada de forma semelhante ao descrito para *Trichoderma*, sendo utilizado o meio de cultura PSTA (200g de batata, 15g de D-glucose, 12g de ágar, 1000mL de água destilada e 2mL de Triton XR 100 + 100mg de sulfato de estreptomicina adicionados após autoclavagem) e a incubação ocorreu por 72 horas, a $25^{O}C \pm 1°C$, sob luz constante. O ensaio foi desenvolvido nos meses de agosto e setembro de 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas.

3.5.3 Promoção de crescimento com *Bacillus subtilis*

Na solução nutritiva, foi adicionado o meio de cultura fermentado por *B. subtilis*, nas concentrações de 0%; 0,1%, 1% e 10%. Além desses tratamentos, foram estudados os efeitos das concentrações de 1% e 10% de meio de cultura nos tanques de solução nutritiva. O meio de cultura, fermentado ou não, foi acrescido na solução nutritiva após 24 horas da transferência das plantas para o sistema definitivo. As plantas permaneceram por 22 dias na espuma fenólica, 21 dias no berçário e 14 dias no sistema definitivo fora do telado, quando foram determinadas as massas fresca e seca das plantas. O ensaio foi desenvolvido nos meses de setembro e outubro de 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas.

3.5.4 Promoção de crescimento com *Paenibacillus lentimorbus*

Para se avaliar a promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, sob telado, com *P. lentimorbus*, utilizou-se a mesma metodologia descrita para o ensaio com *B. subtilis,* sendo realizado também no mesmo período.

3.5.5 Promoção de crescimento com *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae foi avaliado como agente promotor de crescimento, por meio da aplicação de 50, 100, 250, 500 e 1000 gramas do produto comercial fermento biológico Itaiquara/50L de solução nutritiva, correspondentes a $1x10^6$, $2x10^6$, $5x10^6$, $1x10^7$ e $2x10^7$ células/mL, respectivamente. O produto foi aplicado nos tanques após cinco dias da transferência das plantas para o sistema definitivo. As plantas permaneceram na espuma fenólica por 11 dias, no berçário por 22 dias e por 18 dias no sistema definitivo sob telado. O ensaio foi desenvolvido nos meses de setembro e

outubro de 2005. A avaliação foi realizada após 18 dias, determinando-se a massa fresca das plantas. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, onde cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas.

3.5.6 Promoção de crescimento com Polyversum®

O produto comercial Polyversum® (*Pythium oligandrum*) foi aplicado nos tanques de solução nutritiva nas concentrações de 12,5, 25 e 50g do produto/50L, após 24 horas de transferência das plantas para sistema definitivo sob telado. As plantas desenvolveram-se na espuma fenólica por 14 dias, no berçário por 20 dias. A avaliação foi realizada após as plantas permanecerem 14 dias, no sistema definitivo determinando-se as massas fresca e seca das plantas. O ensaio foi desenvolvido durante o período de outubro e novembro de 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas.

3.5.7 Promoção de crescimento com o produto comercial P.S.B Solan®

O produto comercial P.S.B Solan® foi testado como agente promotor de crescimento de plantas de alface por meio da adição de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 2g do produto/100L de solução nutritiva. A adição do produto foi realizada após cinco dias da transferência das plantas para sistema definitivo. As plantas permaneceram 11 dias na espuma fenólica, 22 dias no berçário e 19 dias no sistema definitivo fora do telado. A avaliação foi realizada após 19 dias determinando-se as massas fresca e seca das plantas. O ensaio foi desenvolvido nos meses de setembro e outubro de 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas.

3.5.8 Promoção de crescimento com fertilizante à base de fermentado de peixe

Avaliou-se o fermentado de pescado Fishfértil® como agente promotor de crescimento por meio da aplicação de 50, 100, 150 e 250mL do fermentado/100L de solução nutritiva, após 24 horas de transferência das plantas para sistema definitivo. O período de permanência das plantas na espuma fenólica foi de 14 dias e de 20 dias no berçário. A avaliação ocorreu após 14 dias de transferência para o sistema definitivo (SFT). O ensaio foi desenvolvido nos meses de outubro e novembro de 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas.

3.6 Avaliação do potencial de controle biológico de *Pythium aphanidermatum* em plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico

3.6.1 Potencial de *Clonostachys rosea* no controle da doença

Três ensaios foram instalados para avaliar o potencial de *C. rosea* no controle de *P. aphanidermatum* em alface. No primeiro, o agente de biocontrole foi aplicado: 1) três dias antes e no momento da inoculação com o patógeno e 2) três dias antes, no momento e três dias após a infestação com o fitopatógeno. Os demais tratamentos foram: *Clonostachys* sem a infestação com o patógeno e testemunha com e sem infestação. A concentração de *C. rosea* utilizada na infestação dos tanques de solução nutritiva foi de 10^6 conídios/mL. Realizou-se a infestação com o isolado CCMA 242, que foi produzido conforme metodologia descrita na técnica 1 de produção de inóculo de *P. aphanidermatum*, por meio da introdução, na solução nutritiva, de um sachê de tela de náilon com cinco placas de meio de cultura V8 com o patógeno em pleno desenvolvimento.

Transcorrido o período de três dias, as culturas foram retiradas dos tanques. As plantas permaneceram na espuma fenólica por sete dias, no berçário por 17 dias e 21 dias no sistema definitivo, sob e fora do telado. Além da avaliação das massas das plantas, foram realizadas recuperações de *P. aphanidermatum* e *C. rosea* das raízes da alface. A recuperação do patógeno das raízes foi realizada por meio do plaqueamento de 10 fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento das raízes, em meio de cultura ágar-água, acrescido de ampicilina (250mg/L) e rifampicina (10mg/L). A incidência do patógeno na raiz foi determinada após quatro dias de incubação, a 25°C ± 1°C, sob regime de luz constante.

Utilizou-se a mesma metodologia descrita na recuperação de *P. aphanidermatum* para a recuperação de *Clonostachys* nas raízes. No entanto, utilizou-se o meio de cultura PAM (200mg de cloranfenicol, 0,1mL de paraquat e 16g de ágar, em 1000mL). O experimento foi instalado nos meses de fevereiro e março 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 12 plantas.

No segundo ensaio, *C. rosea* foi introduzido nos tanques da solução nutritiva: 1) dois dias antes da infestação com o patógeno (-2), 2) no momento em que o patógeno foi aplicado (0), e 3) dois dias antes, no momento e três dias após o patógeno ser aplicado (-2, 0 e +3). Como tratamentos adicionais, foram estudados: testemunha com e sem a inoculação com o fitopatógeno e plantas desenvolvidas em solução nutritiva com *C. rosea* sem o fitopatógeno. Utilizou-se a mesma concentração de *C. rosea* do ensaio anterior. A produção de inóculo de *Pythium* foi realizada pela técnica 2, descrita no item produção de microrganismos. A inoculação foi realizada com o CCMA 242, na metade das plantas, isto é, 10 plantas, por meio da deposição de raízes das plantas em uma suspensão de micélio + zoósporos, por 20 horas. Para a inoculação das plantas, o

líquido das placas de Petri composto por uma suspensão de zoósporos ($1x10^4$ zoósporos/mL) foi recolhido em um bécker, e o meio de cultura com crescimento micelial contido nas placas foi agitado em mix por 30 segundos. Utilizaram-se 20 placas com crescimento micelial para 800mL de água destilada. A inoculação foi realizada adicionando-se 100mL da suspensão de zoósporos + 100mL da suspensão de micélio + 100mL de uma solução nutritiva com condutividade elétrica de 0,7 mS em uma bandeja na qual as plantas foram acondicionadas, de modo que a suspensão cobriu todo o sistema radicular. Na outra metade das plantas, a inoculação foi natural, isto é, com o inóculo fornecido pelas plantas inoculadas artificialmente.

As plantas permaneceram em espuma fenólica por 7 dias, no berçário por 22 dias e 33 dias no sistema definitivo, sob e fora do telado. O ensaio foi instalado nos meses de março e abril de 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 26 plantas.

No terceiro ensaio, *C. rosea* foi aplicado nos tanques da solução nutritiva da seguinte forma: 1) dois dias antes e no momento da inoculação, na concentração de 10^5 conídios/mL, 2) dois dias antes e no momento da inoculação (-2 e 0), na concentração de 10^6 conídios/mL, 3) dois dias antes, no momento e três dias após a inoculação, na concentração de 10^5 conídios/mL e 4) dois dias antes, no momento e três dias após a inoculação (-2, 0 e +3), na concentração de 10^6 conídios/mL. Como tratamentos adicionais foram estudados testemunha com ou sem inoculação com o fitopatógeno. Procedeu-se a inoculação de todas as plantas conforme técnica descrita no ensaio anterior, em que as raízes das plantas permaneceram por 15 horas submersas na suspensão de micélio + zoósporos do isolado (CCMA 242). A permanência das plantas na espuma fenólica foi de 26 dias, no berçário de nove dias e 26 dias no sistema definitivo, sob e fora do telado. O ensaio foi instalado nos meses de junho e julho de 2005.

O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 30 plantas.

3.6.2 Potencial de *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e Polyversum® no controle da doença

Considerando-se os dados dos testes com promoção de crescimento foram utilizadas as seguintes concentrações dos agentes de biocontrole: *C. rosea* e *Trichoderma* (10^6 conídios/mL), *S. cerevisiae* (25 g do fermento biológico Itaiquara, correspondente à $5x10^5$ células/mL) e Polyversum® (12,5g/50L de solução nutritiva) adicionados nos tanques de solução nutritiva dois dias antes e quatro dias após a inoculação de *P. aphanidermtatum* (isolado SPC 1973) na metade das plantas, sendo considerada inoculação artificial. Na outra metade das plantas, a inoculação foi natural, isto é, com o inóculo fornecido pelas plantas inoculadas artificialmente. A inoculação foi realizada mantendo-se as raízes das plantas imersas em suspensão de zoósporos ($1x10^4$/mL) do isolado SPC 1973 por 30 minutos. A produção do inóculo do patógeno foi descrita na técnica 3 do item 3.4. As plantas utilizadas neste experimento permaneceram 10 dias em espuma fenólica, 19 dias no berçário e 19 dias no sistema definitivo sob telado. O experimento foi instalado no período de novembro a dezembro de 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas.

3.6.3 Potencial de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus*, P.S.B e fermentado de peixe no controle da doença

Avaliaram-se, para o controle biológico da podridão de raiz, os seguintes tratamentos: 1) meio de cultura fermentado por *B. subtilis* (1L/100L de solução nutritiva), 2) meio de cultura fermentado por *P. lentimorbus* (1L/100L de

solução nutritva), 3) 2g de P.S.B®/100L de solução nutritiva e 4) 15 mL do fermentado de peixe Fishfértil®/100L de solução nutritiva. Os produtos foram introduzidos dois dias antes (-2) e quatro dias após (+4) a inoculação com o patógeno (isolado SPC 1973) na metade das plantas conforme ensaio anterior. As plantas utilizadas neste experimento permaneceram 10 dias em espuma fenólica, 19 dias no berçário e 19 dias no sistema definitivo fora do telado. O experimento foi instalado no período de novembro e dezembro, de 2005. O delineamento experimental foi arranjado em dois blocos casualizados com seis tratamentos, em que cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas.

3.7 Análise estatística

Os testes F, variância e Tukey, com probabilidade de 5%, foram realizados utilizando-se o Programa Estatístico SAS.

4 RESULTADOS

4.1 Promoção de crescimento

4.1.1 Promoção de crescimento com *Trichoderma* sp.

No primeiro ensaio, o *Trichoderma*, nas concentrações estudadas, não promoveu o crescimento das plantas (Figuras 4 e 5). No entanto, na concentração de 10^7 conídios/mL, o desenvolvimento das plantas foi comprometido (Figuras 4 e 5). O maior valor de massa fresca e seca do sistema radicular desse tratamento foi devido à densa biomassa de *Trichoderma* aderida nas raízes (Figura 6).

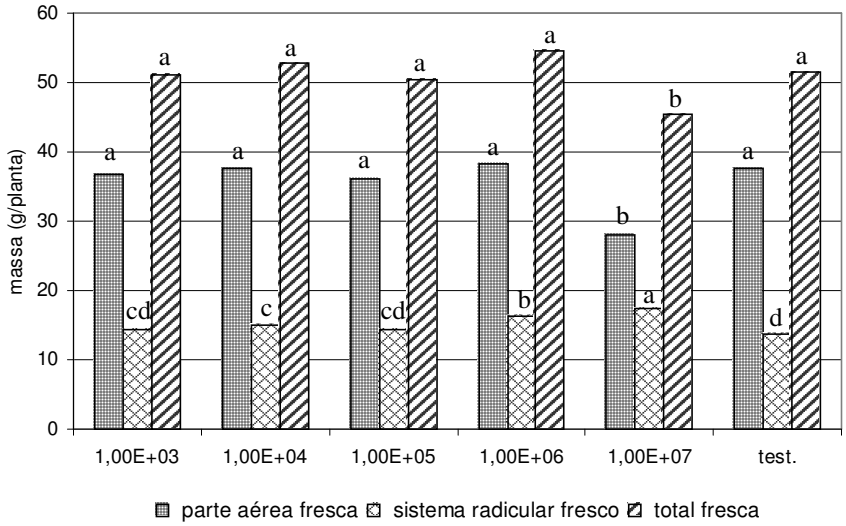

FIGURA 4. Massa da parte aérea, radicular e total fresca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico após tratamento com *Trichoderma* sp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

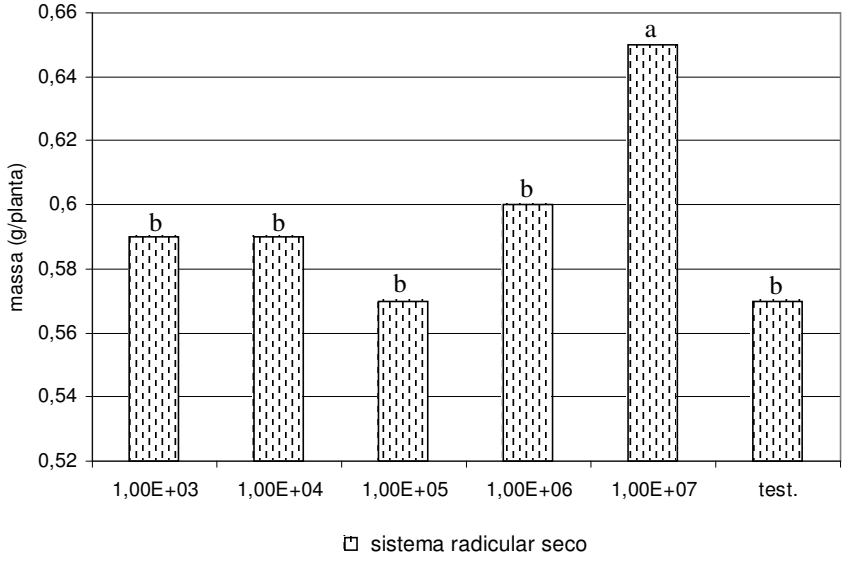

FIGURA 5. Massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico após tratamento com *Trichoderma* sp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

FIGURA 6. Plantas de alface tratadas com diferentes concentrações de *Trichoderma* (A e B). A. 1 = 10^7conídios/mL; 2 = 10^6conídios/mL; 3 = 10^5conídios/mL; 4 = 10^4conídios/mL; 5 = 10^3conídios/mL e 6 = testemunha. B. Sistema radicular de alface tratada com 10^7conídios/mL de *Trichoderma*. C. Colônias de *Trichoderma* em meio de Martin.

Nas Figuras 7 e 8 verifica-se que o isolado de *Trichoderma* sp., de forma semelhante ao ensaio anterior, não promoveu o crescimento das plantas. As massas foram superiores ao primeiro ensaio, pois, as plantas permaneceram quase o dobro do tempo no sistema definitivo. A população de *Trichoderma* na solução nutritiva do ensaio 2 foi reduzida em aproximadamente mil vezes, após seis dias de sua aplicação nos tanques (Tabela 2), mantendo a tendência de redução também após 13 dias.

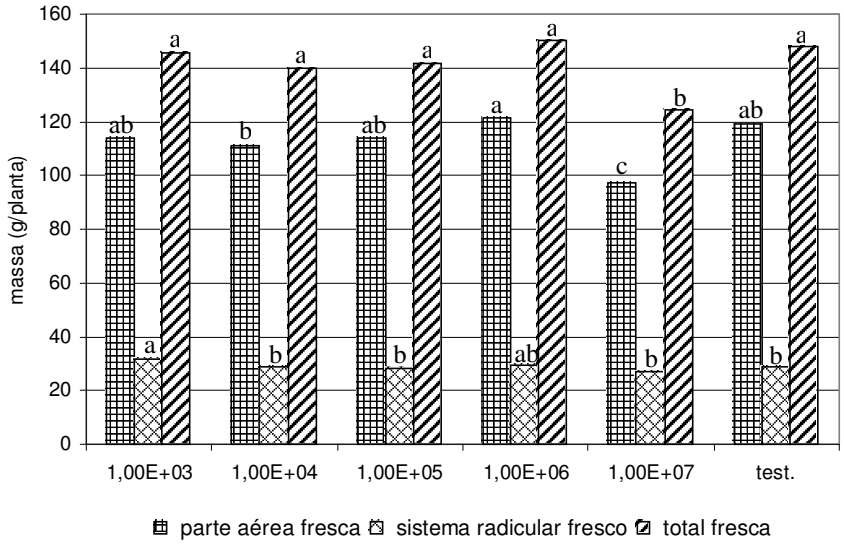

FIGURA 7. Massa da parte aérea, radicular e total fresca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico após tratamento com *Trichoderma* sp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

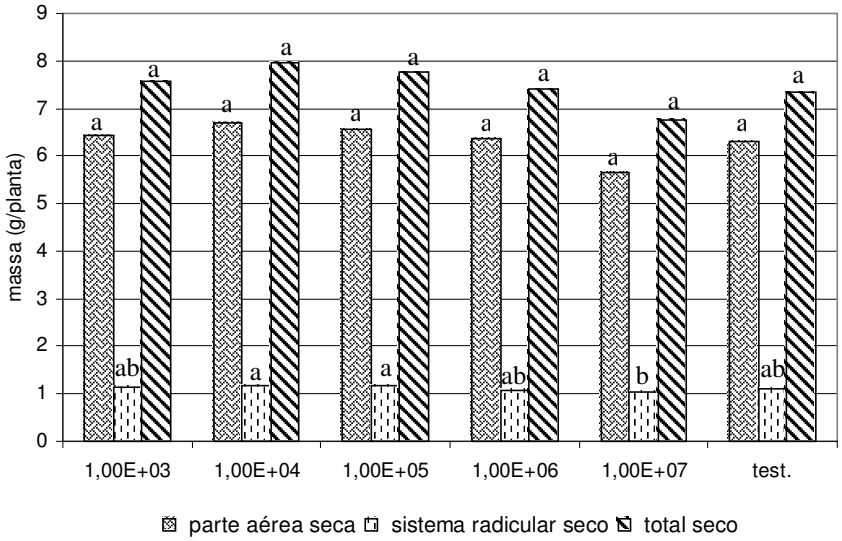

FIGURA 8. Massa da parte aérea, radicular e total seca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico após tratamento com *Trichoderma* sp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

TABELA 2. População de *Trichoderma* na solução nutritiva, no período de seis e treze dias após infestação com o agente de biocontrole.

Tratamento	**Primeira avaliação ufc/mL (+6 dias)**	**Segunda avaliação ufc/mL (+ 13 dias)**
Testemunha	0 *	0
Trichoderma 10^3 conídios/mL	5	0
Trichoderma 10^4 conídios/mL	51	0
Trichoderma 10^5 conídios/mL	$5{,}65 \times 10^2$	10,33
Trichoderma 10^6 conídios/mL	$4{,}8 \times 10^3$	30
Trichoderma 10^7 conídios/mL	8×10^4	$3{,}6 \times 10^3$

* dados são médias de quatro repetições em unidades formadoras de colônia/mL (ufc/mL)

Os resultados do terceiro ensaio com o isolado de *Trichoderma* sp. comportaram-se de forma semelhante aos ensaios anteriores, não ocorrendo a promoção de crescimento das plantas (Figuras 9 e 10) e ocorrendo efeito prejudicial de diminuição da massa das plantas submetidas à concentração 10^7 conídios/mL de *Trichoderma*.

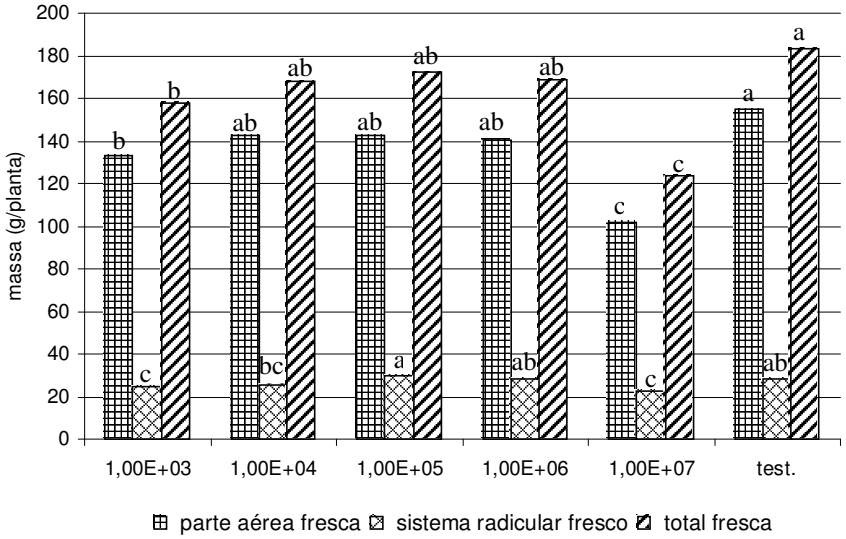

FIGURA 9. Massa da parte aérea, radicular e total fresca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico após tratamento com *Trichoderma* sp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

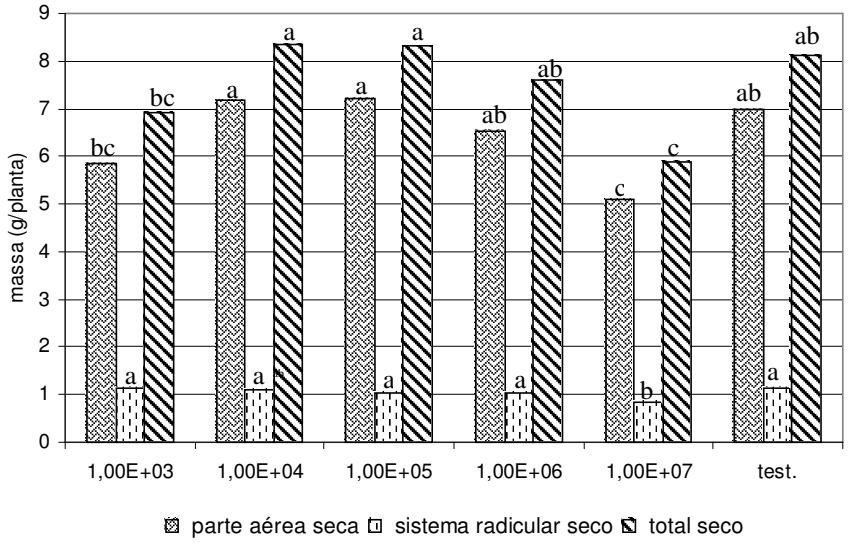

FIGURA 10. Massa da parte aérea, radicular e total seca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, após tratamento com *Trichoderma* sp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

4.2.1 Promoção de crescimento com *Clonostachys rosea*

A aplicação de *Clonostachys*, em todas as concentrações testadas, não promoveu o crescimento das plantas de alface, mas também não inibiu o seu crescimento (Figuras 11 e 12). A população de *C. rosea* na solução nutritiva reduziu acentuadamente após quatro dias de sua aplicação nos tanques. Entretanto, ocorreu a visualização de seu crescimento no sistema radicular das plantas. Após 19 dias, não foi recuperado *Clonostachys* da solução nutritiva (Tabela 3).

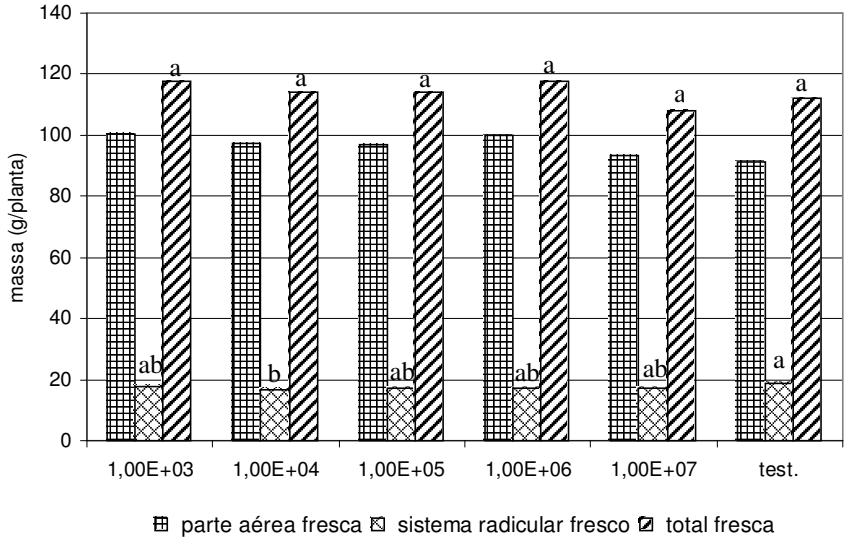

FIGURA 11. Massa da parte aérea, radicular e total fresca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, após tratamento com *Clonostachys rosea*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%. Dados sem letra não foram significativos no teste F.

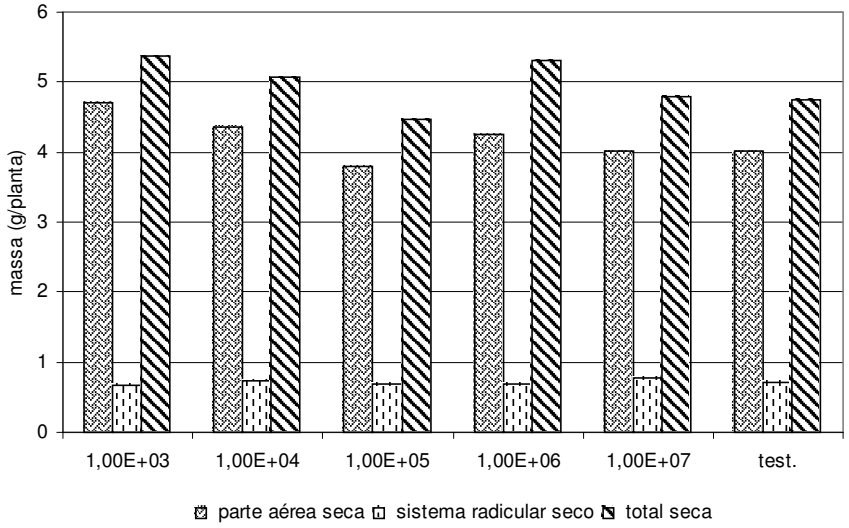

FIGURA 12. Massa da parte aérea, radicular e total seca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, após tratamento com *Clonostachys rosea*. Dados não significativos, pelo teste F.

TABELA 3. População de *Clonostachys rosea* na solução nutritiva, no período de quatro e 19 dias após infestação com o agente de biocontrole.

Tratamento	**Primeira avaliação ufc/mL (+4 dias)**	**Segunda avaliação ufc/mL (+ 19 dias)**
Testemunha	0 *	0
Clonostachys rosea 10^3 conídios/mL	0	0
Clonostachys rosea 10^4 conídios/mL	11,5	0
Clonostachys rosea 10^5 conídios/mL	10	0
Clonostachys rosea 10^6 conídios/mL	51,5	0
Clonostachys rosea 10^7 conídios/mL	2,65 x 10^2	0

* dados são médias de quatro repetições expressas em unidades formadoras de colônia/mL

4.1.3 Promoção de crescimento com *Bacillus subtilis*

A aplicação, do meio fermentado por *B. subtilis* ou não, na concentração de 10%, reduziu significativamente o desenvolvimento das plantas (Figuras 13 e 14). Por outro lado, o meio fermentado com *B. subtilis* nas menores concentrações estimulou o desenvolvimento das plantas (Figuras 13 e 14).

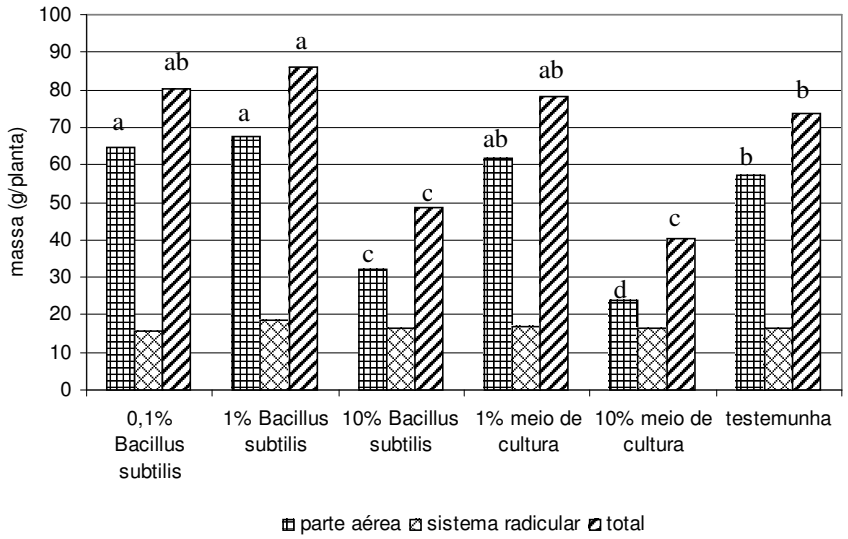

FIGURA 13. Massa da parte aérea, radicular e total fresca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, após tratamento com *Bacillus subtilis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%. Dados sem letra não foram significativos no teste F.

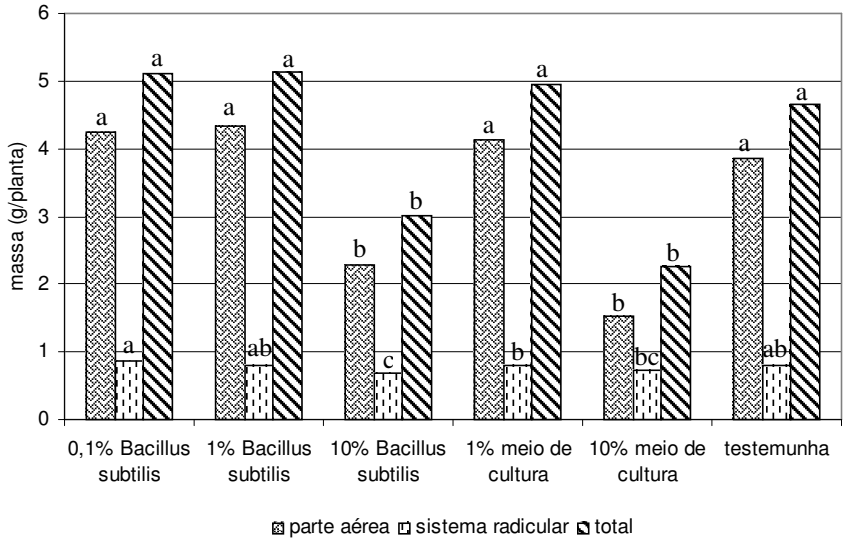

FIGURA 14. Massa da parte aérea, radicular e total seca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, após tratamento com *Bacillus subtilis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

4.1.4 Promoção de crescimento com *Paenibacillus lentimorbus*

A aplicação do meio de cultura na concentração de 10% causou fitotoxicidade nas plantas, diminuindo o seu desenvolvimento (Figuras 15 e 16). Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente da testemunha em relação às massas da parte aérea, radicular e total fresca e seca (Figuras 15 e 16).

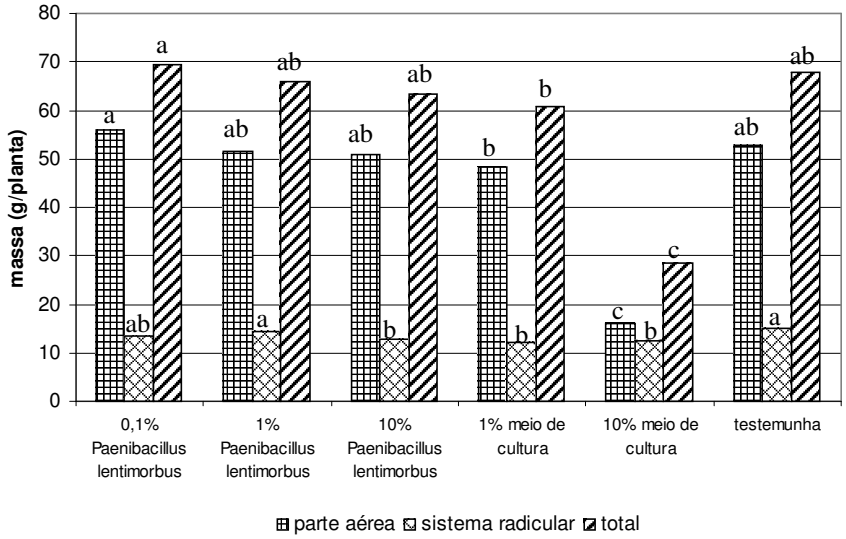

FIGURA 15. Massa da parte aérea, radicular e total fresca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, após tratamento com *Paenibacillus lentimorbus*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

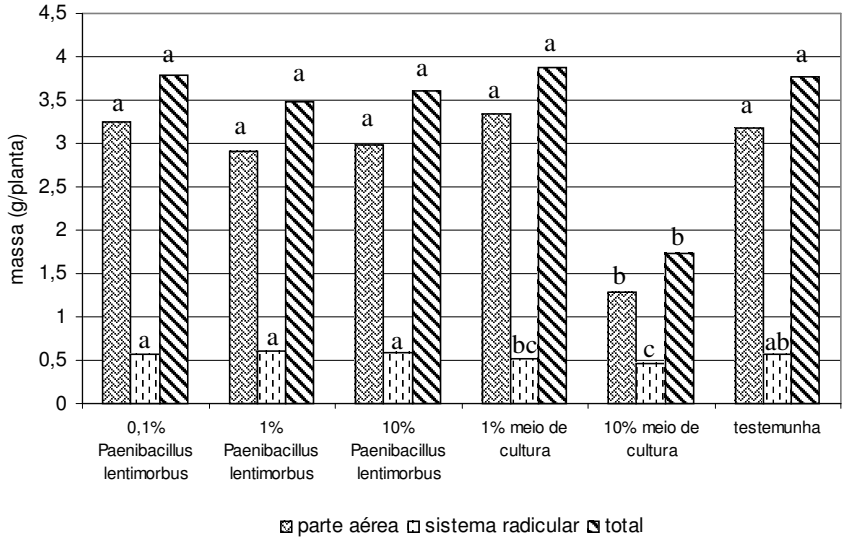

FIGURA 16. Massa da parte aérea, radicular e total seca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, após tratamento com *Paenibacillus lentimorbus*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

4.1.5 Promoção de crescimento com *Saccharomyces cerevisiae*

A aplicação de 1.000, 500 e 250g/50L de fermento biológico Itaiquara à base de *S. cerevisiae* reduziu acentuadamente o desenvolvimento das plantas de alface (Figuras 17 e 18). Por outro lado, nas concentrações de 100 e 50g/50 L, o desenvolvimento foi semelhante ao da testemunha (Figuras 17 e 18).

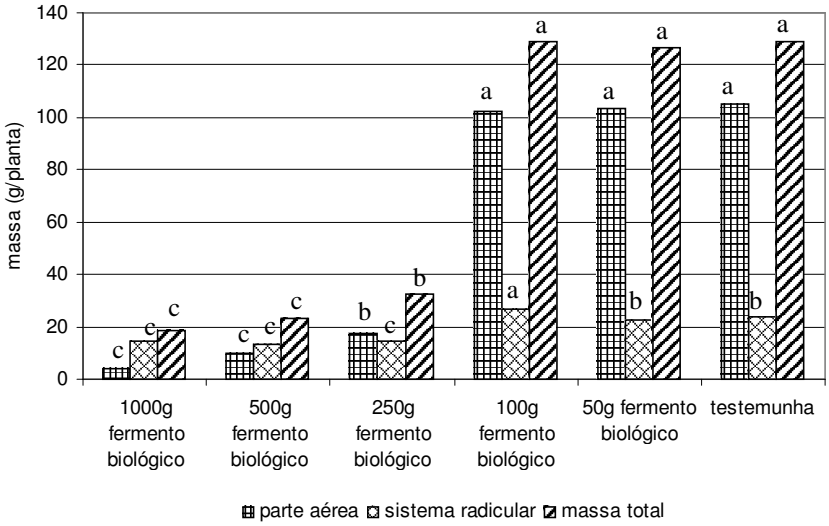

FIGURA 17. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae*, fornecido pelo fermento biológico Itaiquara, na massa fresca do sistema aéreo, radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

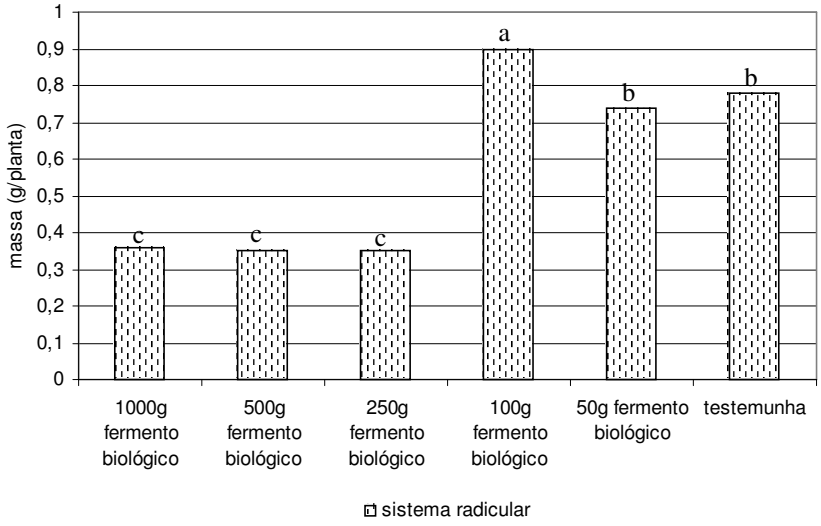

FIGURA 18. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae*, fornecido pelo fermento biológico Itaiquara, na massa na massa seca do sistema radicular e plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

4.1.6 Promoção de crescimento com Polyversum®

A aplicação do produto Polyversum®, formulado à base de *P. oligandrum*, não apresentou efeito em promover o crescimento de alface nas concentrações testadas, quando analisada a massa da parte aérea e total. Entretanto, na concentração de 50g/50L de solução nutritiva foi verificado incremento no sistema radicular das plantas, diferindo estatisticamente de todos os tratamentos (Figuras 19 e 20).

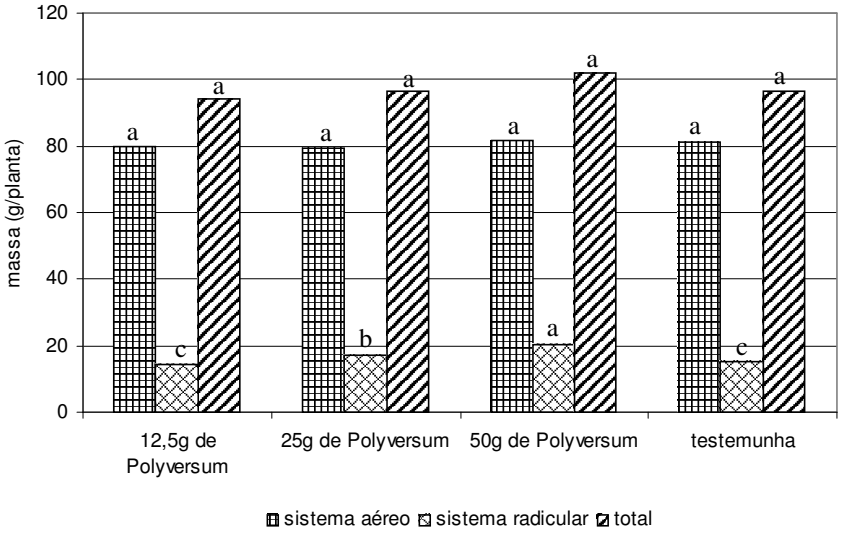

FIGURA 19. Efeito de Polyversum®, formulado à base de *P. oligandrum*, na massa fresca do sistema aéreo, radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

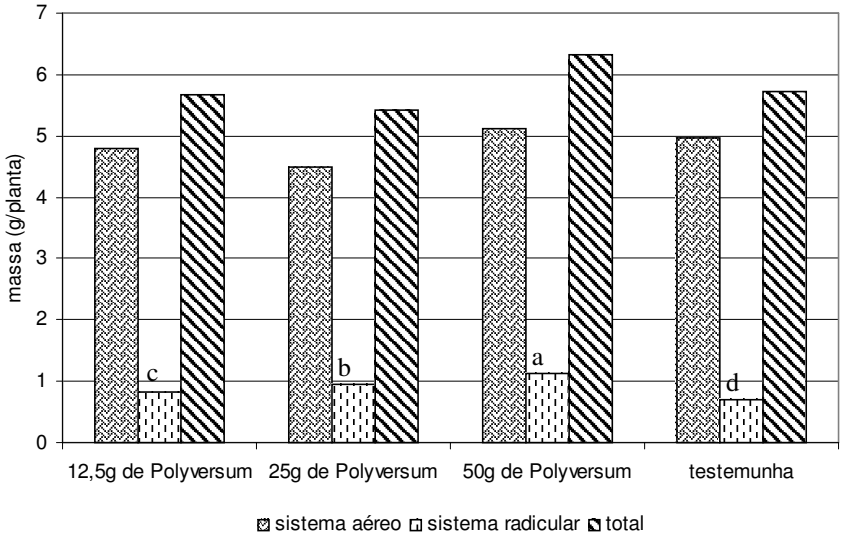

FIGURA 20. Efeito de Polyversum®, formulado à base de *P. oligandrum*, na massa seca do sistema radicular e plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

4.1.7 Promoção de crescimento com P.S.B Solan

A massa das plantas não foi incrementada com a aplicação do produto, tendo a aplicação de 1 e 2g causado um efeito negativo nas plantas (Figuras 21 e 22).

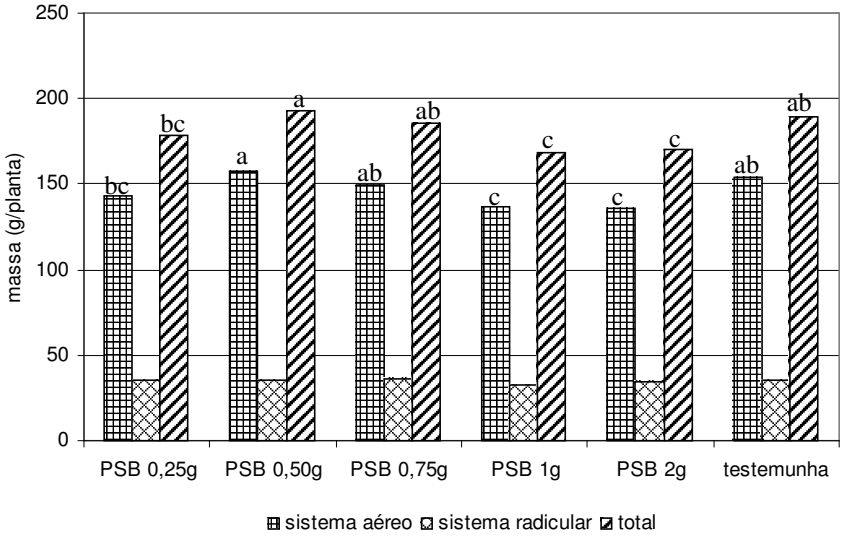

FIGURA 21. Efeito de PSB® na massa fresca do sistema aéreo, radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%. Dados sem letra não foram significativos no teste F.

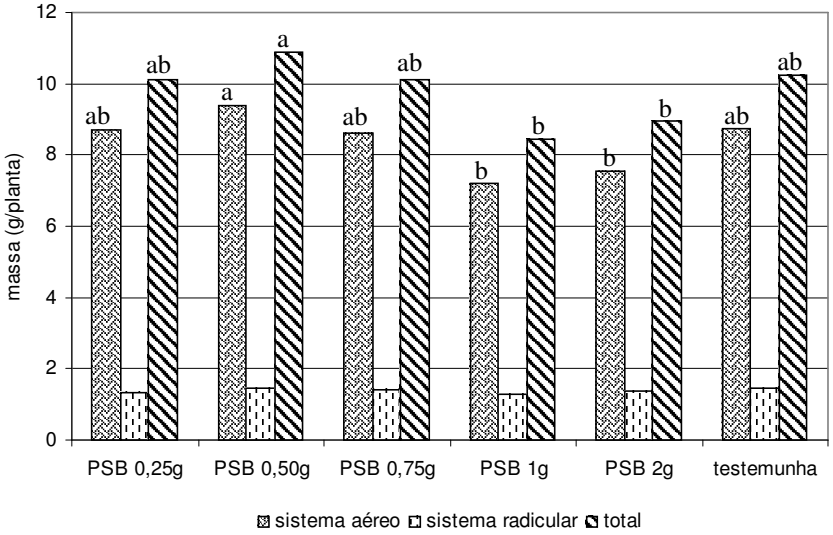

FIGURA 22. Efeito de PSB® na massa seca do sistema radicular e plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.Dados em letra não diferiram estatisticamente no teste F.

4.1.8 Promoção de crescimento com fertilizante à base de fermentado de peixe

O fermentado de peixe nas concentrações de 250, 150 e 100mL/100L de solução nutritiva reduziu acentuadamente o desenvolvimento das plantas de alface (Figuras 23, 24 e 25). Por outro lado, na concentração de 50mL/100L, não diferiu da testemunha (Figuras 23 e 24).

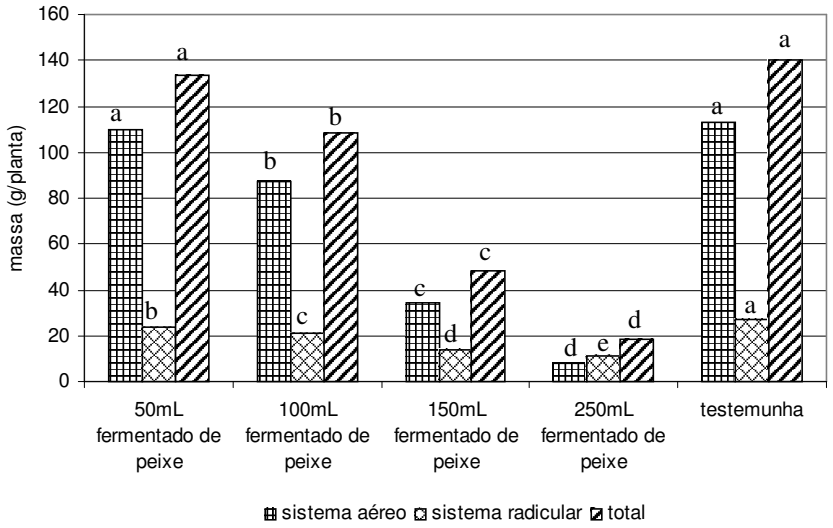

FIGURA 23. Efeito de fermentado de peixe (Fishfértil®) na massa fresca do sistema aéreo, radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

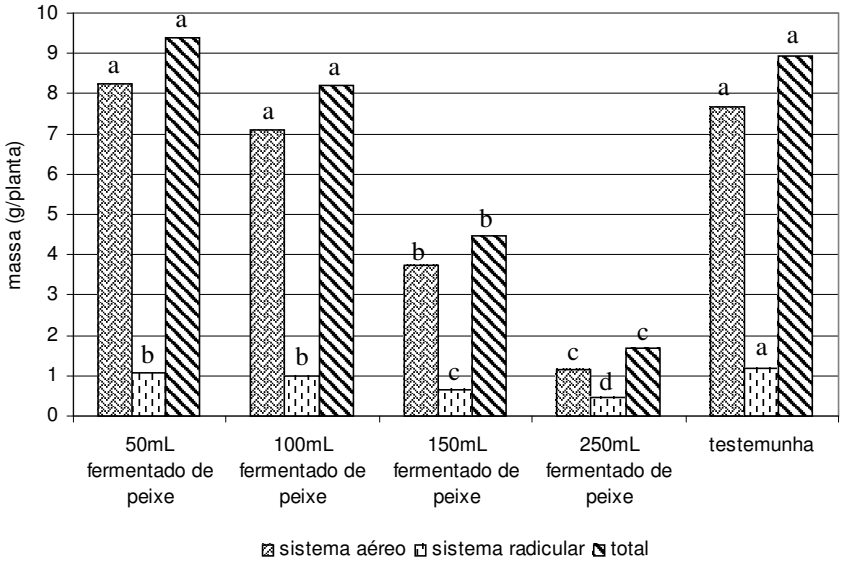

FIGURA 24. Efeito de fermentado de peixe (Fishfértil®) na massa seca do sistema aéreo, radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

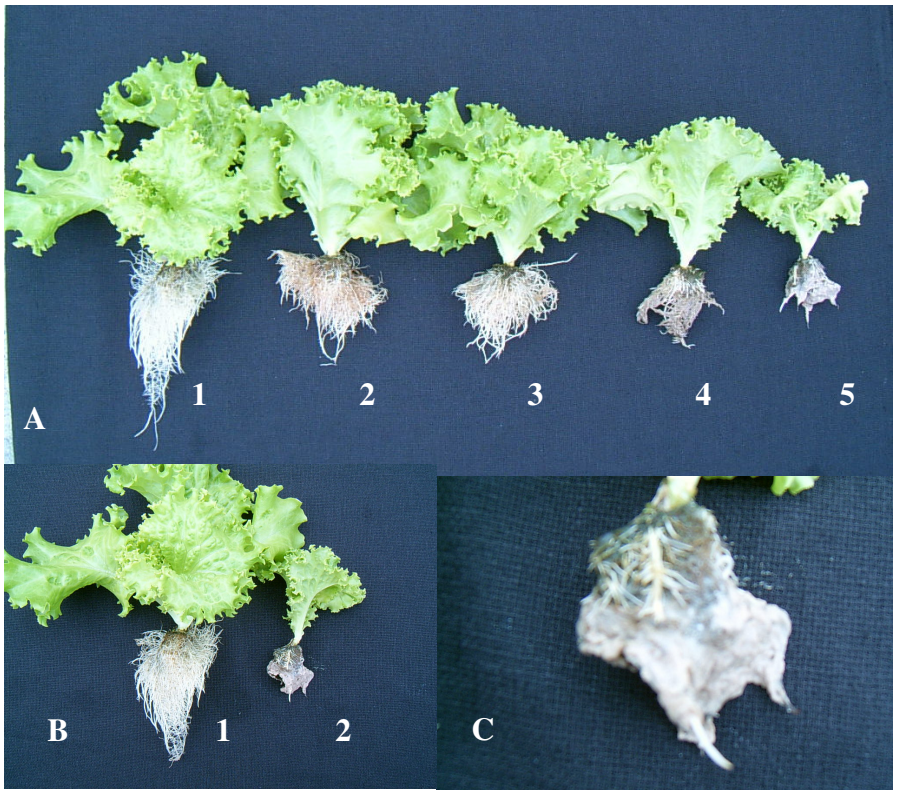

FIGURA 25. Plantas de alface tratadas com diferentes concentrações de fermentado de peixe (A, B e C). A. 1 = testemunha, 2 = 50mL, 3 = 100mL, 4 = 150mL e 5 = 250mL/100L. B. 1. testemunha e 2. 250mL/100L. C. 250mL/100L de fermentado de peixe.

4.2 Controle biológico de *Pythium aphanidermatum*

4.2.1 Controle biológico de *Pythium aphanidermatum* com *Clonostachys rosea*

No primeiro ensaio, em relação à testemunha inoculada, a aplicação de *Clonostachys* incrementou significativamente as massas seca e fresca das plantas (Figuras 26 e 27), não ocorrendo diferença entre os períodos e números de introdução do agente de biocontrole.

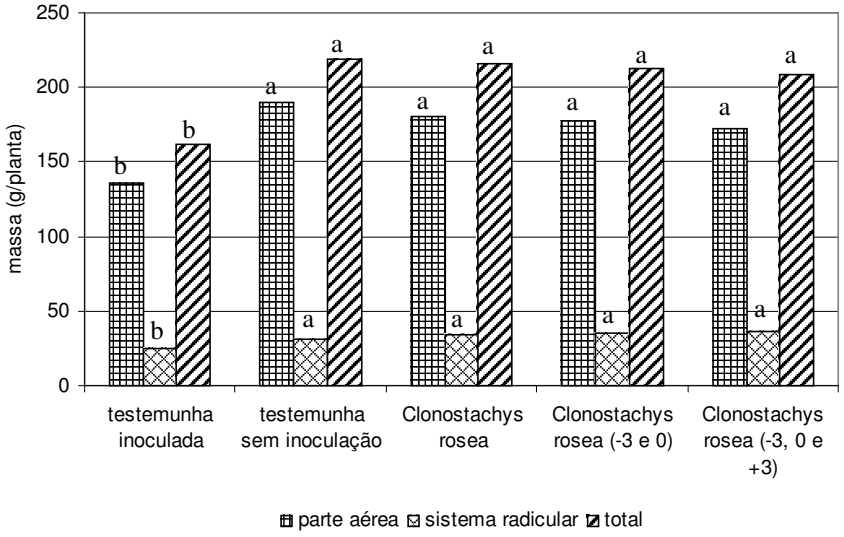

FIGURA 26. Massa fresca da parte aérea, do sistema radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, sob e fora do telado, inoculadas com *Pythium aphanidermatum* e tratadas com *Clonostachys rosea*, em diferentes períodos de aplicação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

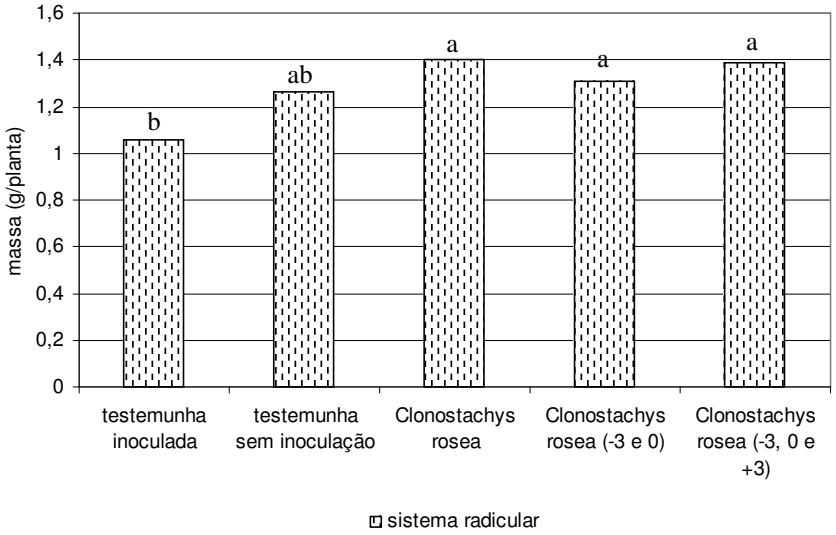

FIGURA 27. Massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, sob e fora do telado, inoculadas com *Pythium aphanidermatum* e tratadas com *Clonostachys rosea* em diferentes períodos de aplicação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

A porcentagem de recuperação de *Pythium* das raízes das plantas de alface foi maior no tratamento testemunha inoculada, tendo ocorrido em 77% das plantas avaliadas. Recuperou-se *Clonostachys* em todos os tratamentos em que foi utilizado (Tabela 4).

A recuperação do patógeno foi de 55% no tratamento *Clonostachys* aplicado três dias antes e no momento da inoculação com *Pythium*, e de 44% no tratamento em que o agente de controle biológico foi aplicado três dias antes, no momento e três dias após a inoculação (Tabela 4).

TABELA 4. Porcentagem de recuperação de *Pythium aphanidermatum* e *Clonostachys rosea* das raízes das plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico.

Tratamentos	Porcentagem de recuperação de *Pythium*	Porcentagem de recuperação de *Clonostachys*
Testemunha inoculada	77%	0
Testemunha sem inoculação	0	0
C. rosea	0	100%
C. rosea (–3 e 0d)	55%	89%
C. rosea (–3, 0 e +3d)	44%	100%

* dados são médias de cinco repetições

No segundo ensaio, com as plantas cultivadas em sistema hidropônico sob e fora do telado, o *C. rosea* não apresentou efeito no controle do patógeno quando introduzido no momento da inoculação de *P. aphanidermatum*. Entretanto, apresentou efeito negativo quando foi introduzido (1) dois dias antes e (2) dois dias antes, no momento e três dias após inoculação do patógeno (Figuras 28 e 29). É interessante observar que o tratamento apenas com *C. rosea* sem o patógeno foi superior a todos os demais tratamentos, porém, sem diferença estatística.

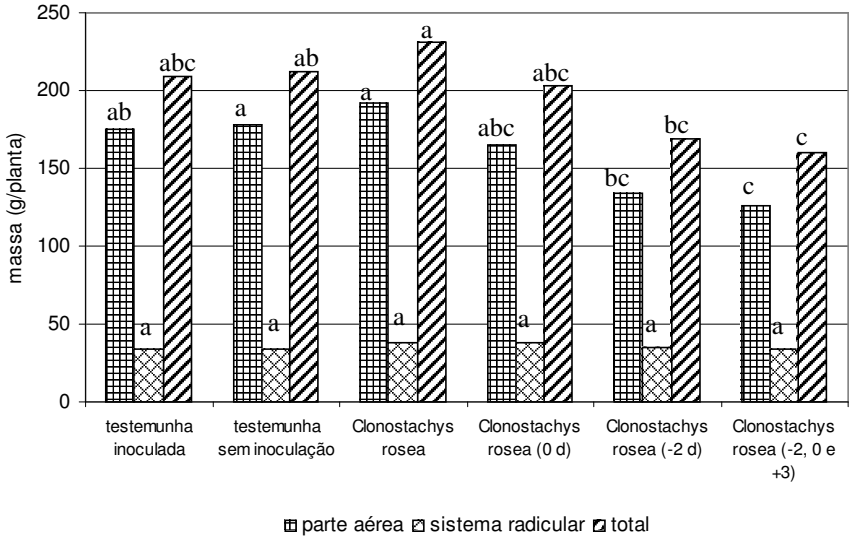

FIGURA 28. Massa fresca da parte aérea, do sistema radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, sob e fora do telado, inoculadas artificialmente com *Pythium aphanidermatum* e tratadas com *Clonostachys rosea* em diferentes períodos de aplicação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

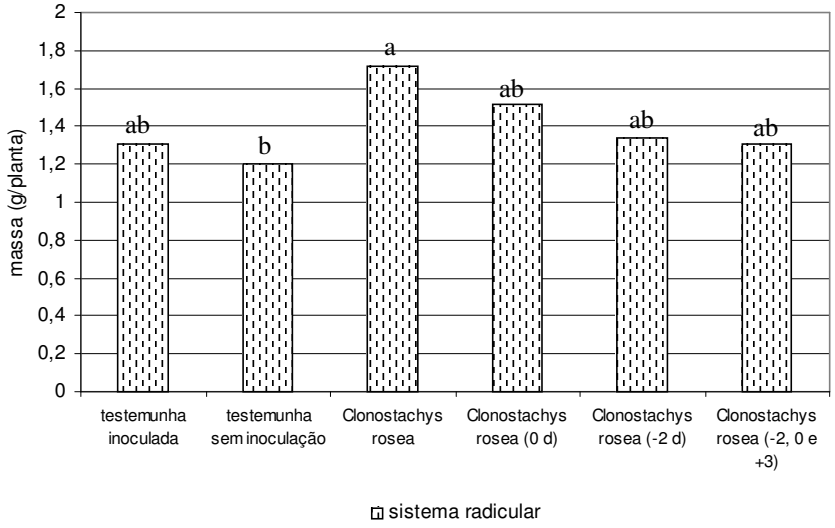

FIGURA 29. Massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, sob e fora do telado, inoculadas artificialmente com *Pythium aphanidermatum* e tratadas com *Clonostachys rosea* em diferentes períodos de aplicação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

Não se verificou diferença estatística entre os tratamentos em todas as características avaliadas para as plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico e inoculadas naturalmente com *Pythium*, mantidas no sistema definitivo com e sem telado (Figuras 30 e 31).

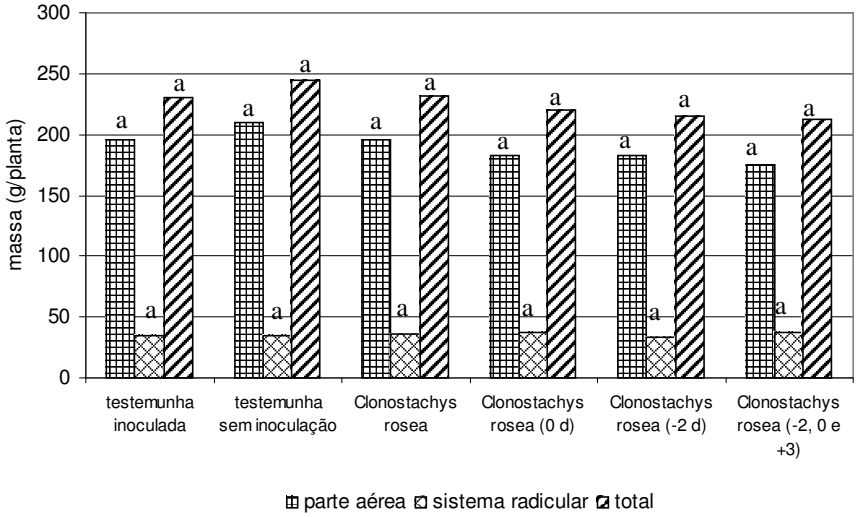

FIGURA 30. Massa fresca da parte aérea, do sistema radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, sob e fora do telado, inoculadas naturalmente com *Pythium aphanidermatum* e tratadas com *Clonostachys rosea* em diferentes períodos de aplicação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

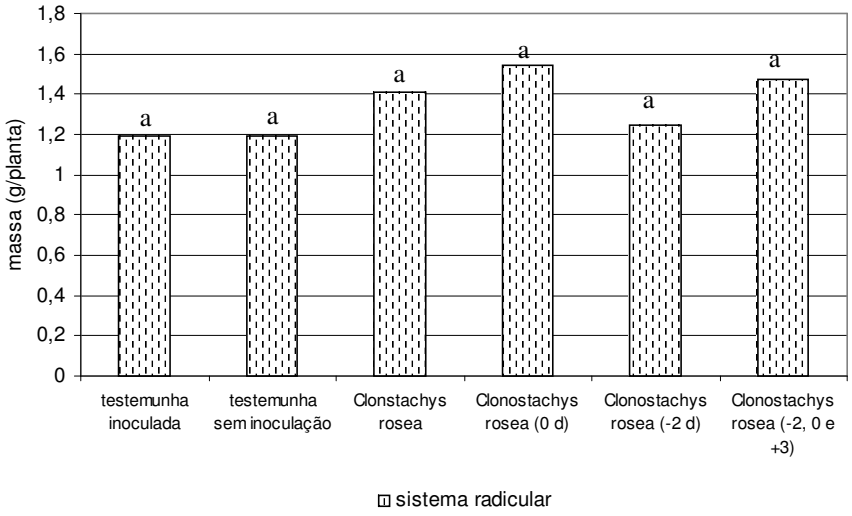

FIGURA 31. Massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, sob e fora do telado, inoculadas naturalmente com *Pythium aphanidermatum* e tratadas com *Clonostachys rosea* em diferentes períodos de aplicação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

No terceiro ensaio, apesar de não ocorrerem diferenças estatisticamente significativas, o efeito de *C. rosea* foi negativo sob o desenvolvimento das plantas de alface (Figuras 32 e 33). O efeito de *P. aphanidermatum* pode ser observado nos dados de massa fresca da parte aérea e total.

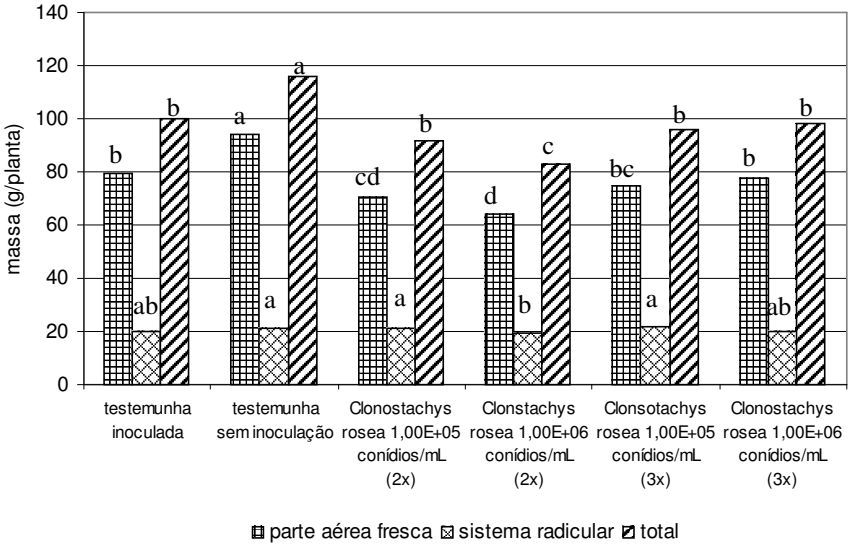

FIGURA 32. Massa fresca da parte aérea, sistema radicular e total de alface cultivadas em sistema hidropônico, sob e fora do telado, inoculadas com *Pythium aphanidermatum* e tratadas com diferentes concentrações de *Clonostachys rosea* em diferentes períodos de aplicação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

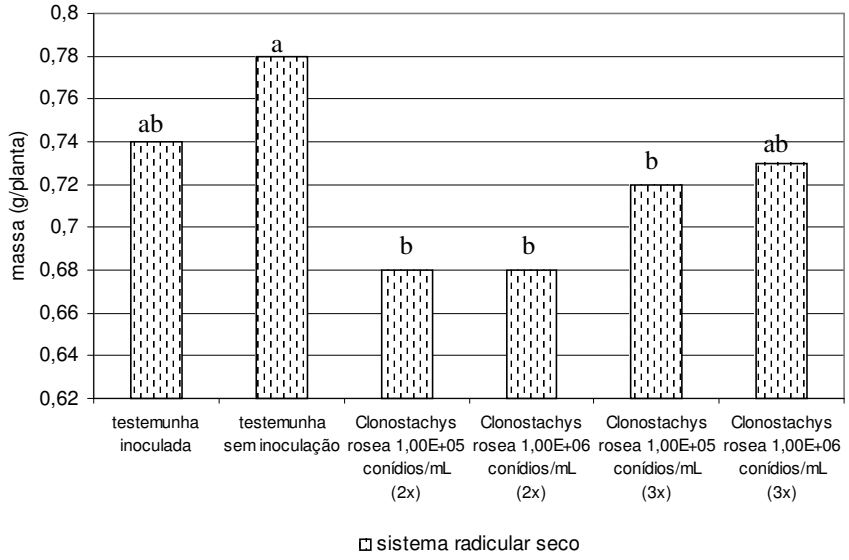

FIGURA 33. Massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivada em sistema hidropônico sob e fora do telado, inoculadas com *Pythium aphanidermatum* e tratadas com diferentes concentrações de *Clonostachys rosea* em diferentes períodos de aplicação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

4.2.2 Potencial de *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e Polyversum® no controle da podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum*.

Tanto nas plantas inoculadas artificialmente quanto naturalmente, a testemunha inoculada foi sempre superior à não inoculada (Figuras 34, 35, 36 e 37). Apesar de não ocorrer diferença estatística entre os tratamentos, as plantas inoculadas artificialmente e tratadas com Polyversum® e *Trichoderma*

apresentaram desenvolvimento maior que as dos demais tratamentos nas plantas inoculadas artificialmente (Figuras 34 e 35) e apenas Polyversum® nas inoculadas naturalmente (Figuras 36 e 37).

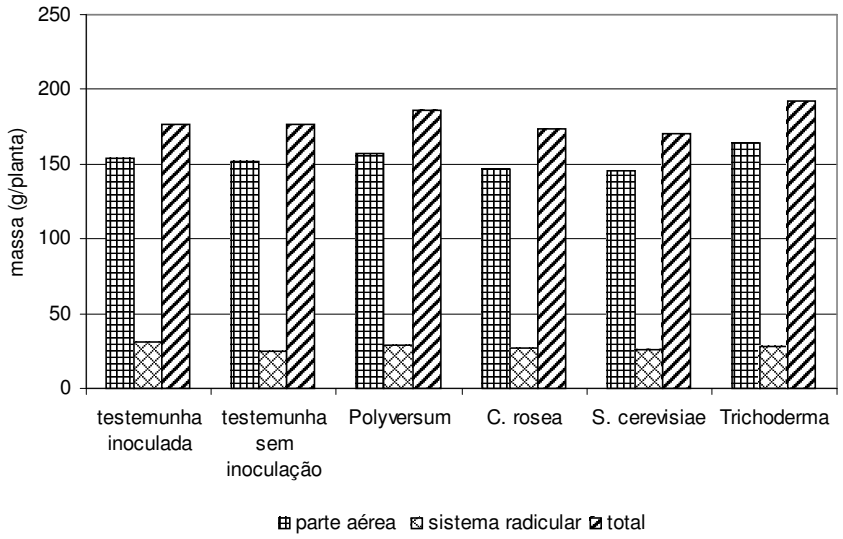

FIGURA 34. Efeito de agentes de controle biológico na massa fresca da parte aérea, sistema radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico inoculadas artificialmente com *Pythium aphanidermatum*. Dados não foram significativos no teste F.

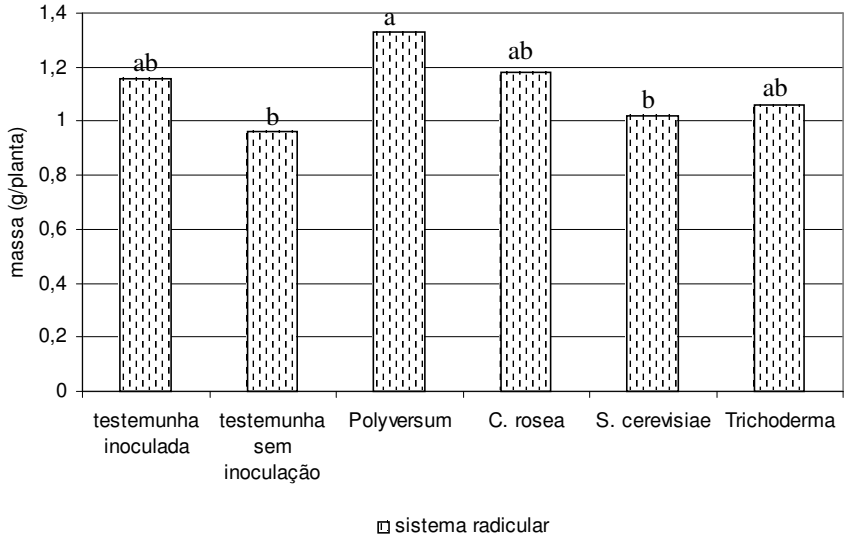

FIGURA 35. Efeito de agentes de controle biológico na massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico inoculadas artificialmente com *Pythium aphanidermatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

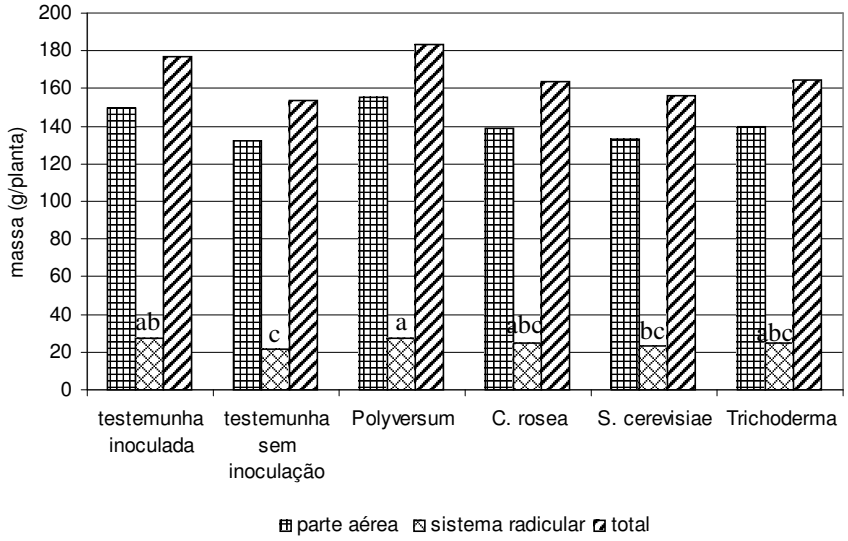

FIGURA 36. Efeito de agentes de controle biológico na massa fresca da parte aérea, sistema radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico inoculadas naturalmente com *Pythium aphanidermatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%. Dados sem letras não diferiram no teste F.

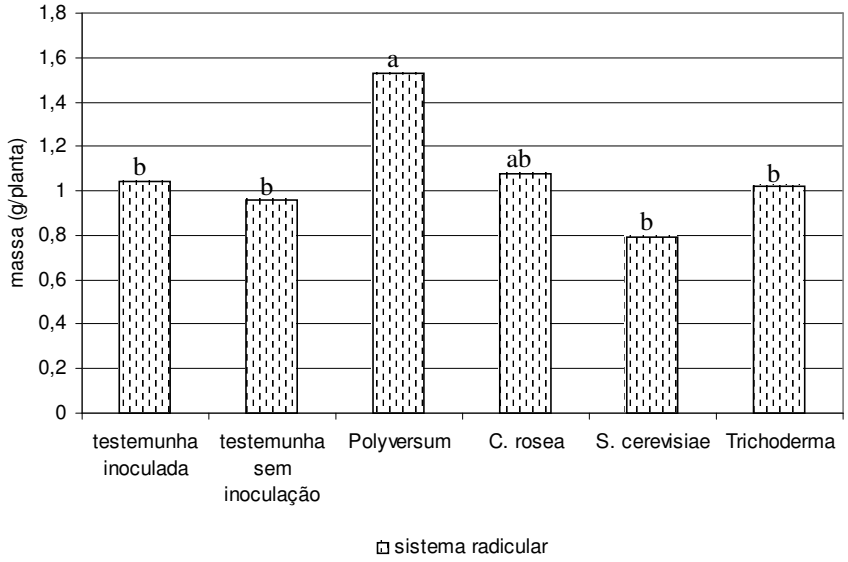

FIGURA 37. Efeito de agentes de controle biológico na massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico inoculadas naturalmente com *Pythium aphanidermatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

A maior porcentagem de recuperação do patógeno nas plantas inoculadas artificialmente foi encontrada no tratamento testemunha inoculada. A menor recuperação do patógeno foi no tratamento com Polyversum® (16%). A recuperação de *Pythium* foi homogênea para os tratamentos *C. rosea*, *S. cerevisiae* e *Trichoderma*, sendo de 50%. No tratamento testemunha sem inoculação, não se recuperou o patógeno. Nas plantas inoculadas naturalmente com *Pythium*, a porcentagem de recuperação foi de 50% nos tratamentos testemunha inoculada e *Trichoderma*. Nos demais tratamentos não houve recuperação do patógeno (Tabela 5).

TABELA 5. Porcentagem de recuperação de *Pythium aphanidermatum* das raízes das plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, após serem tratadas com os agentes de controle biológico.

Tratamentos	Porcentagem de raízes com *P. aphanidermatum*	
	Plantas inoculadas artificialmente	Plantas inoculadas naturalmente
Testemunha inoculada	83%	50%
Testemunha sem inoculação	0	0
Polyversum®	16%	0
Clonostachys rósea	50%	0
Saccharomyces cerevisiae	50%	0
Trichoderma sp.	50%	50%

* dados médios de seis repetições

4.2.3 Potencial de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus*, PSB e fermentado de peixe no controle da podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum*

O tratamento testemunha inoculada apresentou o menor desenvolvimento, quando considerada a massa fresca da parte aérea e total das plantas, diferindo estatisticamente da testemunha sem inoculação. Por outro lado, todos os produtos testados apresentaram comportamento semelhante ao da testemunha não inoculada e não diferiram quanto à massa total da testemunha inoculada (Figuras 38, 39, 40 e 41).

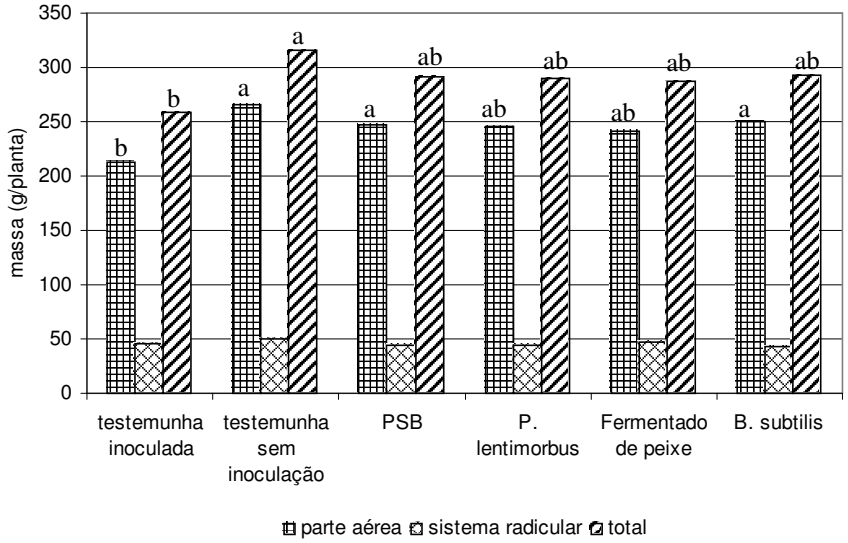

FIGURA 38. Efeito de agentes de controle biológico na massa fresca da parte aérea, sistema radicular e total e massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, inoculadas artificialmente com *Pythium aphanidermatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%. Dados sem letras não foram significativos nos teste F.

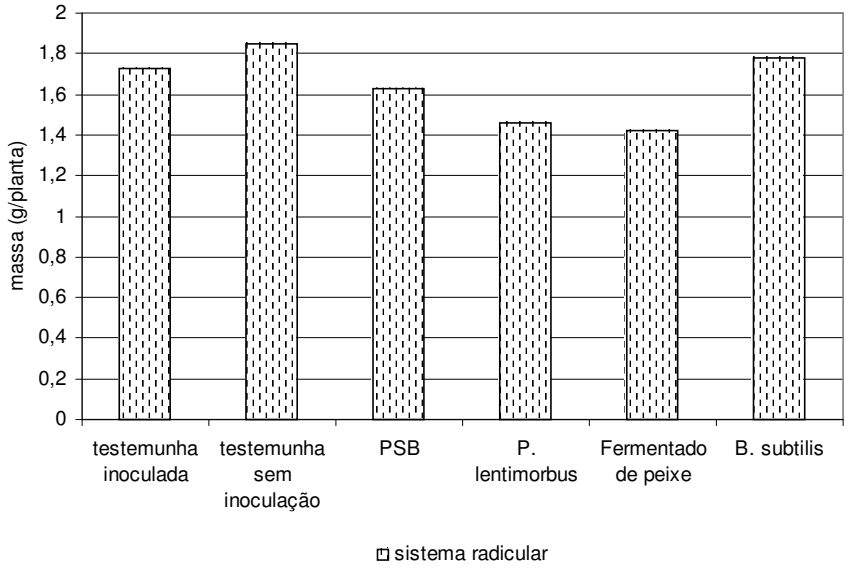

FIGURA 39. Efeito de agentes de controle biológico na massa seca do sistema radicular do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, inoculadas artificialmente com *Pythium aphanidermatum*. Dados não foram significativos no teste F.

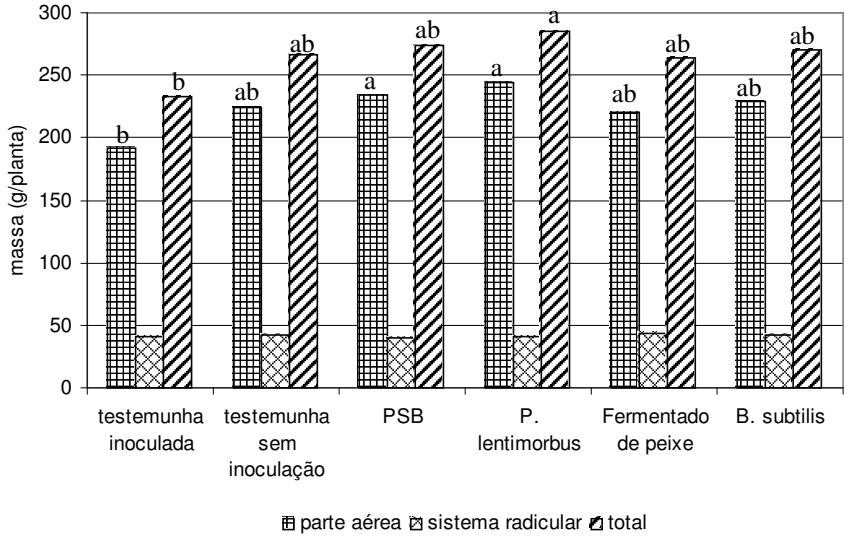

FIGURA 40. Efeito de agentes de controle biológico na massa fresca da parte aérea, do sistema radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, inoculadas naturalmente com *Pythium aphanidermatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%. Dados sem letras não foram significativos no teste F.

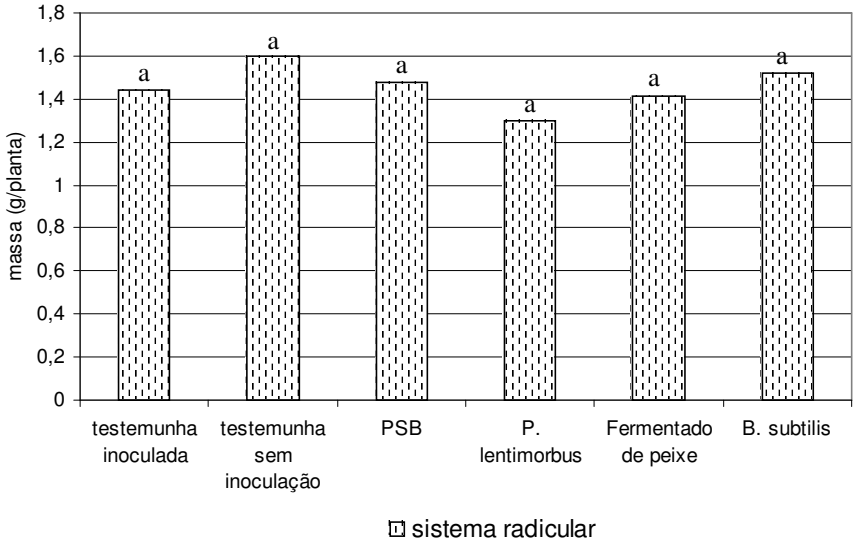

FIGURA 41. Efeito de agentes de controle biológico na massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, inoculadas naturalmente com *Pythium aphanidermatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no teste de Tukey, a 5%.

A porcentagem de recuperação de *Pythium* nas raízes das plantas de alface inoculadas artificialmente foi de 100% para os tratamentos testemunha inoculada, PSB e fermentado de peixe e de 83% para o tratamento com *B. subtilis*. O tratamento com *P. lentimorbus* apresentou o menor valor de recuperação do patógeno, sendo de 33%. Não se recuperou *Pythium* do tratamento testemunha sem inoculação.

A recuperação de *Pythium* nas plantas inoculadas naturalmente com o patógeno foi de 100% para o tratamento fermentado de peixe e de 83% para o tratamento PSB. O tratamento *B. subtilis* obteve a porcentagem de recuperação do patógeno nas raízes de 50%. A recuperação de *Pythium* nas raízes de plantas do tratamento *P. lentimorbus* e testemunha sem inoculação foi nula (Tabela 6).

TABELA 6. Porcentagem de recuperação de *Pythium aphanidermatum* das raízes das plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, após serem tratadas com os agentes de controle biológico e com os produtos formulados.

Tratamentos	Porcentagem de raízes com *P. aphanidermatum*	
	Plantas inoculadas artificialmente	Plantas inoculadas naturalmente
Testemunha inoculada	100%	83%
Testemunha sem inoculação	0	0
PSB®	100%	83%
Paenibacillus lentimorbus	33%	0
Fermentado de peixe	100%	100%
Bacillus subtilis	83%	50%

* dados médios de seis repetições

5 DISCUSSÃO

5.1 Promoção de crescimento

Trichoderma sp. não foi capaz de promover o crescimento das plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Porém, muitos trabalhos demonstram a capacidade de espécies de *Trichoderma* em promover o crescimento de plantas. Windham et al. (1986) verificaram o aumento no peso de raiz e da parte aérea de plântulas de tomate e fumo na ordem de 213% para o peso seco da raiz e 275% para o peso seco da parte aérea de tomate, respectivamente e de 259% para o peso seco radicular e 318% para o peso do sistema aéreo em fumo, respectivamente após a aplicação de espécies de *Trichoderma* em solos autoclavados. *T. harzianum* (T-203) promoveu o desenvolvimento de plantas de pepino, resultando em maiores valores de peso de parte aérea e radicular e comprimento radicular. Quando este mesmo isolado foi aplicado em pepinos cultivados em sistema hidropônico, observou-se uma maior absorção mineral pelas plantas (Yedidia et al., 2001).

Diversos autores discutem os fatores que influenciam o desempenho de *Trichoderma* como biocontrolador ou como agente promotor de crescimento de plantas. Fatores como tipo do solo, temperatura, pH, umidade, composição da microflora e disponibilidade de nutrientes estão descritos como fatores de regulação de *Trichoderma*. Apesar da baixa sobrevivência de *Trichoderma* sp. na solução nutritiva (Tabela 2) verificou-se intensa colonização das raízes de alface, marcada pela coloração verde do fungo nas concentrações de 10^6 e 10^7 conídios/mL. A concentração de 10^7 conídios/mL causou drástica redução no desenvolvimento das plantas de alface, diminuindo acentuadamente a massa média das plantas de alface (Figuras 4, 5, 6 e 7). Os maiores valores de peso do sistema radicular verificado neste tratamento foram dados pela intensa biomassa

fúngica aderida nas raízes. Os resultados encontrados nos experimentos com promoção de crescimento de *Trichoderma* sp. demonstraram que doses elevadas de *Trichoderma*, aplicadas nos tanques de solução hidropônica, podem prejudicar o desenvolvimento da planta, podendo agravar ainda mais a situação dos produtores que buscam por um controle para epidemias radiculares. Foi testado apenas um isolado de *Trichoderma* sp.; talvez outros isolados de *Trichoderma* sejam adaptados ao ambiente aquático, podendo ter sucesso na promoção de crescimento de plantas desenvolvidas em hidroponia.

A aplicação de diferentes concentrações de *Clonostachys* nos tanques de solução nutritiva não promoveu o crescimento das plantas de alface pelo fungo (FIGURAS 11 E 12). Apesar da promoção de crescimento não ter ocorrido nas plantas, nenhuma dose de *Clonostachys* causou redução no desenvolvimento das plantas. Verificou-se também uma coloração rosa nas raízes dos tratamentos em que o fungo foi aplicado nas concentrações de 10^7 e 10^6, logo após a adição dos mesmos na solução nutritiva. Esta coloração permaneceu por alguns dias nas raízes, diminuindo com o tempo. Como verificado para o ensaio com *Trichoderma*, a população de *Clonostachys* decaiu drasticamente após aplicação nos tanques de solução nutritiva, não tendo sido possível a recuperação após 19 dias da introdução do fungo nos tanques de solução nutritiva. Provavelmente não houve adaptação do fungo às condições aquáticas, pois o isolado de *Clonostachys* utilizado no trabalho é proveniente de plantas de morango. Quanto à capacidade de promoção de crescimento de plantas por *Clonostachys*, resultados na literatura demonstram tal potencialidade em campos de couve chinesa infestados com *Pythium tracheiphilum* e em pepinos hidropônicos (Moller et al., 2003; Liu & Sutton., 2002).

A aplicação do meio de cultura fermentado por *Bacillus subtilis* nas concentrações de 0,1% e 1% proporcionou incremento na massa do sistema aéreo das plantas e a aplicação de *B. subtilis* a 1% promoveu o

desenvolvimento das plantas de alface. Rizobactérias promotoras de crescimento podem promover o crescimento atuando na eliminação da microbiota deletéria presente na zona radicular e/ou por meio da produção de hormônios, mineralização de nutrientes, fixação de nitrogênio, etc (Luz, 1996). O tratamento apenas com o meio de cultura nas concentrações de 1% não causou efeito nas plantas. Este resultado demonstra que o incremento na massa úmida do sistema aéreo e total das plantas foi proporcionado pelo isolado bacteriano. Os tratamentos com a aplicação do fermentado de *B. subtilis* e do meio de cultura na concentração de 10% foi prejudicial ao desenvolvimento das plantas, diminuindo sua massa, possivelmente pela competição com oxigênio e alteração na condutividade elétrica. Espécies de *Bacillus* estão sendo amplamente utilizadas na China, como parte de um conjunto de medidas utilizando bactérias que aumentam a produção vegetal (Tang, 1994, citado por Paulitz & Bélanger, 2001).

Meio de cultura fermentado por *Paenibacillus lentimorbus* não promoveu o crescimento das plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico nas concentrações testadas. A aplicação do meio de cultura na concentração de 10% foi prejudicial ao desenvolvimento das plantas, como ocorreu no experimento com *Bacillus subtilis*, diminuindo a massa média seca das plantas em 53% (Figuras 15 e 16). Além das diferenças físico-químicas do ambiente hidropônico com relação ao solo, plantas cultivadas em sistema hidropônico têm disponibilidade nutricional a todo o momento. Talvez este fato explique a falta de eficiência de rizobactérias, reconhecidas como promotoras de crescimento no solo, em alface cultivada em sistema hidropônico.

A aplicação da levedura *S. cerevisiae* não promoveu o crescimento das plantas de alface e, em vez disso, concentrações elevadas diminuíram o seu

desenvolvimento. Possivelmente, isso ocorreu pela competição por nutrientes e oxigênio entre a levedura e as plantas (Figuras 17 e 18).

Diferentes doses do produto P.S.B® aplicadas nos tanques de solução nutritiva não promoveram o crescimento das plantas; as doses 1 e 2g do produto em 100 litros de solução nutritiva causaram diminuição da biomassa aérea e total fresca das plantas. A dose recomendada pelo representante comercial é de 0,5g/100L, para utilização em sistemas hidropônicos. Entretanto, nessa dose, não foram observados efeitos nas plantas (Figuras 21 e 22).

A recomendação do produto fermentado de peixe (Fishfértil®) é para aplicação no solo ou foliar, mas dados encontrados na literatura demonstram a potencialidade de produtos fermentados de pescados marinhos em controlar doenças de plantas (Medeiros & Bettiol, 2005; J.C. Sutton, 2005 comunicação pessoal. Além disso, pela natureza de fertilizante, procurou-se averiguar uma possível promoção de crescimento do produto em plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico com a aplicação de diferentes doses na solução nutritiva. Entretanto, a promoção de crescimento não foi verificada nas plantas de alface, tendo ocorrido problemas de fitotoxicidade (Figuras 23 e 24) com aplicação de doses elevadas. Os danos observados pelo produto na planta ocorreram a partir da dose de 100mL aplicados em 100 litros de solução nutritiva. Alterações na coloração das plantas foram observadas, o sistema aéreo tornou-se clorótico e as raízes exibiram crescimento anormal com a exibição da predominância de raízes grossas, enquanto que na testemunha e no tratamento de 50mL em 100 litros ocorreu a predominância de raízes finas. Verificou-se também a presença de uma massa de coloração marrom aderida às raízes nos tratamentos 100, 150 e 250mL/100L, em que a intensidade aumentou quanto maior a dose usada, diminuindo no decorrer do experimento.

A biomassa radicular de alface foi incrementada nos tratamentos 25 e 50g de Polyversum® /50L de solução nutritiva (Figuras 19 e 20). *P. oligandrum*

foi observado promovendo o crescimento e a produtividade das plantas de pepino desenvolvidas em solo e resultando em aumento de 40% e 50% na massa fresca do sistema radicular e na produtividade (Al-Rawahi & Hancock, 1998). A promoção do crescimento da biomassa aérea por meio da aplicação de 12,5; 25 e 50g do produto em 50L de solução nutritiva não foi constatada nas plantas de alface (Figuras 19 e 20). Logo após a aplicação de Polyversum® nos tanques de solução nutritiva, verificou-se a presença de uma coloração branca nas raízes das plantas, a qual diminuiu no decorrer do experimento. Efeito fitotóxico do produto não foi verificado, mesmo na concentração mais elevada (Figuras 19 e 20).

5.2. Controle biológico

No primeiro ensaio, realizado entre fevereiro e março de 2005, com temperaturas da solução nutritiva variando de 20° a 35^{O}C, *C. rosea* foi efetivo no controle da doença, resultando em incremento de massa das plantas de alface (FIGURAS 26 e 27). Moller et al. (2003) observaram o aumento na produção de couve chinesa e controle dos danos causados por *Pythium tracheiphilum* em campo com infestação natural, por meio de aplicações de *C. rosea* (isolado IK726). O sucesso de *C. rosea* em controlar *Pythium* em couve chinesa pode ser atribuído pelo antagonismo e competição nos restos de cultura no campo pelo agente de biocontrole, diminuindo a fonte de inóculo de *P. tracheiphilum*. Alguns mecanismos de ação conhecidos de *Clonostachys* são micoparasitismo, antagonismo, competição por nutrientes e indução de resistência (Mollet et al., 2003; Sutton et al., 1997).

Após a aplicação de *Clonostachys* nos tanques de solução nutritiva, notou-se uma coloração rosa nas raízes, que decresceu com o transcorrer do tempo. A recuperação de *C. rosea* das raízes foi realizada no final do experimento (Tabela 4), demonstrando a capacidade rizosférica do isolado

testado. A capacidade rizosférica é uma característica importante para agentes de controle biológico, pois um agente que não tem esta capacidade é incapaz de competir por espaço e nutrientes no sítio de infecção de patógenos radiculares (Howel, 2003). A recuperação de *Pythium* no final do experimento foi menor nos tratamentos com a aplicação de *Clonostachys* e quanto maior o número de aplicações, menor a porcentagem de recuperação do patógeno nas raízes.

A temperatura da solução nutritiva é um fator chave para o desenvolvimento da podridão de raiz induzida por *Pythium*. Quanto maior a temperatura da solução nutritiva, maior a predisposição das plantas ao ataque de *Pythium* e o progresso da doença. *P. aphanidermatum* é relatado como agente causal de severas epidemias em diversas culturas quando na presença de temperaturas elevadas (>23-27^{O}C) na zona radicular (Bates & Stanghellini, 1984; Gold & Stanghellini, 1985; Owen-Going et al., 2003).

Os outros dois ensaios realizados para estudar o potencial de *Clonostachys* no controle da doença causada por *P. aphanidermatum* foram instalados entre maio e julho de 2005, no município de Jaguariúna, SP, onde a temperatura média do ambiente foi relativamente baixa. Assim, *P. aphanidermatum* não causou doença nas plantas durante a condução do ensaio (Figuras 28, 29, 30 e 31). Como já citado anteriormente, a temperatura é considerada como um dos fatores principais para o desenvolvimento de podridões radiculares induzidas por espécies de *Pythium*.

No segundo ensaio, nos tratamentos em que as plantas de alface foram inoculadas artificialmente e tiveram aplicação de *Clonostachys*, ocorreu menor desenvolvimento de biomassa fresca (Figuras 32 e 33). Este fator negativo nas plantas pode ser explicado pelo método de inoculação utilizado neste ensaio, em que as raízes das plantas permaneceram por 20 horas submersas em solução nutritiva. O esgotamento de oxigênio na suspensão pode ter causado a morte das raízes, pois este foi consumido pelas plantas, pelo fitopatógeno e por

Clonostachys. Após o retorno das plantas para o sistema definitivo observou-se murcha nas plantas inoculadas, que foi maior nos tratamentos em que ocorreu a aplicação de *Clonostachys*.

No terceiro ensaio, o tratamento inoculado com *Pythium* teve o menor desenvolvimento de biomassa fresca do sistema aéreo e total quando comparado com a testemunha sem inoculação. Porém, não foi verificada exibição aparente de sintomas nas raízes, constatado por meio do seu escurecimento. Diversos autores relatam o isolamento de *Pythium* de plantas de alface exibindo severos sintomas da podridão e de plantas aparentemente sadias, sem exibição de escurecimento radicular. Infecções de raízes sem exibição de sintomas são chamadas de subclínicas e são responsáveis por perdas na produção vegetal, pois os produtores não conseguem diagnosticar o problema (Utkhede et al., 2000). A redução encontrada no ensaio de massa da parte aérea fresca por *Pythium* foi de 15% e a redução para a biomassa total úmida foi de 13%. Considerando-se que empresas processadoras de hortaliças absorvem cerca de uma tonelada de pés de alface semanais e que o ensaio seria uma produção comercial, as perdas por infecções subclínicas seriam de 150 kg para peso de sistema aéreo úmido e de 130 kg para a biomassa fresca total.

A aplicação de *Clonostachys* nos experimentos realizados no período entre maio e julho de 2005 foi, de modo geral, prejudicial às plantas. Este fato pode ser explicado pelo longo período de permanência das raízes das plantas submersas na suspensão de *Pythium* no processo de inoculação, pois, no ensaio de promoção de crescimento com *Clonostachys*, não foi observado efeito prejudicial causado pelo fungo nas plantas (Figuras 11 e 12).

No estudo com aplicações de *C. rosea*, *Trichoderma*, *S. cerevisiae* e Polyversum®, nos tanques de solução nutritiva, verificou-se que as plantas inoculadas artificialmente ou naturalmente com *P. aphanidermatum* apresentaram a massa radicular úmida estatisticamente maior que a da

testemunha sem inoculação (Figuras 34, 35, 36 e 37). Porém, este incremento de massa úmida radicular não resultou em incremento de peso de biomassa total das plantas. Os maiores valores de biomassa radicular fresca e seca foram proporcionados pelo tratamento com Polyversum®. Polyversum® também apresentou o maior valor de biomassa total úmida nas plantas inoculadas naturalmente e maior massa seca do sistema radicular de plantas inoculadas artificialmente. De acordo com Al-Rawahi & Hancock (1998), estudos recentes têm demonstrado a capacidade de promoção de crescimento de plantas por *P. oligandrum*. Com a aplicação de *P. oligandrum* para controle de *Verticillium dahliae*, os autores verificaram a redução das perdas ocasionadas pela doença e atribuíram a promoção de crescimento como mecanismo de ação para a proteção das plantas de pepino.

O desenvolvimento do ensaio com esses antagonistas ocorreu nos meses de novembro a dezembro de 2005. A temperatura da solução nutritiva atingiu a mínima de 20°C e máxima de 31°C. Apesar da temperatura máxima da solução nutritiva ter atingido o valor de 31°C, esta foi observada em um curto período de tempo durante a condução do experimento, não favorecendo o progresso da doença. Após 72 horas de inoculação, verificou-se, nas plantas do tratamento testemunha inoculada, o aparecimento de pontuações vermelhas nas pontas das raízes e progressivo escurecimento com coloração marrom. Este escurecimento não foi verificado em raízes de plantas sem inoculação com o fitopatógeno.

A redução na recuperação de *Pythium* nas raízes das plantas foi de 33% para os tratamentos *C. rosea*, *S. cerevisiae* e *Trichoderma* sp. e de 67% para Polyversum®, em plantas inoculadas artificialmente. Para plantas inoculadas naturalmente, a redução de *Pythium* nas raízes foi de 100% nos tratamentos *C. rosea*, Polyversum, *S. cerevisiae*, não tendo sido evidenciada no tratamento com *Trichoderma*. Não foi recuperado *Pythium* das raízes das plantas pertencentes à testemunha sem inoculação. No entanto, em todas as amostras de todos os

tratamentos, *Fusarium* spp. foi encontrado. *Fusarium oxysporum* é relatado como agente causal de podridão em culturas desenvolvidas em sistemas hidropônicos (Zinnen, 1998). Como *Fusarium* sempre foi recuperado nas raízes das plantas, inclusive na testemunha não inoculada, este fungo pode ter agido como um patógeno secundário, diminuindo a massa das plantas. Benhamou et al. (1997) verificaram a capacidade de *P. oligandrum* em controlar *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-licopersici* por micoparasitismo e induzir resistência nas plantas de tomate. Apesar da recuperação de *Pythium* nas raízes de plantas de alface, não foram verificados prejuízos acarretados por *P. aphanidermatum*.

No experimento com *B. subtilis*, *P. lentimorbus*, P.S.B® e fermentado de peixe (Fishfértil®) conduzido durante os meses de novembro a dezembro de 2005, as temperaturas da solução nutritiva tiveram a mínima de 19°C e máxima de 32°C. Estas temperaturas proporcionaram o desenvolvimento da doença, embora a severidade não tenha sido alta.

Apesar de não diferir significativamente dos demais tratamentos, a aplicação de *B. subtilis* foi a que protegeu as plantas de alface artificialmente inoculadas com *P. aphanidermatum* da diminuição de biomassa aérea causada pelo patógeno. Os resultados desta proteção são evidenciados nos valores de massa entre as testemunhas inoculada e não inoculada do experimento (Figuras 38 e 39). Utkhede et al. (2000) observaram o controle de *P. aphanidermatum* com a aplicação do produto comercial Boost® (formulado com o isolado de *B. subtilis* BACT-O) na concentração de $1x10^9$ e $1x10^{11}$ UFC/mL, em plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. Os autores verificaram aumento na massa das plantas e redução nos níveis de doença, comparados com a testemunha inoculada. Os mecanismos atribuídos pelos autores para o controle biológico do patógeno pela bactéria foram indução de resistência e promoção de crescimento. No presente trabalho, verificou-se, no ensaio de promoção de crescimento, que o isolado estudado de *B. subtilis* (AP-3), aplicado na mesma

dose utilizada para controle biológico, foi capaz de promover o crescimento da biomassa fresca das plantas (Figura 13). No entanto, pode-se atribuir a promoção de crescimento como um provável mecanismo utilizado pela bactéria para controle da doença. Isolados de *B. subtilis* são reconhecidos como agentes promotores de incremento de plantas. Além de promotores de crescimento, isolados de *B. subtilis* são reconhecidos como produtores de uma ampla gama de antibióticos inibidores de fungos e bactérias (Bettiol, 1988).

Paenibacillus lentimorbus foi o melhor agente de controle biológico em plantas inoculadas naturalmente com *Pythium*, possibilitando o maior incremento da massa total fresca (Figuras 40 e 41). Amorim & Melo (2002) demonstraram a capacidade do isolado de *Paenibacillus,* estudado no presente trabalho, como agente de biocontrole de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plantas de limão 'Cravo', reduzindo a infecção da doença e promovendo o crescimento das plantas. Este mesmo isolado também mostrou eficiência no controle de *Fusarium solani* f sp. *phaseoli*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsi* em condições de casa de vegetação (Melo et al., 1995).

6 CONCLUSÕES

- *C. rosea*, *Trichoderma*, *P. oligandrum*, *P. lentimorbus*, *S. cerevisiae*, P.S.B® e fermentado de peixe (Fishfértil®) não promoveram o crescimento das plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico.

- Meio de cultura fermentado por *B. subtilis* na concentração de 1% promove o crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico.

- *Clonostachys rosea* controla a podridão de raízes causada por *P. aphanidermatum* em plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-RAWAHI, A. K.; HANCOCK, J. G. Parasitism and biological control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 10, p. 1100-1106, Oct. 1998.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. T. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 1-7, ago. 2002.

BATES, M. L.; STANGHELLINI, M. E. Root rot of hidroponically grown spinach caused by *Pythium aphanidermatum* and *P. dissotocum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 11, p. 989-991, Nov. 1984.

BENHAMOU, N.; REY, P.; CHERIF, M.; HOCKENHULL, J.; TIRILLY Y. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 1, p. 108-122, Jan. 1997.

BETTIOL, W. **Seleção de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* para o controle de brusone do arroz (*Oryzae sativa* L.)**. 1988. 140p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

BUENO, C. R. **Adubação nitrogenada em cobertura via fertirrigação por gotejamento para alface americana (*Lactuca sativa* L.) em ambiente protegido**. 1998. 54 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHATTERTON, S.; SUTTON, J. C.; BOLAND, G. J. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hidroponic peppers. **Biological Control**, San Diego, v. 30, n. 2, p. 360-373, June 2004.

CHÉRIF, M.; BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Ultrastructural and cytochemical studies of fungal development and host reactions in cucumber plants infected by *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, n. 5, p. 353-375, Nov. 1991.

CHÉRIF, M.; TIRILLY, Y.; BÉLANGER, R. R. Effect of oxygen concentration on plant growth, lipidperoxidation, and receptivity of tomato roots to *Pythium* F under hydroponic conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Ddordrecht, v. 103, n. 3, p. 255-264, Mar. 1997.

CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E.; CAMILI, E. C. Avaliação de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção pós-colheita de mamão contra antracnose. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 109.

COHEN, Y.; COFFEE, M. D. Systemic fungicides and the control of Oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo alto, v. 24, p. 311-338, 1986.

CORLISS, J. An interim utilitarian ('User-friendly') hierarchical classification and characterization of the protists. **Acta Protozoologica**, Warszawa, v. 33, p. 1-51, 1994.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; BENHAMOU, N.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *Pythium aphanidermatum* and Induction of defense reactions. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 3, p. 313-320, Mar. 1994.

ENDO, R.; COLT, W. Anatomy, cytology and physiology of infection by *Pythium*. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 1, p. 215-223, 1974.

FAVRIN, R. J.; RAHE, J. E.; MAUZA, B. *Pythium* spp. associated with crown rot cucumbers in British Columbia greenhouses. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, n. 8, p. 683-687, Aug. 1988.

FUNCK-JENSEN, D.; HOCKENHULL, J. The influence of some factors on the severity of *Pythium* root-rot of lettuce in soilless (hidroponic) growing systems. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 133, p. 129-136, 1983.

FURLANI, P. R. Hydroponic vegetable production in Brazil. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 481, p. 777-778, 1999.

FURLANI, P. R**. Instruções para o cultivo de hortaliças de folhas pela técnica de hidroponia – NFT.** Campinas: Instituto Agronômico, 1998. 30 p. (Boletim Técnico, 168).

GOLD, S. E.; STANGHELLINI, M. E. Effects of temperature on *Pythium* root rot of Spinach grown under hydroponic conditions. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, n. 3, p. 333-337, Mar. 1985.

GOLDBERG, N. P.; STANGHELLINI, M. E. Ingestion-egestion and aerial transmission of *Pythium aphanidermatum* by shore flies (Ephydrinae: *Scatella stagnalis*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 11, p. 1244-1246, Nov. 1990.

GOLDBERG, N. P.; STANGHELLINI, M. E.; RASMUSSEN, S. L. Filtration as a method of controlling *Pythium* root rot of hidroponically grown cucumbers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 8, p. 777-779, Aug. 1992.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatôgenicas. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. cap. 12, p. 425-426.

HAMLEN, R.; LUKEZIC, F.; BLOOM, J. Influence of age and stage of development on the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in a gnotobiotic environment. **Canadian Journal Plant Science,** Ottawa, v. 52, n. 4, p. 633-642, 1972.

HARMAN, G. E.; CHET, U.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 12, p. 1167-1172, Dec. 1980.

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

JENKINS, D. G.; COOK, K. L.; GARLAND, J. L.; BOARD, K. F. *Pythium* invasion of plant-based life support systems: Biological control and sources. **Life Support Biosphere Science**, New York, v. 7, n. 2, p. 209-218, 2000.

JOHNSTONE, M. B. **Canopy and leaf gas exchange accompanying *Pythium* root rot of lettuce and Chrysanthemum**. 2001. Thesis (Ph. D.) - University of Guelph, Guelph.

KHAN, A.; SUTTON, J. C.; GRODZINSKI, B. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. **Biocontrol Science and Technology**, Hants, v. 13, n. 6, p. 615-630, Sept. 2003.

LIU, W.; SUTTON, J. C. Effectiveness of microbial agents to protect *Pythium* root rot in hydriponic cucumber. **B&C Tesis,** v. 18, p. 1-2, 2002.

LIU, W.; SUTTON, J. C.; KHAN, A.; GRODZINSKI, B. Effectiveness of five bacterial agents against root diseases caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium dissotocum* in hydroponic chrysanthemum. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 24, p. 377, 2002.

LUZ, W. C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 1-49, 1996.

LYON, G. D.; REGLINSKI, T.; NEWTON, A. C. Novel disease compounds: the potential to 'immunize' plants against infection. **Plant Pathology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 407-427, June 1995.

MADSEN, A. M.; DE NEERGAARD, E. Interactions between the *mycoparasite Pythium oligandrum* and sclerotia of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 8, p. 761-768, Nov. 1999.

MARTIN, F. N.; LOPER, J. E. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp. : ecology, epidemiology, and prospects for biological control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 18, n. 2, p. 111-181, 1999.

MEDEIROS, F. H. V.; BETTIOL, W. Produtos fermentados a base de casca de camarão para o controle do oídio das cucurbitáceas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília,. v. 30, p. S145, ago. 2005. Suplemento.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas,** Passo Fundo, v. 4, p. 261-293, 1996.

MELO, I. S.; VALARINI, P. J.; AVILA, L. A.; NASCIMENTO, R. S. Colonização de raízes por rizobactérias promotoras de crescimento do tomateiro e antagônicas a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 14, 2004. Suplemento.

MELO, I. S.; VALARINE, P. J.; FAULL, J. L. Controle biológico de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 20, p. 342, 1995. Suplemento.

MENZIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. Recent advances in cultural management of diseases of greenhouse crops. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 18, n. 2, p. 186-193, June 1996.

MENZIES, J. G.; EHRET, D. L.; STAN, S. Effect of inoculum density of *Pythium aphanidermatum* on the growth and yield of cucumber plants grown in recirculating nutrient film culture. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 18, n. 1, p. 50-54, Mar. 1996.

MOLLER, K.; JENSEN, B.; ANDERSEN, H. P.; STRYHN, H.; HOCHENHULL, J. Biocontrol of *Pythium tracheiphilum* in chinese cabbage by *Clonostachys rosea* under fiel conditions. **Biocontrol Science and Techonology**, Hants, v. 13, n. 2, p. 171-182, Mar. 2003.

MORANDI, M. A. B.; SUTTON, J. C.; MAFFIA, L. A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 5, p. 439-448, June 2000.

NOVIKOVA, N. D. Basic patterns of microflora development in the environment of orbital complex Mir. **Aviakosmicheskaia i Ekologicheskaia Meditsina**, Abingdon, v. 35, n. 1, p. 32-40, 2001.

OWEN-GOING, . N.; SUTTON, J. C.; GRODZINSKI, B. Relationships of Pythium isolates and sweet pepper plants in single-plant units. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 25, n. 2, p. 155-167, June 2003.

OWEN-GOING, T. N.; SUTTON, J. C.; YU, H.; GRODZINSKI, B. Symptom production in roots of hydroponic pepper inoculated with various *Pythium* isolates. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, p. 68, 2001. Supplement.

PAULITZ, T. Biological control of root rot pathogens in soilless and hydroponic systems. **HortScience,** Alexandria, v. 32, n. 2, p. 193-196, Apr. 1997.

PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 103-133, 2001.

PAULITZ, T. C.; ZHOU, T.; RANKIN, L. Selection of rhizosfere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically grown cucumber. **Biological Control**, San Diego, v. 2, p. 226-237, 1992.

PICARD K.; TIRILLY, Y.; BENHAMOU, N. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4305-4314, Oct. 2000.

PICCININ, E. **Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucaliptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos**. 1995. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PUNJA, Z. K. Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 25, n. 4, p. 411-417, Dec. 2003.

REY, P.; BENHAMOU, N.; TIRILLY, Y. Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 3, p. 234-244, Mar. 1998.

REY, P.; NODET, P.; TIRILLY, Y. *Pythium* F induces a minor but ubiquitous disease in tomato soilless cultures. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 79, n. 3, p. 173-180, 1997.

SANTOS, A. C.; POLTRONIERI, L. S.; SANTOS, I. P.; JUNIOR, I. M.; CUNHA, V. F.; CARDOSO, S. S. Ocorrência de *Pythium* sp. em alface hidropônico no Estado do Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 137, 2005. Suplemento.

SCHUERGER, A. C. Microbial contamination of advanced life support (ALS) systems poses a modertare threat to long-term stability of space-based bioregenerative systems. **Life Support Biosphere Science**, New York, v. 5, n. 4, p. 325-337, 1998.

SEVERINO, J. J.; CAIXETA, M. P.; AGUIAR, R. L.; TESSMANN, D. J.; VERSIGNASSI, J. R.; VIDA, J. B. Podridão de *Pythium* sp. causando severos danos em alface hidropônica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 141, 2005. Suplemento.

STANGHELLINI, M. E.; MILLER, R. M. Bio-surfactantes: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 1, p. 4-12, Jan. 1997.

STANGHELLINI, M. E.; RASMUSSEN, S. L. Hidroponics: A solution for zoosporic pathogens. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 12, p. 1129-1138, Dec. 1994.

STANGHELLINI, M. E.; RUSSEL, J. D. Damping-off of tomato seedlings in commercial hydroponic culture. **Progress in Agriculture Arizone,** Tucson, v. 23, n 5, p. 15-16, 1971.

STANGHELLINI, M. E.; STOWELL, L. J.; BATES, M. L. Control of root rot of Spinash caused by *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system by ultraviolet irradiation. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 12, p. 1075-1076, Dec. 1984.

STRIGUL, S. N.; KRAVCHENKO, L. V. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. **Environmental Modeling & Software**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 1-14, Jan. 2005.

SUTTON, J. C.; LI, D-W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 4, p. 316-328, Apr. 1997.

SUTTON, J. C.; YU, H.; GRODZINSKI, B.; JOHNSTONE, B. Relationships of ultraviolet radiation dose and inactivation of pathogen propagules in water and hydroponic nutrient solutions. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 22, n. 3, p. 300-309, Sept. 2000.

TANAKA, M. A. S.; ITO, M. F.; BRAGA, C. A. S; ARMOND, G. Tratamento térmico solar da água para controle de fitopatógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 386-393, jul./ago. 2003.

UTKHEDE, R. S.; LÉVESQUE, C. A.; DINH, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically-grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 22, n. 2, p. 138-144, June 2000.

VAN VEEN J. A; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology Molecular Biology Review**, Washington, v. 61, n. 2, p. 121-135, June 1997.

WEST, P. V.; APPIAH, A. A.; NEIL, A. R. G. Advances in research on oomycete root pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, n. 1, p. 99-113, 2003.

WINDHAM, M. T.; ELAD, Y.; BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 7, p. 518-521, July 1986.

XUE, A. G. Biological control of pahogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 3, p. 329-335, Mar. 2003.

YAÑEZ, L. D. T**. Identificação, patogenicidade e sensibilidade a produtos químicos *in vitro* de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.)**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 235, n. 2, p. 235-242, Aug. 2001.

YU, H.; SUTTON, J. C. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ontario, v. 19, n. 3, p. 237-246, Sept. 1997.

ZHENG, J.; SUTTON, J. C.; YU, H. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 22, n. 4, p. 368-379, Dec. 2000.

ZINNEN, T. M. Assessment of plant diseases in hidroponic culture. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, n. 2, p. 96-99, Feb. 1988.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo