

FILIPPE ROSA BAPTISTA

***Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium
dissotocum* Drechsler em alface (*Lactuca sativa* L.):
avaliação patogênica e controle biológico**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

**SÃO PAULO
2007**

FILIPPE ROSA BAPTISTA

***Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium
dissotocum* Drechsler em alface (*Lactuca sativa* L.):
avaliação patogênica e controle biológico**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. CARMEN LIDIA A. PIRES ZOTTARELLI

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Baptista, Filipe Rosa
B222p *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em alface (*Lactuca sativa* L.): avaliação patogênica e controle biológico / Filipe Rosa Baptista -- São Paulo, 2007
100 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2007
Bibliografia.

1. Fungos zoospóricos. 2. Hidroponia. 3. Patogenicidade. I. Título

CDU 582.281

Aos meus pais Nivaldo e Luci

Ao meu irmão Julio e minha irmã Mariana

Pelo carinho, apoio, incentivo e esforço durante toda a minha vida.

DEDICO

“ Não desanimeis nunca, embora venham ventos contrários”
Amábile Lúcia Visintainer (Santa Paulina)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço imensamente ao meu pai Nivaldo, minha mãe Luci, meu irmão Julio, minha linda irmã Mariana e meus avós Claudino Baptista, Maria de Abreu Batista e Lucinda Cuisse Rosa pelo amor, incentivo e dedicação durante todos os momentos da minha vida.

À Dra. Carmen Lidia Amorim Pires Zottarelli pela valiosa orientação, estímulo, amizade e dedicação indispensável durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Tenho muito orgulho de ter trabalhado ao longo desses 7 anos ao seu lado, no qual, contribuiu diretamente na minha formação profissional e pessoal. Muito Obrigado!!!!

Em especial agradeço as pessoas e empresas que acreditaram no meu trabalho e confiaram no meu projeto: Hideo Kuramoto, Luiz Carlos Bruno (Qualifértil), Anduir Lenhart (Biovale), Carlos Orlandi e Carlos Banho (Hidrogood) e Nelson Carlos Nardy (Tropical estufas). Com certeza a amizade e ajuda de vocês foram indispensáveis para a execução desse projeto, acreditando na parceira científica. Muito Obrigado à todos.

À Fapesp pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de mestrado (processo FAPESP 05/52894-9).

A Micheli Garcia Soares pelo apoio constante, carinho e paciência em todos os momentos.

Ao Dr. Adauto Ivo Milanez pelos conselhos, ensinamentos e experiência transmitida durante todos esses anos e, pelo auxílio técnico por meio da compra da câmara de crescimento.

Aos amigos do laboratório de Fungos Zoospóricos: Cristiane de Almeida Nascimento (Crizinha), Alexandra Lenk Gomes, Maria Luíza de Miranda, Fabíola Michelin e Kátya da Silva Patekoski pela constante troca de informações e amizade.

Às funcionárias de apoio da Seção de Micologia e Liquenologia, Zelinda Raimunda Barbosa Santana (Fofinha), Maria Dorotéia Ferreira Trude (Dorô) e Rosimeire Aparecida Inácio (Rose).

A todos os pesquisadores da Seção de Micologia e Liquenologia pelos ensinamentos: Dra. Adriana de Mello Gugliotta, Dr. Dácio Roberto Matheus, Dr. José Ivanildo de Souza, Dra. Iracema Helena Schoenlein-Crusius, Dr. Marcelo Pinto Marcelli, Dra. Marina Capelari, Ms. Michel Navarro, Dra. Milena de Luna Alves Lima, Dra. Vera Vitalli e Dra. Roseli Ana Piccolo Grandi.

Ao excelente convívio de todos os amigos da Seção de Micologia e Liquenologia do IBt: Adriano Afonso Spielmann, Carla Puccinelli, Cássia, Carolina G. Moreira, Fernanda Karstedt, Glauciane D. Coelho, Luciana da Silva Canêz, Milton Félix Nunes Martins, Marina Bianchini, Nara Ballaminut, Patrícia Junghblut, Prof. Norberto Carlos Schoenlein, Priscila da Silva, Ricardo

Soares, Ricardo R. da Silva, Sergio Moreira Neto, Stephanie Moreta, Suzana Martins, Tatiane Asai, William Okada e Iane Paula Rego Cunha.

Agradeço a todas as pessoas e amigos do Instituto de Botânica que diretamente e indiretamente fizeram parte dos momentos vividos ao longo desses dois anos no Instituto de Botânica. Em especial aos amigos, Igor, Paulo, Lamarka e Maurício pela amizade e ótimo convívio durante as disciplinas, festas, etc.

À Comissão de Pós-graduação do Instituto de Botânica de São Paulo, da qual fui representante discente durante o ano de 2005/2006. Obrigado Dra.. Gerleni Lopes Esteves, Dra. Maria Angela M. de Carvalho, Dra. Iracema Helena Schoenlein-Crusius, Dra. Solange Mazzoni-Viveiros, Dra. Dr. Sônia Dietrich, Dra. Silvia Pita, Dra. Maria Ângela e Dr. Fábio de Barros.

A minha gratidão aos ensinamentos dos pesquisadores, Dr. Cláudio Barbedo, Dr. Carlos Eduardo de Mattos Bicudo, Dra. Célia Leite Sant'Anna, Dra. Olga Yano, Dra. Ivone, Dr. José Marcos Barbosa, Ms. João José Dias Parisi, Dr. José de Ribamar de Sousa Rocha e Ms. Shoey Kanashiro.

Ao Dr. Nelson Augusto dos Santos Júnior pela amizade e grande auxílio nas análises estatísticas.

À Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, em especial a Dra. Lilian Beatriz Penteado Zaidan e Josimara Rondon pela atenção e para a utilização das câmaras de crescimento.

À Dra. Liliane De Diana Teixeira pelas sugestões

À Seção de Ficologia, em especial Aline Paternostro Martins, pelo incentivo, apoio e carinho.

As minhas queridas amigas Juliana Yura e Maitê pela amizade e apoio constante durante todas as etapas!!

Aos meus amigos Cléber Uehara (Japa), Wanderson Trociuk (Siri), Anderson Freitas (Ochente), Márcio Amorim, Alan Dias, Ronaldo Castro e Rodrigo Barreiros pela grande amizade e apoio nas etapas da vida.

As minhas irmãs de coração Marília e Maria Beatriz pelo carinho e amizade sempre tão sincera. Considero muito vocês!!!

Aos funcionários da Pós-Graduação do Instituto de Botânica, Márcia Regina Ângelo e Antônio Carlos Borges pelo auxílio e bom atendimento.

Ao pessoal da Biblioteca do IBT pela atenção e bom atendimento prestado: Maria Helena Simões Costa Fernandes Gallo, Suely Paiva de Caldas e Jeferson Aparecido de Souza.

A todos os funcionários do Instituto de Botânica, pela auxílio para a execução desse projeto, em especial, Arnaldo de Carvalho Lima, Alípio Santana de Oliveira, José Roberto Mourelli, João Darcílio, Aliomar Oliveira Gomes (Mazinho), Luís Gustavo Zanqueta, Wilson

Ferreira da Silva, Janete de Lima, Maria Soares Cardoso, Amélia Ferreira Furlan, Célio Irineo Dalseno, Edson Ferreira da Silva, Jesus de Alencar Rolim, Fabiane Carrocieli Couto, Marco Antônio Machado, Antônio Pereira Alves, Marcelo José dos Santos (Ceará), Waldyr Baptista e todo o pessoal da jardinagem.

Ao Dr. John Sutton por compartilhar seu vasto conhecimento, ensinamentos e conselhos para a execução do projeto.

À Élide Barbosa Corrêa pela amizade, apoio e incentivo no projeto.

Dedico também a todos os produtores de hidroponia, em especial Hideo Kuramoto, pois este trabalho pertence também a todos vocês que lutam constantemente contra o nosso vilão: Pythium.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Hidroponia: Sistemas e Culturas Hidropônicas	1
1.2. A Cultura da Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	4
1.3. O Gênero <i>Pythium</i> Pringsheim - Características Gerais e Classificação	5
1.4. <i>Pythium</i> : Fonte de Inóculo, Disseminação, Colonização e Sintomatologia	6
1.5. Fatores que influenciam a ocorrência de podridão radicular	9
1.6. Controle de <i>Pythium</i> em sistemas hidropônicos	10

CAPÍTULO 1

Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em variedades de alface

Resumo	13
Abstract	14
Introdução	15
Material e métodos	17
Resultados e discussão	19
Literatura citada	37

CAPÍTULO 2

Controle Biológico de *Pythium dissotocum* Drechsler em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.)

Resumo	41
Abstract	42
Introdução	43
Material e métodos	44
Resultados e discussão	50
Literatura citada	70

CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
-----------------------------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
---	----

ANEXO 1	92
----------------------	----

ANEXO 2	95
----------------------	----

RESUMO

O cultivo de hortaliças em sistemas hidropônicos apresentou uma grande expansão na última década no Brasil, especialmente da alface (*Lactuca sativa* L.), pois apresenta ciclo de vida curto e ampla aceitação no mercado. Em condições hidropônicas, patógenos como *Pythium* spp., principalmente nos meses mais quentes do ano, são responsáveis por podridões em raízes que resultam em prejuízos consideráveis para os produtores. Atualmente, a introdução de microrganismos antagonistas no controle desses patógenos perfaz uma alternativa para a substituição do uso de agroquímicos. O fungo *Trichoderma* está entre os mais estudados microrganismos com potencial para controle biológico, havendo disponíveis produtos comerciais formulados com este antagonista, como é o caso do Biotrich. No presente estudo, buscou-se avaliar o potencial patogênico *in vitro* de *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler, isolados de culturas hidropônicas sintomáticas, em diferentes variedades comerciais de alface, e analisar o efeito do Biotrich como controle biológico *in vitro* e *in vivo*. Nos testes realizados *in vitro*, avaliou-se primeiramente a patogenicidade de *Pythium middletonii* Sparrow e *P. dissotocum* Drechsler, em quatro variedades comerciais de alface, lisa (Elisa), crespa (Vera), mimosa (Mimosa) e, americana (Tainá), e em seguida, o efeito do Biotrich como controle biológico *in vitro*, utilizando para isso, o isolado *Pythium dissotocum*, espécime mais patogênico e, as variedades Mimosa e Vera, menos e mais suscetíveis, respectivamente. Sementes de alface foram colocadas na superfície do meio ágar-água, em seguida, um disco com micélio dos isolados de *Pythium*, foi disposto no centro de cada placa. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de petri. Avaliou-se o comprimento dos hipocótilos, das radículas e a porcentagem das plântulas sobreviventes após dez dias de incubação. Nos testes com o produto biológico, placas de Petri contendo ágar-água receberam uma alíquota de 1mL de suspensão, contendo 0,1; 0,2 e 0,3mL de produto comercial por litro de suspensão. As concentrações foram testadas com e sem a presença do patógeno e placas contendo apenas as sementes de alface serviram como controle. Para o teste de controle biológico *in*

vivo, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x2 (variedade x inoculação x produto), perfazendo oito tratamentos, cada qual realizado com seis repetições, sendo cada repetição representada por uma planta. Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados da avaliação patogênica *in vitro* demonstraram que a 20°C, *P.dissotocum* mostrou maior patogenicidade nas variedades de alface, sendo a variedade Mimosa a menos suscetível e, a Vera a mais suscetível. Os resultados com o produto biológico comercial Biotrich demonstraram o efeito positivo no controle de *P. dissotocum in vitro* e *in vivo*, verificando-se uma grande efetividade na redução de podridão radicular.

Palavras-chaves: *Pythium* spp., patogenicidade, hidroponia, *Trichoderma* sp

ABSTRACT

Over the past ten years, the hydroponically grown vegetables presented a great expansion in Brazil, especially in lettuce (*Lactuca sativa* L.), presenting a short cycle of life and a huge acceptance in the market. In hydroponic system, however, *Pythium* spp. are regarded as important pathogen mainly in the hottest months of the year, these organisms are responsible for root rot resulting in considerable damages for the growers. Currently, the introduction of antagonistic microorganisms in the control of these pathogens is being an alternative for the replacement of chemical compounds. Among of microbial agents, *Trichoderma* spp. are highly studied with potential for biological control, including commercially available products formulated with this antagonist, as Biotrich. The present study aimed to evaluate the pathogenic potential *in vitro* of *Pythium middletonii* Sparrow and *Pythium dissotocum* Drechsler, isolated from symptomatic hydroponic cultures, in different commercial varieties of lettuce, and also, to evaluate the effect of the biological product commercial Biotrich, in the biological control *in vitro* and *in vivo*. In the evaluation *in vitro*, firstly was verified the pathogenicity of *Pythium middletonii* Sparrow and *P. dissotocum* Drechsler, in four commercial varieties of lettuce, Elisa, Vera, Mimosa and Tainá, afterwards, the effect of the biological product Biotrich in the biological control *in vitro* of *Pythium dissotocum* in two varieties of lettuce, the variety Mimosa and Vera. Seeds of lettuce were placed on the surface of water-agar media, and a plug of mycelium from a representative isolate of each *Pythium* was placed in the center of the petri dish. The experimental design was completely randomized with five replicates being each replicate represented for a petri dish. It was evaluated the hypocotyls, primary root length and the percentage of survivors seedlings after ten days. In the biological tests *in vitro*, petri dishes contained water-agar had received 1mL of suspension contained 0,1; 0,2 and 0,3mL of commercial product for liter of suspension. The concentrations were tested with and without the pathogen and uninoculated seeded dishes served as controls. In the biological control tests *in vivo*, the experimental design was completely randomized following a factorial scheme 2x2x2 (variety x inoculation x product), totalizing eight treatments, each one

carried through with six replicates, being each replicate represented for just one plant. The data was analyzed statistically using variance analysis and test of Tukey with level of 5%. The results had demonstrated that the temperature at 20°C, ideal to the grown lettuce, showed to *P.dissotocum* higher pathogenicity in the varieties of lettuce, and Mimosa variety was considered less susceptible and Vera the most susceptible to the pathogen. The results concerning about the effect of the product Biotrich indicated, the positive effect of the biological product Biotrich in the control of *P. dissotocum in vitro* and *in vivo*, revealing a great effectiveness in the root rot control.

Key-word: *Pythium* spp., pathogenicity, hydroponic system, *Trichoderma* sp.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Hidroponia: Sistemas e Culturas Hidropônicas

A hidroponia (hydro = água e ponos = trabalho) é a ciência de cultivar plantas sem solo, onde as raízes recebem uma solução nutritiva balanceada contendo água e todos os nutrientes essenciais ao desenvolvimento da planta. Apesar de ser uma técnica relativamente antiga, o termo hidroponia só foi utilizado pela primeira vez em 1935 pelo americano Dr. W. F. Gericke, da Universidade da Califórnia. Entretanto, somente na década de 60, com os trabalhos do inglês Allen Cooper, o qual criou a primeira versão do sistema NFT (*Nutrient Film Technique*), percebeu-se que a hidroponia seria uma ótima opção de cultivo em escala comercial. No final da década de 80 a técnica foi mundialmente consolidada, inclusive no Brasil, onde, nos últimos anos, tem sido comum encontrar produtos hidropônicos em supermercados de grandes centros consumidores, sendo o estado de São Paulo o maior produtor (Teixeira-Yañez 2000; Labhidro 2006). Dentre os fatores que contribuíram para uma significativa expansão da hidroponia encontram-se: a produção de hortaliças de ótima qualidade; melhor ergonomia pelo uso de bancadas; melhor aproveitamento de espaço físico, por permitir cultivos sucessivos; a menor incidência de pragas e doenças e, portanto, menor aplicação de tratamentos fitossanitários; maior tempo de prateleira para a comercialização do produto; o melhor controle do meio nutritivo para o crescimento das plantas e o aproveitamento de água e nutrientes (Furlani 1996, Rodrigues 2002, Hidrogood 2007).

Os sistemas hidropônicos podem ser classificados em estáticos (passivos) ou dinâmicos (ativos), em virtude da movimentação da solução nutritiva. O sistema é considerado estático quando a solução nutritiva permanece estática, sendo conduzida às raízes das plantas, geralmente, por capilaridade. No entanto, a grande maioria dos sistemas é do tipo dinâmico, no qual há circulação forçada de água ou de ar para aeração da solução, através de uma bomba. Entre os sistemas dinâmicos, são conhecidos o sistema “floating”, sistema de sub-irrigação, sistema de gotejamento, sistema aeroponia e sistema NFT. Os sistemas hidropônicos podem também ser classificados em sistema fechado ou aberto, sendo fechado quando a solução circula pelo sistema hidropônico e

retorna ao reservatório, responsável pelo armazenamento da solução nutritiva e, aberto, quando a solução nutritiva percorre toda a bancada de cultivo e não retorna ao reservatório (www.hydor.eng.br , Labhidro 2006). No Brasil prevalece o sistema hidropônico NFT (Figura 1), no qual as raízes das plantas são apoiadas em canais estreitos e inclinados, banhados de forma contínua ou intermitente, por solução nutritiva armazenada num reservatório e movimentada ciclicamente por meio de uma bomba de recalque (Teixeira-Yañez 2000).

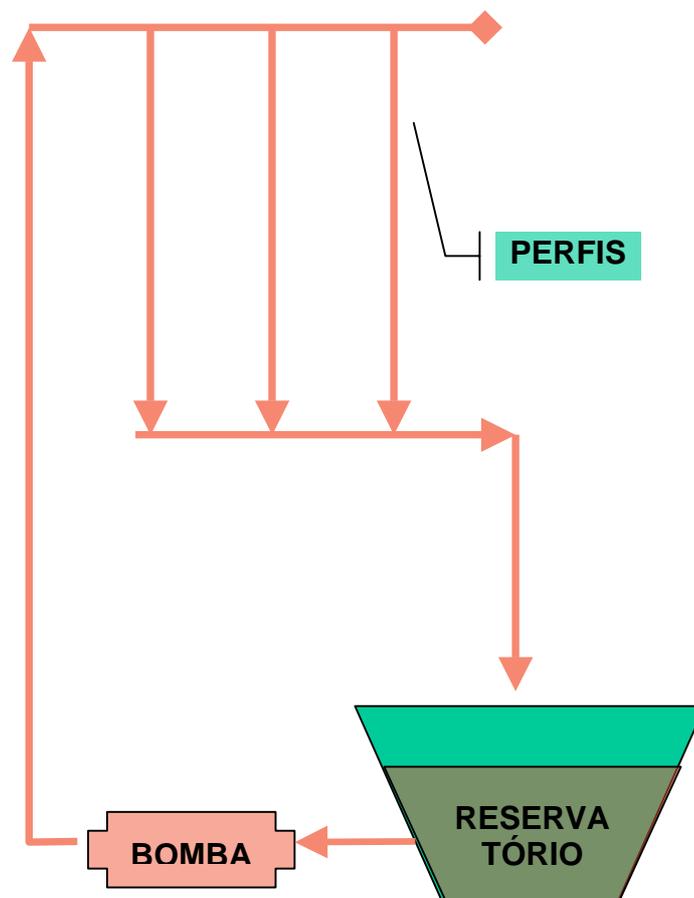


Figura 1. Sistema hidropônico NFT (Técnica do fluxo laminar de nutrientes) (Hidrogood, 2007).

A principal desvantagem para o produtor na utilização do sistema hidropônico NFT, é o alto investimento inicial, devido a necessidade das instalações básicas, composta basicamente pela utilização de estufa, com a finalidade de proteção contra os agentes meteorológicos externos (vento,

chuva e a incidência direta de raios solares); pelo sistema hidráulico, composto pelo reservatório de solução nutritiva e o conjunto moto-bomba (responsável pela circulação da solução nutritiva) e, finalmente, a utilização de perfis e bancadas, local onde as plantas são dispostas para o cultivo. No Brasil, vêm-se utilizando para a montagem dos perfis, tubos de PVC, mas com o avanço da tecnologia foram desenvolvidos perfis hidropônicos fabricados em polipropileno, totalmente atóxicos (Furlani *et al.* 1999, Hidrogood 2007).

Na hidroponia, a qualidade da água é fundamental, pois nela estarão dissolvidos os nutrientes essenciais para a nutrição das plantas, portanto, é importante a análise química (quantidade de nutrientes e salinidade) e microbiológica (coliformes fecais e patógenos), para obter uma água de excelente qualidade (Labhidro 2006). Atualmente, alguns produtores utilizam água proveniente da rede pública de abastecimento, mas, a grande maioria, possui poços artesianos ou semi-artesianos para a captação da água utilizada no sistema hidropônico.

A solução nutritiva é composta de macro e micro-nutrientes, sendo os macronutrientes, o nitrogênio (N), o fósforo (P), o potássio (K), o cálcio (Ca), o magnésio (Mg), e o enxofre (S) e, os micronutrientes, o boro (B), o cloro (Cl), o cobre (Cu), o ferro (Fe), o manganês (Mn), o molibdênio (Mo) e o zinco (Zn) (Furlani *et al.* 1999, Hidrogood 2007). Não existe uma solução nutritiva que seja adequada para todas as culturas, cada espécie e/ou variedade a ser cultivada possui sua própria exigência nutricional. Alguns produtores optam por balancearem suas próprias soluções nutritivas ou utilizam soluções disponíveis comercialmente, já balanceadas. Ressalta-se que a solução utilizada deve passar por um controle rigoroso para que suas características físico-químicas sejam mantidas, sendo necessário fazer periodicamente monitoramento do pH, da temperatura, da oxigenação e da concentração de nutrientes.

No Brasil, as principais culturas produzidas sob hidroponia são a alface (*Lactuca sativa* L.), a abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), o aipo (*Apium graveolens* L.), o agrião (*Lepidium sativum* L.), a cebolinha (*Allium fistulosum* L.), o manjericão (*Ocimum basilicum* L.), a menta (*Mentha piperita* L.), o morango (*Fragaria* spp.), o pepino (*Cucumis sativus* L.), o pimentão (*Capsicum cordiforme*

Mill.), a rúcula (*Eruca sativa* L.), a salsa (*Petroselinum* spp.), o tomate (*Lycopersicon esculentum* P. Miller), entretanto, a alface perfaz a preferência de 90% dos hidroponicultores, pois apresenta ciclo de vida curto, alta produtividade e ampla aceitação no mercado (Furlani 1999, Hidrogood 2007).

1.2. A Cultura da Alface (*Lactuca sativa* L.)

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça folhosa, herbácea, pertencente à família *Cichoriaceae*, de grande aceitação na alimentação humana e fonte de diversas vitaminas (A1, B1, B2 e C) e sais minerais (Cálcio e Ferro) (Menezes *et al.* 2001). Quanto à sua estrutura, a alface é uma planta delicada, com caule diminuto, no qual se prendem as folhas. Estas por sua vez são amplas e crescem em volta do caule (em roseta). Conforme a variedade, a coloração pode ocorrer em vários tons de verde e roxo e, o sistema radicular, é muito ramificado e superficial (Filgueira, 2000). As variedades existentes pertencem a diferentes grupos varietais, com folhas lisas, folhas crocantes e grossas fechando-se em cabeças e, com folhas crespas sem formação de cabeça (Blanco *et al.* 1997).

No sistema hidropônico, a alface é a planta mais cultivada pela Técnica NFT. Isso se deve à sua fácil adaptação ao sistema, no qual tem revelado alto rendimento, com redução do ciclo em relação ao cultivo no solo, melhor aspecto visual, maior durabilidade e facilidade de limpeza do sistema (Ohse *et al.* 2001). O pH da solução nutritiva destinada à cultura de alface deve estar entre 5,5 a 6,5 e, a condutividade elétrica, entre 1,5 a 1,9 mS/cm (Furlani 1994). A temperatura ótima para a germinação de sementes de alface está em torno de 20°C, e a maioria das variedades, não germina em temperaturas superiores a 30°C (Nascimento & Cantlife 2002).

A alface é ainda fitopatologicamente pouco estudada no Brasil (Teixeira *et al.* 2006). Infecções radiculares encontradas nos cultivos hidropônicos são freqüentes e, na maior parte das vezes, causadas por espécies do gênero *Pythium*, extremamente bem adaptadas ao ambiente aquático, no qual encontra condições ideais para a sobrevivência e disseminação de seus esporos. Normalmente causam prejuízos consideráveis nos cultivos hidropônicos, sendo os responsáveis

pelo abandono da atividade de muitos produtores, sendo segundo Vanachter (1995), uma grande limitação à expansão mundial da técnica NFT.

Além de espécies do gênero *Pythium*, vários outros patógenos têm sido detectados em cultivos hidropônicos, bactérias como *Erwinia* spp. e *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith; nematóides como *Meloidogyne* spp.; vírus do mosaico da alface (*Lettuce mosaic virus*, LMV) e, outras espécies de fungos como *Rhizoctonia solani* Kühn, *Cercospora longissima* (Sacc.) Cuccini, *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Bremia lactucae* Regel, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, entre outros (Jenkins & Averre 1983, Lopes & Quezado-Duval 1998, Gomes *et al.* 2004).

1.3. O Gênero *Pythium* Pringsheim - Características Gerais e Classificação

O gênero *Pythium* Pringsheim possui representantes terrestres e aquáticos, parasitas ou sapróbios, sendo a maioria deles cosmopolitas. Segundo Kirk *et al.* (2001), o gênero está compreendido por 127 espécies, das quais muitas são responsáveis por sérios problemas em plantas de interesse econômico, causando apodrecimento de frutas, raízes, troncos e tombamento de pré e pós-emergência (“damping-off”). *Pythium insidiosum* de Cock, Mendoza, Padhye, Ajello & Kaufman é o único representante do gênero responsável pela pitiose, doença que acomete eqüinos, felinos, caninos, bovinos e humanos (Mendonça *et al.* 1996, Santurio *et al.* 1998, Leal *et al.* 2001, Sallis *et al.* 2003, Rech *et al.* 2004, entre outros). Bosco *et al.* (2005), registrou o primeiro caso de pitiose humana no Brasil, na região de Botucatu, São Paulo.

A principal característica morfológica para identificação do gênero *Pythium* é a reprodução assexuada por meio de zoósporos biflagelados, onde a maturação e desenvolvimento dos zoósporos não ocorre dentro do zoosporângio, e sim, no interior de uma vesícula evanescente formada no ápice do tubo de descarga do zoosporângio. A reprodução sexuada é caracterizada pela formação de oogônio (gametângio feminino) e anterídio (gametângio masculino). O esporo originado da reprodução sexual é chamado de oósporo (gameta feminino fecundado) (Alexopoulos *et al.* 1996).

Diversos autores mostraram, ao longo das últimas décadas, uma inconstante e variável classificação do filo Oomycota, ao qual pertence o gênero *Pythium*, com a inserção do filo em diferentes reinos. Sendo assim, o filo tem sido classificado como pertencente ao Reino Fungi (Whittaker 1969, Ainsworth 1973, entre outros), Reino Chromista (Cavalier-Smith 1981, Hawksworth *et al.* 1995, Moore-Landecker 1996, Kirk *et al.* 2001) e Reino Protoctista (Margulis *et al.* 1990). Alexopoulos *et al.* (1996), aceitaram a separação proposta por Patterson (1989) e classificou o filo Oomycota como pertencente ao Reino Stramenopila, baseado em parte, em sua estrutura flagelar, onde os mastigonemas são tripartidos. Entretanto, Dick (2001), renomeou o reino Stramenopila para Straminipila, sob o ponto de vista nomenclatural, o qual é adotado neste trabalho, sendo a classificação do filo, da classe, da ordem e da família, a contida em Alexopoulos *et al.* (1996).

Com a utilização do DNA genômico e mitocondrial nas identificações para níveis de família, gênero e espécie, as técnicas moleculares vêm tornando-se um grande auxílio na taxonomia, através do seqüenciamento de regiões conservadas, como aquelas presentes nos nucleotídeos das regiões internas transcritas (ITS1 e ITS2), dos genes ribossomais (rDNA), as quais são comumente utilizadas para a taxonomia de espécies pertencentes ao gênero *Pythium* (Dick, 2001, Wang *et al.* 2003, Lévesque & de Cock 2004).

1.4. *Pythium*: Fonte de Inóculo, Disseminação, Colonização e Sintomatologia

Em cultivo hidropônico, as espécies de *Pythium* mais comumente citadas, em literatura, são: *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp, *P. dissotocum* Drechsler, *P. intermedium* de Bary, *P. irregulare* Buisman, *P. myriotylum* Drechsler, *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix, *P. ultimum* Trow e *Pythium* grupo F (Stanghellini & Rasmussen 1994, Utkhede *et al.* 2000, Owen-Going *et al.* 2002, Herrero *et al.* 2003).

A principal sintomatologia causada por espécies do gênero *Pythium* é a infecção radicular, destacando-se como uma das principais doenças em cultivos hidropônicos (Bates & Stanghellini,

1984; Chérif & Bélanger, 1992; Favrin *et al.*, 1988; Jenkins Jr. & Averre, 1983; Stanghellini *et al.*, 1988). Estruturas como os zoósporos, oósporos e fragmentos de hifa, podem ser consideradas fontes potenciais de inóculo, atuando no processo de infecção dos hospedeiros. O zoósporo é considerado o inóculo inicial (primário) e, uma das principais estruturas de disseminação do patógeno na cultura hidropônica, podendo ser encontrado na solução nutritiva durante as fases de epidemia de podridão radicular (Menzies *et al.* 1996, Stanghellini *et al.* 1996, Owen-going *et al.* 2002). Os oósporos, caracterizados pela presença de parede dupla, são formados nas raízes infectadas e destacam-se como a principal estrutura de sobrevivência de *Pythium* spp., podendo sobreviver por vários meses em fragmentos de raízes mortas, nas canaletas ou, no encanamento do sistema hidropônico, onde permanecem até o aparecimento de condições favoráveis para sua germinação (Plaats-Niterink 1981, Martin & Loper 1999).

Os inóculos de *Pythium* spp. podem ser introduzidos de diferentes modos para dentro do sistema hidropônico, incluindo, solo contaminado presente em ferramentas, sapatos, poeira; componentes do encanamento do sistema hidropônico; água utilizada no preparo da solução nutritiva; mudas contaminadas e uso de substratos sem esterilização (Martin & Loper 1999, Paulitz & Bélanger 2001, Lopes 2003, Sutton *et al.* 2006). Pequenos dípteros, conhecidos como “fungus gnats” (*Bradysia* spp.) e “shore flies” (*Scatella stagnalis* Fallen.), freqüentemente encontrados em instalações hidropônicas, são considerados importantes vetores de *Pythium*, responsáveis pela disseminação do patógeno em cultivos hidropônicos. Durante o estágio larval, as larvas se alimentam de raízes das plantas e, se estas raízes estiverem infectadas por *Pythium*, os oósporos são ingeridos pela larva, armazenando-os no trato digestivo, onde são transmitidos, via aérea, geralmente em estado viável, pelos adultos (Goldberg & Stanghellini 1990, Jarvis *et al.* 1993). Uma vez introduzido no sistema hidropônico, os inóculos de *Pythium* são dispersos pelo transporte da solução nutritiva, onde a circulação contínua da solução pelo sistema favorece a disseminação do patógeno, podendo infestar e atingir rapidamente todas as plantas do sistema (Stanghellini & Rasmussen 1994).

A infecção das raízes por *Pythium* pode ocorrer através da entrada do patógeno pelas aberturas naturais da planta como hidatários, estômatos ou lenticelas; pela penetração por ferimentos ocasionados pelas práticas agrícolas empregadas pelo homem; por insetos e nematóides e/ou pela penetração direta na superfície do hospedeiro através das estruturas do fungo. Este último processo é iniciado através da quimiotaxia, ocorrendo um movimento direcionado dos zoósporos em direção às raízes, graças à liberação de exsudados pela planta, favorecendo a atração química entre os zoósporos e as raízes das plantas. Em seguida, ocorre o encistamento dos zoósporos na superfície do hospedeiro, sua adesão por meio da liberação de material adesivo produzido pelo patógeno, a produção do tubo germinativo e o desenvolvimento da colônia. Em alguns isolados, as pontas das hifas se modificam em apressórios, estrutura de penetração em forma de “peg”, freqüentemente encontrada em espécies fitopatogênicas, sendo responsáveis pela penetração direta na superfície do hospedeiro. Geralmente, as pontas das raízes, os locais de emergência dos pêlos radiculares, as zonas de alongação das raízes e raízes jovens, são os locais preferenciais para a adesão dos zoósporos e a penetração através das estruturas do fungo, o que pode ser facilitado pela liberação de enzimas pelo patógeno (Plaats-Niterink 1981, Gold & Stanghellini 1985, Sutton *et al.* 2006).

A colonização das raízes de plantas cultivadas em sistemas hidropônicos por *Pythium* spp. apresenta uma fase biotrófica e uma necrotrófica de desenvolvimento (Corrêa 2006). Algumas espécies podem iniciar a infecção através da fase biotrófica, onde as raízes são colonizadas sem o desenvolvimento de sintomas da doença, causando uma redução na produção (Utkhede *et al.* 2000). Segundo Stanghellini & Kronland (1986), essas condições são também chamadas de infecções subclínicas, onde os mesmos autores isolaram diversas espécies de *Pythium* de raízes de alface assintomáticas: *P. dissotocum*, *P. uncinulatum* Van der Plaats-Niterink & Blok, *P. sylvaticum*, *P. irregulare*, *P. violae* Chester & Hickman, *P. catenulatum* Matthews e *P. rostratum* Butler. *P. dissotocum* foi relatada como uma das mais agressivas e predominantes, sendo responsável por prejuízos superiores a 50% na produção, mesmo na ausência de sintomas de podridão radicular.

Na fase necrotrófica, as raízes tornam-se escuras, geralmente com diferentes tonalidades de marrom ou amarelo, dependendo do tipo de hospedeiro e espécies de *Pythium* envolvidas (Sutton *et al.* 2006). Os sintomas na parte aérea das plantas são do tipo reflexo, como murchamento, subdesenvolvimento e diminuição da área foliar (Zheng *et al.* 2000).

Estudos que abordam a presença de *Pythium* em sistemas hidropônicos são ainda escassos no Brasil, embora a presença de seus representantes venha sendo detectada há algum tempo (Teixeira-Yañez 2000). Esta última autora obteve doze isolados de *Pythium* de raízes de alface cultivada em diversos sistemas hidropônicos do estado de São Paulo e da Bahia. Dentre estes, os isolados pertencentes à espécie *P. helicoides* Drechsler foram os mais patogênicos, ocasionando 100% de mortalidade das sementes logo após a germinação. Pinto *et al.* (2005), estudaram a reação de cultivares de alface à podridão de raízes causada por *P. helicoides* em sistemas hidropônicos, concluindo que as cultivares crespas apresentaram menor número de plântulas saudáveis e menor comprimento das raízes e dos hipocótilos, mostrando maior suscetibilidade ao patógeno.

1.5. Fatores que influenciam a ocorrência de podridão radicular

A temperatura do ar tem grande influência na ocorrência de podridão radicular, sendo um dos fatores principais e determinantes sobre a extensão dos danos ocasionados por *Pythium* nas raízes das plantas cultivadas em sistemas hidropônicos. A maior parte das espécies detectadas nestes sistemas é favorecida por elevações de temperatura (Stanghellini & Rasmussen 1994). Segundo Corrêa (2006), verifica-se maior incidência e severidade da doença nos meses de verão, com elevadas temperaturas favorecendo o patógeno e ocasionando o estresse nas plantas, diminuindo então sua resistência natural.

A temperatura do ar influencia diretamente a temperatura da solução nutritiva nos sistemas hidropônicos. De acordo com Bates & Stanghellini (1984), a temperatura da solução nutritiva ocasionou a ocorrência cíclica de duas espécies de *Pythium* em cultivo hidropônico de espinafre (*Spinacea oleracea* L.). *Pythium aphanidermatum* foi o patógeno predominante nos meses de verão,

quando a temperatura da solução nutritiva foi igual ou superior a 23°C e, *Pythium dissotocum* foi a espécie mais agressiva, quando a temperatura variou entre 17 e 22°C. Segundo a Dra. Lynette Morgan, diretora científica da SUNTEC Hydroponic Consultants da Nova Zelândia, as temperaturas ótimas para a maioria das espécies de *Pythium* causarem infecções em plantas estão entre 20° e 30°C (Hydromall 2006).

A suscetibilidade das plantas à podridão radicular de *Pythium* pode também estar baseada na idade da planta e na concentração de oxigênio na solução nutritiva, no qual raízes jovens das plantas são freqüentemente infectadas por zoósporos de *Pythium* e, a baixa concentração dissolvida de oxigênio na solução nutritiva pode predispor o aumento da suscetibilidade das plantas, favorecendo a podridão radicular (Zeroni *et al.* 1983; Chérif *et al.* 1997; Martin & Loper 1999; Kamoun *et al.* 1999). Fatores como o pH e a condutividade podem também influenciar a ocorrência de podridão radicular, onde alterações bruscas nos valores de pH e de condutividade do meio nutritivo (Hidrogood 2007, Beltrão *et al.* 1997), podem alterar a fisiologia das plantas, conseqüentemente causando um estresse e aumentando a suscetibilidade das plantas à podridão radicular de *Pythium*.

1.6. Controle de *Pythium* em sistemas hidropônicos

Diversas medidas são apontadas como métodos culturais para o controle da doença em sistemas hidropônicos, incluindo a irradiação com luz ultravioleta, a filtração, a ozonização (Stanghelini & Rasmussen, 1994), além de tratamentos da solução com compostos à base de cloro e surfactantes. A desinfecção das bancadas entre cada ciclo das culturas (Teixeira-Yañez 2000), é considerada uma medida de extrema importância para a manutenção de uma instalação hidropônica livre de patógenos.

O controle químico é pouco indicado, não havendo, na maioria dos países, produtos registrados para *Pythium* em sistemas hidropônicos, podendo causar fitotoxicidade nas plantas, redução de peso da parte aérea e radicular, além de contaminação do ambiente (Paulitz & Bèlanger 2001, Utkhede *et al.* 2003).

A busca de alternativas para substituir o uso de agroquímicos no controle e manejo de doenças veiculadas, tanto pelo solo como pelo sistema hidropônico, vem sendo abordada em diversos trabalhos (Lifshitz *et al.* 1988, Berry *et al.* 1993, Rankin & Paulitz 1994, Bettioli 1995, Naseby *et al.* 2000, Lenhardt 2000, Cipriano *et al.* 2005, entre outros) com o uso do controle biológico como alternativa, introduzindo para isto, microrganismos antagonistas no controle de fitopatógenos.

Em sistemas hidropônicos, os agentes de biocontrole encontram boas condições para sua atuação e sobrevivência, pois nestes ambientes persiste um número restrito de populações microbianas que favorecem o estabelecimento dos antagonistas. Atualmente, há mais de 80 produtos comerciais formulados com agentes de biocontrole em todo o mundo, sendo a maior parte formulações de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* e fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Gliocladium* (Paulitz & Bélanger 2001). Dentre os biocontroladores mais utilizados estão isolados de *Trichoderma*, gênero com representantes não patogênicos, habitantes do solo e que exercem antagonismo a vários fitopatógenos através do parasitismo e/ou antibiose (Krugner & Bacchi 1995), bem como, por hiperparasitismo (Melo 1996). Além dos efeitos no controle de patógenos, certas linhagens de *Trichoderma* podem ter um efeito direto no crescimento e no florescimento de plantas hortícolas (Baker, 1989). A utilização de *Trichoderma sp.* em semeadura de alface em bandejas acelerou a germinação das sementes, as mudas apresentaram-se vigorosas e uniformes, além de ter reduzido em 90% o surgimento de doenças na cultura quando esta foi levada a campo (Matsumura *et al.* 1998).

Diversos estudos abordam o modo de ação de *Trichoderma spp.* como agente de biocontrole (Papavizas 1985, Chet 1987, Melo 1996). O processo de parasitismo é complexo, envolvendo o tropismo em direção ao fungo hospedeiro, o enrolamento da hifa no mesmo, a degradação da parede e a penetração (Chet 1987). No Brasil, diversas pesquisas utilizando diferentes cepas de *Trichoderma*, estão sendo realizadas, com o objetivo de se estudar o potencial antagonista destas cepas no controle de *Pythium spp.* (Dra. Flávia R. A. Patrício e Dra. Cleusa M. M. Lucon,

comunicação pessoal). Segundo Souza *et al.* (2005), estudos “in vitro” mostraram que isolados de *Trichoderma spp.* beneficiaram plântulas de alface não inoculadas com *Pythium helicoides*, proporcionando maior crescimento das raízes e hipocótilos.

Algumas linhagens de *Trichoderma* têm sido também utilizadas em preparações comerciais (Trichodermil e Biotrich). Segundo comunicação pessoal dos técnicos da Hidrogood, Labhidro e Qualifértil, vários produtores estão utilizando esses produtos na hidroponia. O Biotrich, foi desenvolvido com base no estudo de Lenhardt (2000), o qual avaliou o efeito da aplicação de *Trichoderma sp.* no crescimento de plantas de fumo e no controle de podridões radiculares e tombamento causados por *Rhizoctonia solani* Kühn e *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary. A falta de pesquisa sobre sua aplicação em sistemas hidropônicos impossibilita maiores esclarecimentos sobre sua efetividade no controle de doenças ocasionadas por *Pythium spp.*

Tendo em vista que a alface é uma das hortaliças mais utilizadas na alimentação dos brasileiros, da freqüente presença de isolados de *Pythium* como importantes patógenos em hidroponia, das significantes perdas verificadas em cultivos hidropônicos, a falta de pesquisa sobre o efeito do Biotrich no controle de *Pythium spp.* e, da escassez de dados sobre o assunto no Brasil, o presente estudo teve como objetivos avaliar o potencial patogênico de *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler, espécies isoladas de cultivos hidropônicos sintomáticos, em diferentes variedades comerciais de alface (*Lactuca sativa* L.) (resultados apresentados no Capítulo 1) e, analisar o efeito do Biotrich como controle biológico de *Pythium* em sistemas hidropônicos (resultados apresentados no Capítulo 2 do presente trabalho).

Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em variedades de alface

RESUMO - (Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em variedades de alface). Infecções radiculares encontradas nos cultivos hidropônicos de alface são frequentes e, na maior parte das vezes, causadas por espécies de *Pythium*, extremamente bem adaptadas ao ambiente aquático. Neste estudo, buscou-se avaliar o potencial patogênico *in vitro* de *Pythium middletonii* Sparrow e *P. dissotocum* Drechsler, em quatro variedades comerciais de alface, lisa (Elisa), crespa (Vera), mimosa (Mimosa) e americana (Tainá). Sementes de alface, de cada uma das variedades, foram desinfetadas superficialmente, pré-germinadas por 24 horas e colocadas (sete sementes/placa), na superfície do meio ágar-água. Em seguida, um disco de 6mm diâm. com micélio dos isolados de *Pythium*, foi disposto no centro de cada placa. Placas contendo apenas as sementes de alface serviram como controle. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de petri. Avaliou-se o comprimento dos hipocótilos, das radículas e a porcentagem das plântulas sobreviventes após dez dias de incubação. O experimento foi conduzido em diferentes temperaturas, avaliando a patogenicidade dos isolados na temperatura ideal da alface (20°C), e nas ideais de crescimento dos isolados, 23°C para *P. middletonii* e 27°C para *P. dissotocum*. Os resultados demonstraram que a 20°C, *P. dissotocum* mostrou maior patogenicidade nas variedades de alface do que a apresentada pelo *P. middletonii*, reduzindo significativamente o comprimento dos hipocótilos e, principalmente, das radículas. Para *P. dissotocum*, a temperatura de 27°C provou não ser somente uma temperatura ideal de crescimento para o espécime, como também responsável pela baixa porcentagem de plântulas sobreviventes entre as variedades, sendo que, a porcentagem mais baixa (54%) foi verificada na variedade Vera, considerada a mais suscetível. A variedade Mimosa apresentou maior porcentagem de plântulas sobreviventes e maior comprimento das radículas e hipocótilos, mostrando-se menos suscetível ao patógeno. Esses são os primeiros relatos

no Brasil da presença de *P. middletonii* e *P. dissotocum* em cultivos hidropônicos e, a primeira referência mundial de *P. middletonii* em alface.

Palavras-chaves: *Pythium* spp., *Lactuca sativa* L., hidroponia, patogenicidade

ABSTRACT - (Pathogenic evaluation *in vitro* of *Pythium middletonii* Sparrow and *Pythium dissotocum* Drechsler in varieties of lettuce). *Pythium* spp. are frequently isolated from diseased roots in hydroponically grown lettuce and has been considered one of the most prevalent pathogen in this system where are extremely adapted. The present study aimed to evaluate the pathogenic potential *in vitro* of *Pythium middletonii* Sparrow and *Pythium dissotocum* Drechsler, in four commercial varieties of lettuce, Elisa, Vera, Mimosa and Tainá. Seeds of lettuce, from each one of the varieties, had been disinfected superficially with sodium hypochlorite, pre-germinated by 24 hours in filter paper humidified and placed (seven seeds/preti dish) on the surface of water-agar media, after which, a 6mm diameter plug of mycelium from a representative isolate of each *Pythium* was placed in the center of the petri dish. Uninoculated seeded dishes served as controls. The experimental design was completely randomized with five replicates being each replicate represented for a petri dish. It was evaluated the hypocotyl and primary root length and also the percentage of survivors seedlings after ten days. The experiment was conducted at different temperatures, evaluating the pathogenicity of the isolates in the ideal temperature for the lettuce at 20°C, and also each isolated was evaluated in its ideal temperature of growth, 23°C for *P. middletonii* and 27°C for *P. dissotocum*. The results had demonstrated that the temperature at 20°C, ideal to the grown lettuce, showed to *P.dissotocum* higher pathogenicity in the varieties of lettuce than that presented for the *P. middletonii*, resulted in a significant reduction of hypocotyl length and mainly of the primary roots length. For *P.dissotocum*, the temperature at 27°C, not only proved to be an ideal temperature on the mycelial growth for the specimen, as also a responsible temperature for low the percentage of survivor seedling among the varieties, being that, the lowest percentage (54%), was verified in the variety Vera, considered among the varieties, most susceptible to the *P.*

dissotocum. Mimosa variety presented higher percentage of survivor seedlings and hypocotyl and primary root length, revealing less susceptible to the pathogen. These are the first report of *P. middletonii* and *P. dissotocum* in hydroponics systems for Brazil and the first world-wide reference of *P. middletonii* in hydroponically grown lettuce.

Key-word: *Pythium* spp., *Lactuca sativa* L., hydroponic system, pathogenicity

Introdução

A hidroponia (hydro = água e ponos = trabalho) é uma técnica relativamente antiga, tendo sido o termo hidroponia utilizado pela primeira vez em 1935 pelo americano Dr. W.F. Gericke, da Universidade da Califórnia. Entretanto, somente na década de 60, com os trabalhos do inglês Allen Cooper, o qual criou a primeira versão do sistema NFT (*Nutrient Film Technique*), percebeu-se que a hidroponia seria uma ótima opção de cultivo em escala comercial. A técnica foi mundialmente consolidada no final da década de 80, inclusive no Brasil, onde, nos últimos anos, tem sido comum encontrar produtos hidropônicos em supermercados de grandes centros consumidores, sendo o estado de São Paulo o maior produtor (Teixeira-Yañez 2000, Labhidro 2006).

Entre os fatores que contribuíram para uma significativa expansão da hidroponia encontram-se: a produção de hortaliças de ótima qualidade; o melhor aproveitamento de espaço físico, por permitir cultivos sucessivos; a menor incidência de pragas e doenças e, portanto, menor aplicação de tratamentos fitossanitários; o melhor controle do meio nutritivo para crescimento das plantas e o aproveitamento de água e nutrientes; além da menor contaminação do lençol freático por nitrogênio nítrico e outros elementos químicos, uma vez que a solução nutritiva recircula no sistema (Furlani 1996, Rodrigues 2002).

No Brasil, as principais culturas produzidas sob hidroponia são a alface (*Lactuca sativa* L.), a abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), o aipo (*Apium graveolens* L.), o agrião (*Lepidium sativum* L.), a cebolinha (*Allium fistulosum* L.), o manjericão (*Ocimum basilicum* L.), a menta (*Mentha piperita* L.), o morango (*Fragaria* spp.), o pepino (*Cucumis sativus* L.), o pimentão (*Capsicum cordiforme*

Mill.), a rúcula (*Eruca sativa* L.), a salsa (*Petroselinum* spp.), o tomate (*Lycopersicon esculentum* P. Miller), entretanto, a alface perfaz a preferência de 90% dos hidroponicultores, pois apresenta ciclo de vida curto, alta produtividade e ampla aceitação no mercado (Furlani 1999, Hidrogood 2006).

Apesar das vantagens acima citadas, a alface é ainda fitopatologicamente pouco estudada no Brasil (Teixeira *et al.* 2006). Infecções radiculares encontradas nos cultivos hidropônicos são freqüentes e, na maior parte das vezes, causadas por espécies de *Pythium*, extremamente bem adaptadas ao ambiente aquático, onde encontram condições ideais para a sobrevivência e disseminação de seus esporos. Normalmente causam prejuízos consideráveis nos cultivos hidropônicos, sendo responsáveis pelo abandono da atividade de muitos produtores, sendo segundo Vanachter (1995), uma grande limitação à expansão mundial da técnica NFT.

Em cultivo hidropônico, as espécies de *Pythium* mais comumente citadas, em literatura, são: *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp, *P. dissotocum* Drechsler, *P. intermedium* de Bary, *P. irregulare* Buisman, *P. myriotylum* Drechsler, *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix, *P. ultimum* Trow e *Pythium* do grupo F (Stanghellini & Rasmussen 1994, Utkhede *et al.* 2000, Owen-Going *et al.* 2002, Herrero *et al.* 2003).

Estudos que abordam a presença de *Pythium* em sistemas hidropônicos são ainda escassos no Brasil, embora a presença de seus representantes venha sendo detectada há algum tempo (Teixeira-Yañez, 2000). Teixeira *et al.* (2006) obtiveram doze isolados de *Pythium* de raízes de alface cultivada em diversos sistemas hidropônicos do estado de São Paulo e da Bahia. Dentre estes, os isolados pertencentes à espécie *P. helicoides* Drechsler foram os mais patogênicos, ocasionando 100% de mortalidade das sementes logo após a germinação. Pinto *et al.* (2005), estudaram a reação de cultivares de alface à podridão de raízes causada por *P. helicoides* em sistemas hidropônicos, concluindo que as cultivares crespas apresentaram menor número de plântulas sadias e menor comprimento das raízes e dos hipocótilos, mostrando maior suscetibilidade ao patógeno.

Tendo em vista que a alface é uma das hortaliças mais utilizadas na alimentação dos brasileiros, da freqüente presença de isolados de *Pythium* como importantes patógenos em

hidroponia, das significantes perdas verificadas em cultivos hidropônicos e da escassez de dados sobre o assunto no Brasil, o presente estudo teve como objetivo determinar a temperatura ideal de crescimento e avaliar o potencial patogênico de *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler, espécies anteriormente isoladas de cultivos hidropônicos, em diferentes variedades comerciais de alface (*Lactuca sativa* L.).

Material e Métodos

Caracterização taxonômica de *Pythium dissotocum* e *P. middletonii*

Consultas realizadas na clínica fitopatológica da ESALQ-USP e na Seção de Micologia do Instituto de Botânica pelos agricultores especializados em hidroponia do Estado de São Paulo, possibilitaram o isolamento e a identificação de *Pythium middletonii*, isolado de raízes sintomáticas de alface (*Lactuca sativa* L.) e de *Pythium dissotocum* isolado de raízes sintomáticas de rúcula (*Eruca sativa* L.). O isolamento dos patógenos foi realizado de acordo com metodologia utilizada por Teixeira *et al.* (2006), que consiste na lavagem das raízes necróticas, em água corrente, e posterior transferência de fragmentos radiculares para meio de cultura específico. Após crescidos, os isolados foram transferidos para placa-de-petri esterilizada adicionando água destilada esterilizada e duas metades de sementes previamente fervidas de *Sorghum* sp.

A identificação dos espécimes foi realizada por meio de literatura específica (Middleton 1943, Frezzi 1956, Waterhouse 1967, Plaats-Niterink 1981), levando-se em consideração as características morfológicas dos isolados, como a presença ou não de dilatações hifálicas e haustórios; o tamanho e tipo de zoosporângio; produção e formação dos zoósporos; forma, tamanho e posição de oogônio; tamanho e condição plerótica ou aplerótica de oósporos; forma e origem de anterídio, bem como, o número de anterídios em cada oogônio.

Os espécimes identificados foram preservados em frascos "Wheaton" em câmara fria, com água destilada esterilizada (Milanez 1989) e pelo método de Castellani (Figueiredo 1967). Em

seguida, foram incorporados à Coleção de Culturas da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica, São Paulo (SPC).

Influência da temperatura sobre o crescimento micelial dos isolados

Após purificação dos isolados em CMA + p.p.e. (corn-meal ágar DIFCO acrescido de penicilina, estreptomicina e pimaricina) (Carvalho & Milanez 1989), discos de micélio de 6mm foram retirados e colocados no centro de placas de Petri (90mm) contendo o meio de cultura ágar-água. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento, nas temperaturas de 15°, 20°, 25°, 30°, 35° e 40°C, com três repetições por temperatura. As leituras diárias foram realizadas a partir de 24 horas até o crescimento micelial total nas placas, medindo-se o diâmetro das colônias em 4 direções diametralmente opostas, com o auxílio de uma régua milimetrada, desprezando como leitura o dia em os isolados atingiram a extensão máxima da placa (4,5 cm raio), em virtude de não subestimar a velocidade de crescimento dos isolados.

Para a análise dos resultados foram considerados os diâmetros médios das avaliações, os quais foram representados graficamente, evidenciando o crescimento micelial dos isolados por tempo de incubação (dias) e, a taxa de extensão micelial (cm dia^{-1}) por temperatura de incubação (°C), estabelecendo-se assim, por meio de uma equação de 2º grau, a temperatura ideal de crescimento dos isolados.

Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium middletonii* e *Pythium dissotocum* em quatro variedades comerciais de alface (*Lactuca sativa* L.)

A avaliação da patogenicidade dos espécimes de *Pythium middletonii* e *P. dissotocum* foi realizada, em laboratório, sob diferentes temperaturas, as quais foram determinadas após verificação das temperaturas ideais de crescimento dos patógenos. A temperatura ideal de crescimento

verificada para *P. dissotocum* foi de 27°C e, para *P. middletonii*, de 23°C. Como as temperaturas ideais dos patógenos diferenciaram da temperatura ideal do crescimento da alface, que é de 20°C segundo Nascimento & Cantlife (2002), o experimento foi conduzido em diferentes temperaturas.

A metodologia utilizada para a avaliação patogênica *in vitro* foi a descrita em Teixeira *et al.* (2006), na qual sementes de alface (sete sementes/placa), das variedades Elisa, Tainá, Mimosa e Vera, após desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (três partes de água destilada: uma parte de água sanitária – 0,625 % de cloro ativo) foram pré-germinadas por 24 horas em papel de filtro umedecido e colocadas na superfície de meio de cultura ágar-água, contido em placa de petri. Em seguida, um disco de 6mm de diâmetro contendo micélio dos isolados de *Pythium* crescidos em CMA, foi disposto no centro de cada placa. Placas contendo apenas as sementes de alface em meio de cultura serviram como controle

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de petri. A incubação foi realizada por dez dias, segundo a Dra. Liliane D. D. Teixeira (comunicação pessoal), tempo ideal para o aparecimento de sintomatologia, utilizando para isso, câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas. A verificação da suscetibilidade das variedades de alface foi realizada concomitantemente, medindo-se, o comprimento dos hipocótilos e das radículas através de uma régua graduada em centímetros e avaliando, a porcentagem das plântulas sobreviventes, segundo metodologia utilizada por Pinto *et al.* (2005). Os resultados foram analisados estatisticamente, utilizando-se para isto, análise de variância e teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises efetuadas constam no anexo 1.

Resultados e Discussão

Caracterização taxonômica de *Pythium dissotocum* e *Pythium middletonii*

Os espécimes de *Pythium dissotocum* e *P. middletonii*, isolados de culturas hidropônicas sintomáticas, são descritos, comentados e ilustrados abaixo.

Pythium dissotocum Drechsler, Journal of the Washington Academy of Science 20: 402 1930.

(Figura 1)

Micélio: Colônias em CMA sem padrão definido. Apressórios originados terminalmente, simples, clavados e curvados, abundantes em meio de cultura e em água em sementes de sorgo. O espécime estudado possui crescimento limitado em sementes de sorgo quando observadas em água.

Reprodução Assexuada: Zoosporângio filamentosos não inflado; tubo de descarga longo. Zoósporos encistados 5 – 9 μm (média 8,5 μm diâm.).

Reprodução Sexuada: Oogônio liso, terminal ou intercalar, 17,5 – 25 μm diâm (média 21 μm); parede lisa, algumas vezes papilada. Anterídios presentes; ramos anteridiaes monóclinos, alguns díclinos, 1 a 4 por oogônio, normalmente 1 a 2, freqüentemente séssil, originando-se próximo ao oogônio; células anteridiaes clavadas e encurvadas (“crook-necked”). Oósporos apleróticos, alguns pleróticos, esféricos, 12 – 22,5 μm diâm (média 18,5 μm .); com alguns vacúolos refringentes esféricos e subesféricos, 2 a 6 por oogônio; parede lisa, 1,5 – 2,5 μm de espessura.

Material examinado: Espécime isolado de raízes sintomáticas de rúcula (*Eruca sativa* L.) hidropônica, da região de Taubaté, São Paulo. SPC n° 1989.

As características do espécime estão de acordo com as descritas por Middleton (1943), Frezzi (1956), Waterhouse (1967) e Plaats-Niterink (1981). A reprodução sexual da espécie apresenta um comportamento bastante inconstante com relação à produção de oogônios e oósporos, fato também observado por Drechsler (1930) e Frezzi (1956). A origem do ramo anteridial é também uma característica freqüentemente difícil de ser visualizada, tanto em colônias observadas em meio de cultura quanto na cultura em água, nos quais, na maioria das vezes, o ramo anteridial é relativamente curto e/ou a célula anteridial é séssil. Esta é a primeira citação de *Pythium dissotocum* para o Brasil e o primeiro relato da espécie em cultivos hidropônicos.

Patogenicidade no Brasil: Não relatada

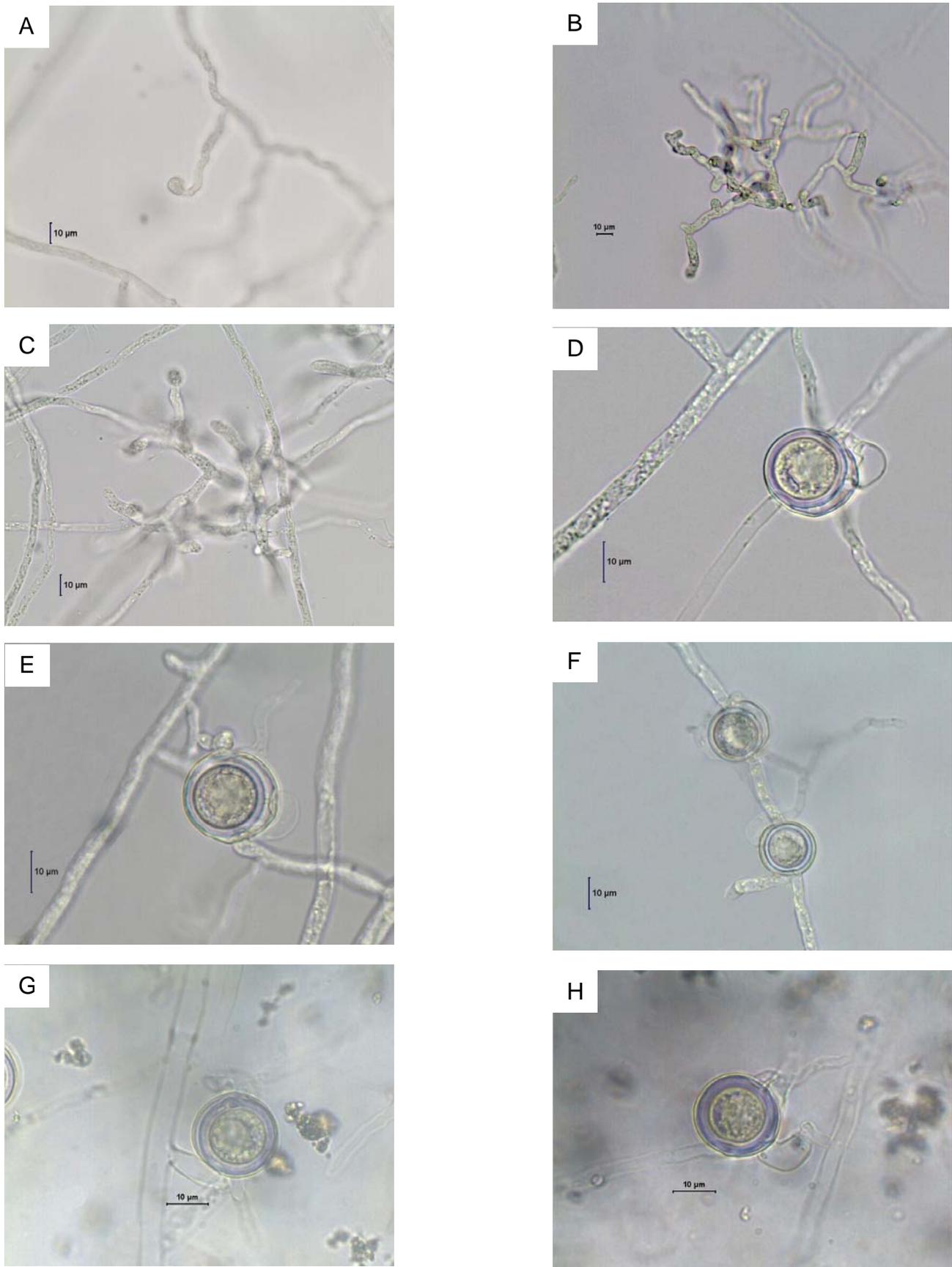


Figura 1. *Pythium dissotocum* A-H: A. Apressório. B-C. Zoosporângio filamentoso não inflado. D. Oogônio intercalar com anterídio monóclino. E. Visualização do tubo de fertilização anteridial. F. Oogônios catenulados. G. Oogônio com oosporo e anterídio díclino sésseil. H. Oogônio com oosporo e anterídio díclino.

Pythium middletonii Sparrow, Aquatic Phycomycetes, p. 1038. 1960.

(Figura 2)

Micélio: Colônias em CMA apresentando padrão de crescimento radial. Apressórios simples, terminais e globosos.

Reprodução Assexuada: Zoosporângio esférico, 17,5 – 33 μm diâm. (média 24 μm), terminais ou intercalares, alguns limoniformes, elipsoidais e ovais, 12,5 – 40 x 11,5 – 25 μm (média 25 x 18 μm); proliferação interna presente; tubo de liberação curto de até 5 μm . Zoosporos encistados, 6,5 – 8 μm diâm (média 7 μm).

Reprodução Sexuada: Oogônio intercalar, lateral e terminal, ocasionalmente catenulado, liso, esférico, 15 – 32 μm diâm (média 23 μm), com 1 a 2 oósporos. Anterídios presentes, 1 a 2 por oogônio; ramos anteridiais monóclinos, díclinos ou hipóginos, algumas vezes sésseis, simples ou ramificados; células anteridiais simples ou clavadas; atracação apical. Oósporos appleróticos, alguns pleróticos, esféricos, 12,5 – 26 μm diâm (média 19 μm); parede lisa, 2 μm de espessura, contendo apenas um simples vacúolo refringente.

Material examinado: isolado de raízes sintomáticas de alface (*Lactuca sativa* L.) hidropônica da região de Pindamonhangaba, São Paulo. SPC nº 1970.

As características do espécime observado concordam com a descrição de Middleton (1943), Plaats-Niterink (1981), Pires-Zottarelli (1999) e Rocha *et al.* (2001), entretanto, a ocorrência de mais de um oósporo por oogônio no espécime estudado não é uma característica relatada por nenhum dos autores, apenas fato ilustrado por Plaats-Niterink (1981). Outra anomalia observada no espécime estudado e não descrita por nenhum outro autor, foi a formação de oogônios dentro de zoosporângios. Este é o primeiro relato no Brasil da presença de *Pythium middletonii* em cultivos hidropônicos e a primeira referência mundial em alface.

Patogenicidade no Brasil: Não relatada

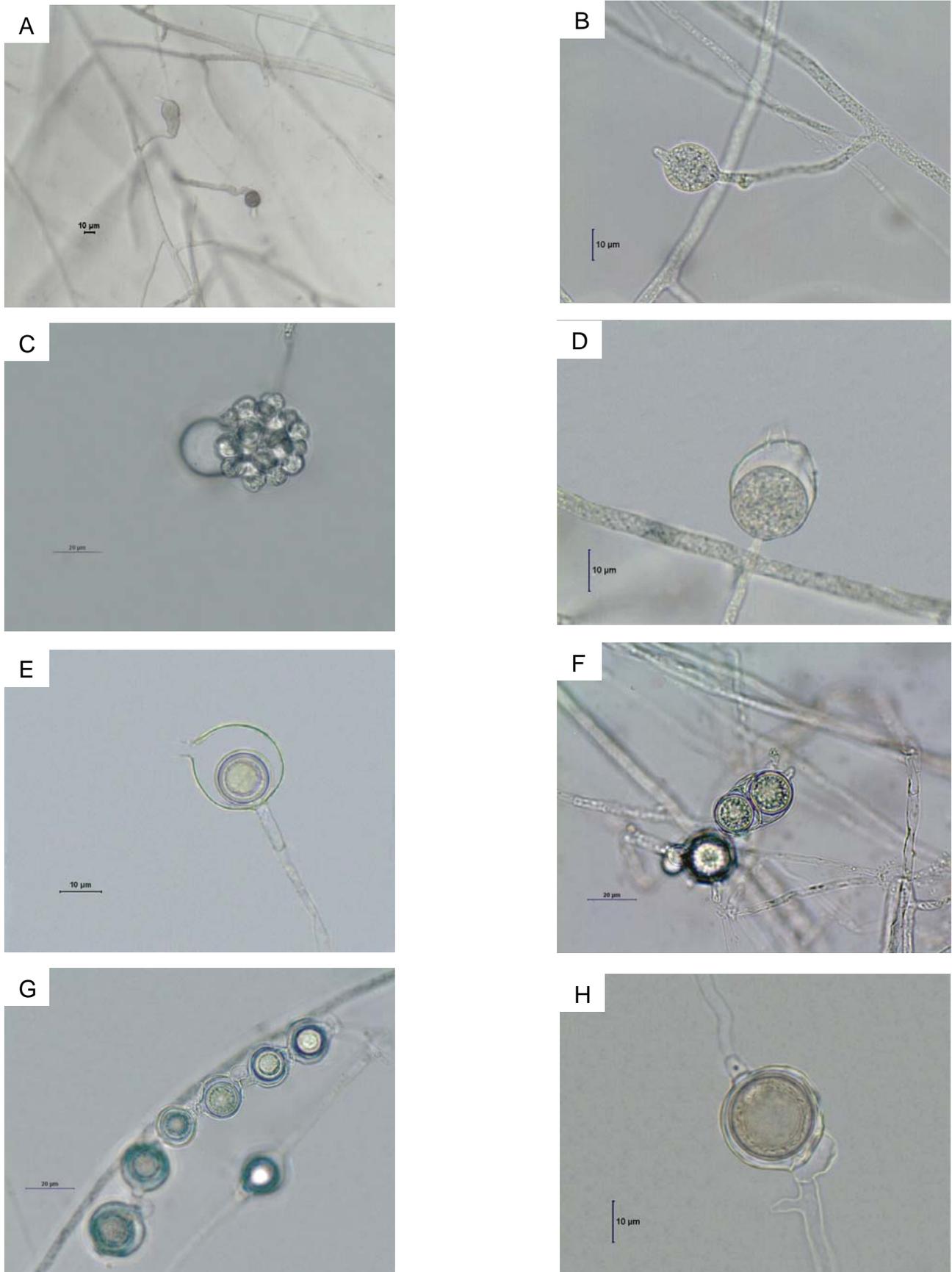


Figura 2. *Pythium middletonii* A-H: A. Apressórios. B. Zoosporângio. C. Liberação dos zoósporos. D. Proliferação interna do zoosporângio. E. Formação de oogônio dentro do zoosporângio. F. Formação de dois oósporos por oogônio. G. Oogônios catenulados. H. Oogônio intercalar com anterídio monóclino sésstil.

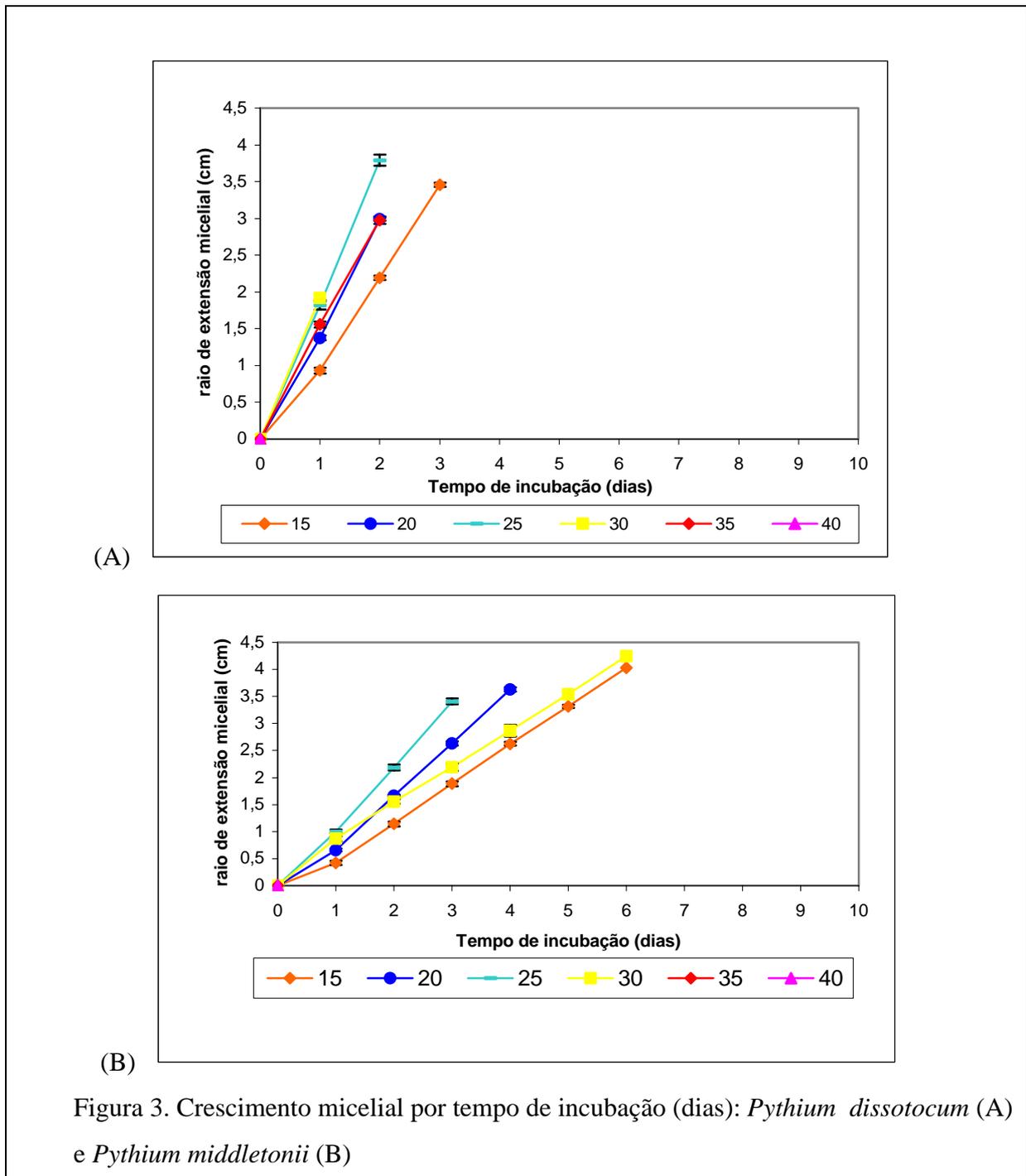
Influência da temperatura sobre o crescimento micelial dos isolados

A influência da temperatura sobre o crescimento micelial dos isolados foi avaliada por meio do crescimento micelial por tempo de incubação (dias) (Figura 3) e pela taxa de extensão micelial (cm dia^{-1}) por temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (Figura 4). A temperatura demonstrou ser um fator importante, influenciando nas diferenças obtidas entre o crescimento ideal e máximo dos espécimes estudados, sendo que, em todas as temperaturas avaliadas, observou-se um crescimento superior do isolado de *P. dissotocum* em relação ao de *P. middletonii*. A temperatura ideal de crescimento verificada para *P. dissotocum* foi de 27°C e a máxima de 35°C ; para *P. middletonii*, a temperatura ideal foi de 23°C e a máxima de 30°C . Não houve crescimento micelial de *P. middletonii* nas temperaturas de 35° e 40°C , enquanto *P. dissotocum* não cresceu a 40°C .

Avaliando o crescimento micelial por tempo de incubação (Figura 3), *P. dissotocum* na temperatura de 15°C , atingiu a extensão máxima das placas em três dias, enquanto na mesma temperatura, *P. middletonii*, desenvolveu-se mais lentamente, finalizando em seis dias de incubação. Para ambos os isolados, a temperatura de 15°C , provou ser a temperatura na qual os espécimes cresceram relativamente devagar, sendo necessário mais tempo de incubação para atingirem a extensão máxima das placas.

Observou-se que as temperaturas de 20 , 25 e 35°C , proporcionaram um rápido crescimento micelial para *P. dissotocum*, o qual em apenas dois dias de incubação, atingiu o crescimento total nas placas. Para *P. middletonii*, houve um significativo aumento no crescimento, quando avaliado nas temperaturas de 20 e 25°C , completando o crescimento total nas placas em quatro e três dias, respectivamente. Para o isolado de *P. middletonii*, a temperatura de 25°C , foi responsável pelo crescimento total das placas em menos dias, quando comparada com as demais temperaturas testadas.

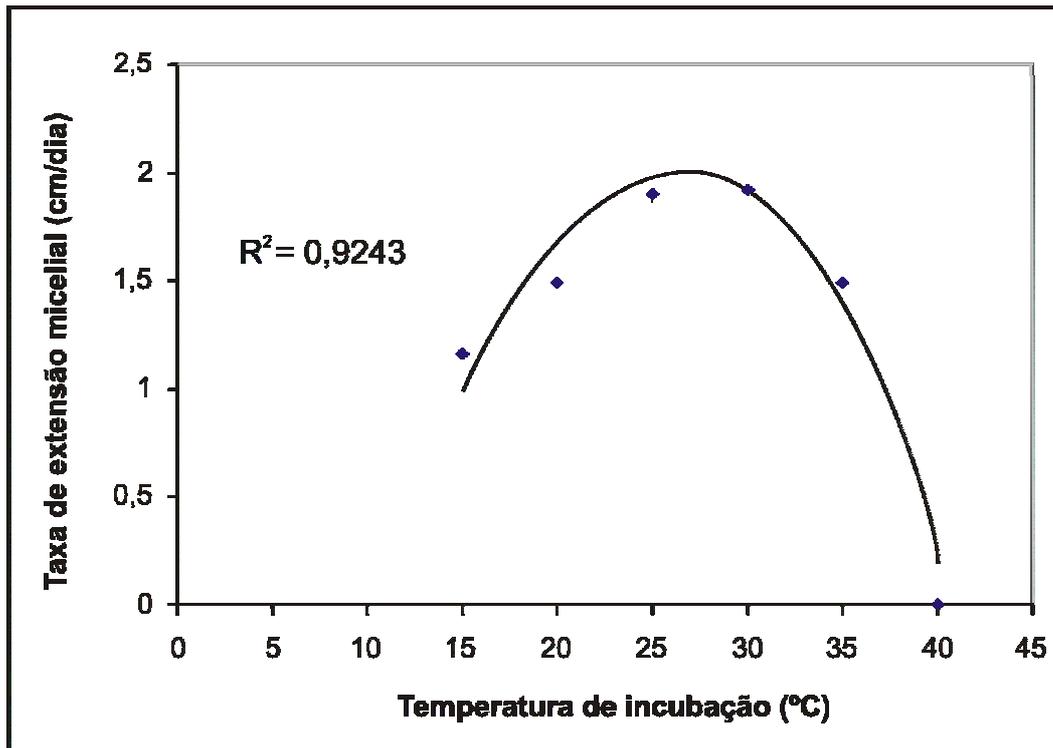
Assim como na temperatura de 15°C, *P. middletonii* desenvolveu-se mais lentamente também na temperatura de 30°C, finalizando o crescimento total nas placas em seis dias de incubação. Na mesma temperatura, *P. dissotocum* atingiu o crescimento total nas placas em apenas um dia, evidenciando que, essa temperatura foi responsável pelo rápido crescimento do isolado, atingindo a extensão máxima das placas em menos dias, quando comparada com as demais temperaturas testadas.



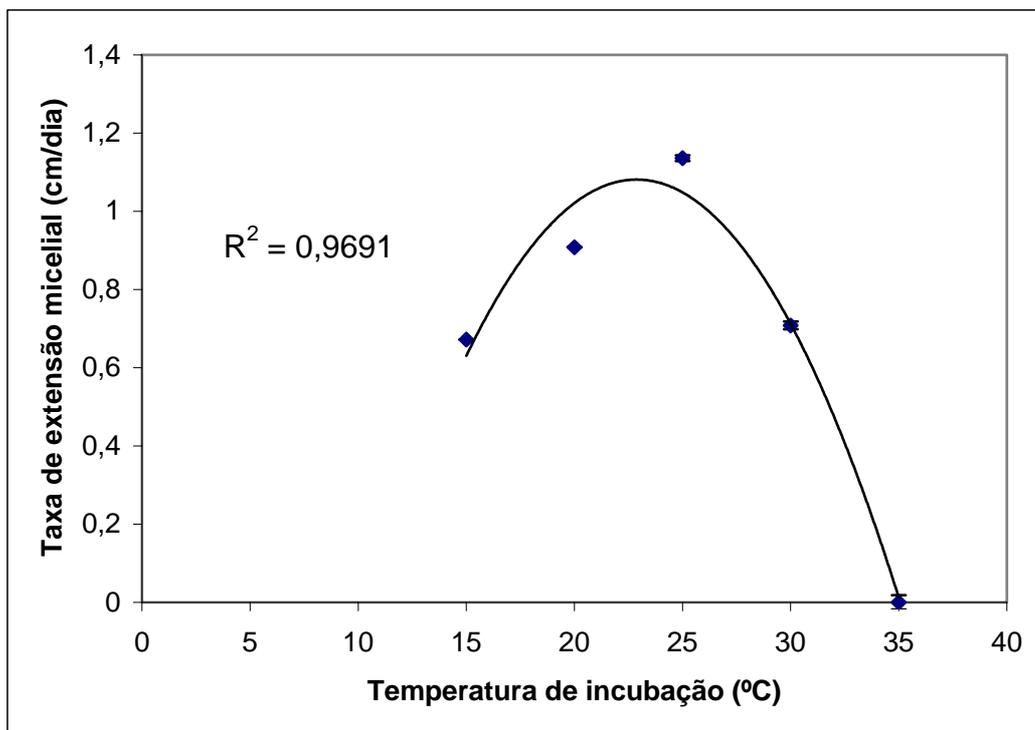
A influência da temperatura de incubação sobre a taxa de extensão micelial diária (Figura 4), mostrou a elevada capacidade do *P. dissotocum* em desenvolver-se bem em diversas temperaturas, apresentando um maior crescimento do que o isolado de *P. middletonii* em todas as temperaturas avaliadas. *P. middletonii* restringiu-se a uma pequena faixa ótima de crescimento entre 20° e 25°C, visto que, nas temperaturas de 15° e 30°C, o isolado desenvolveu-se mais lentamente.

P. dissotocum obteve as maiores taxas de extensão micelial dentre as temperaturas avaliadas. Na temperatura de 15°C, *P. dissotocum* exibiu a menor taxa de extensão micelial para o isolado, de 1,2 cm dia⁻¹, enquanto nas temperaturas de 25 e 30°C obteve as maiores taxas de extensão, de 1,9 cm dia⁻¹. *P. middletonii*, na temperatura de 25°C, obteve a maior taxa de extensão micelial, de 1,1 cm dia⁻¹ e, nas temperaturas de 15 e 30°C, as menores taxas de extensão, de 0,7 cm dia⁻¹.

Tanto para o isolado de *P. dissotocum* que não cresceu na temperatura de 40°C, quanto para o isolado de *P. middletonii* que não cresceu em 35° e 40°C, testes foram realizados transferindo as placas dos isolados não crescidos, para as respectivas temperaturas ideais de crescimento, 23°C para *P. middletonii* e 27°C para *P. dissotocum*, a fim de verificar se as temperaturas de 35° e 40°C ocasionaram apenas a inibição do crescimento ou a morte dos espécimes. A temperatura de 35°C para *P. middletonii*, e 40°C para *P. dissotocum* mostraram ser apenas temperaturas de inibição e não de morte para os isolados, observando que estes cresceram após 10 dias de incubação. A temperatura de 40°C ocasionou a morte do isolado de *P. middletonii*, verificando que o isolado não cresceu mesmo quando transferido para sua temperatura ideal de crescimento. Pode-se dizer que, em alguns casos, o não crescimento em determinadas temperaturas não evidencia a morte do fungo e, sim, sua inibição de crescimento.



(A)



(B)

Figura 4. Influência da temperatura de incubação sobre a taxa de extensão micelial diária: *Pythium dissotocum* (A) e *Pythium middletonii* (B)

No Brasil, poucos são os trabalhos desenvolvidos sobre a influência da temperatura no crescimento micelial de *Pythium*. Teixeira *et al* (2006) estudaram a influência da temperatura sobre o crescimento micelial de três isolados de *Pythium helicoides* Drechsler (H₁, H₂ e H₃), cinco isolados pertencentes ao grupo F (F₁ a F₅) e quatro ao grupo T (T₁ a T₄), concluindo que a faixa de temperatura ótima para o crescimento micelial abrangeu desde 24 a 37°C para os isolados de *P. helicoides* e de 21 a 30°C para os isolados de *Pythium* pertencentes aos grupos F e T, com exceção de F₄, que exibiu ótimo de temperatura entre 25 e 35°C.

Middletoni (1943) estudou o efeito de diversas temperaturas no crescimento micelial de espécies de *Pythium* crescidas em CMA. Entre elas, determinou a temperatura ideal de crescimento para *Pythium dissotocum* (28°C) e a máxima de 34°C, o autor não verificou a temperatura de crescimento para *P. middletonii*. Não houve diferença significativa entre as temperaturas apresentadas pelo autor e o espécime de *P. dissotocum* aqui estudado.

Avaliando o crescimento micelial de espécimes de *Pythium* crescidos em BCA (batata-cenoura-ágar), Plaats-Niterink (1981) verificou que a temperatura ótima de crescimento para *P. dissotocum* está compreendida entre 20 – 25°C, com máxima de 35°C e, para *P. middletonii*, a temperatura ótima está entre 25 – 30°C, com máxima de 35°C. Os espécimes de *P. dissotocum* e de *P. middletonii* aqui estudados, não obtiveram temperaturas ideais de crescimento semelhantes às apresentadas por Plaats-Niterink (1981). Normalmente diferenças no crescimento micelial ocorrem entre os diferentes espécimes de *Pythium*, principalmente levando-se em consideração os diferentes meios de cultura utilizados para este fim.

Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium middletonii* e *Pythium dissotocum* em quatro variedades comerciais de alface (*Lactuca sativa* L.)

O efeito da temperatura, sobre o potencial patogênico, demonstrou resultados significativos para os isolados estudados. Na temperatura de 20°C, ideal para o crescimento da alface, avaliando-

se o comprimento da radícula (Tabela 1A), a variedade Mimosa foi considerada a menos suscetível ao *P. dissotocum* (Figura 5A), enquanto que a variedade crespa (Vera), a variedade americana (Tainá) e a variedade lisa (Elisa), foram as mais suscetíveis. Apesar de não haver diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade entre as três variedades mais suscetíveis, as variedades Vera (Figura 5B) e Tainá, apresentaram menores valores de comprimento de radícula, 0,88 e 0,82 cm, respectivamente, do que os apresentados pela variedade Elisa, 1,10 cm. Quando considerado o comprimento do hipocótilo (Tabela 1B), a variedade Mimosa (Figura 5A) e a variedade Tainá foram as menos suscetíveis e, as variedades Vera (Figura 5B) e Elisa, as mais suscetíveis.

Para o isolado de *P. middletonii*, quando avaliado o comprimento da radícula (Tabela 1A), a variedade Mimosa diferiu estatisticamente das demais variedades testadas, sendo assim considerada a menos suscetível (Figura 5C) e a variedade Tainá foi considerada a mais suscetível ao patógeno, pois, além da diferença estatística com relação as demais variedades, apresentou o menor valor de comprimento da radícula, 1,94 cm. Quanto ao comprimento do hipocótilo (Tabela 1B), a variedade Mimosa (Figura 5C) foi também considerada a menos suscetível, enquanto que, diferenças estatísticas nas foram verificadas entre as variedades Vera (Figura 5D), Tainá e Elisa. No entanto, a variedade Vera foi considerada a mais suscetível, pois o tratamento inoculado com a variedade, diferenciou estatisticamente da testemunha controle, enquanto, as variedades Tainá e Elisa não diferiram estatisticamente das testemunhas.

Avaliando-se o comprimento da radícula, na temperatura de 20°C, foi possível observar que os tratamentos inoculados com os espécimes de *P. dissotocum* e *P. middletonii*, diferiram estatisticamente das testemunhas, apresentando patogenicidade em relação as variedades estudadas, embora, *P. dissotocum*, mostrou maior severidade da doença do que as apresentadas pelo *P. middletonii*, exibindo traços de necrose nas radículas e redução considerável no comprimento das mesmas.

Tabela 1. Avaliação Patogênica *in vitro* de *P. dissotocum* e *P. middletonii* na temperatura de 20°C referente ao comprimento da radícula (A) e do hipocótilo (B).

COMPRIMENTO RADÍCULA (cm)				
Variedades	MIMOSA	VERA	TAINÁ	ELISA
Patógenos				
Controle	6,34dC	4,72bC	3,28aC	5,68cC
<i>P.dissotocum</i>	1,92bA	0,88aA	0,82aA	1,10aA
<i>P.middletonii</i>	4,66cB	3,68bB	1,94aB	3,58bB

COMPRIMENTO HIPOCÓTILO (cm)				
Variedades	MIMOSA	VERA	TAINÁ	ELISA
Patógenos				
Controle	0,84bB	0,58aC	0,54aA	0,50aB
<i>P.dissotocum</i>	0,48bA	0,26aA	0,48bA	0,22aA
<i>P.middletonii</i>	0,80bB	0,42aB	0,52aA	0,48aB

Obs: minúscula comparada na horizontal e maiúscula comparada na vertical
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Através da visualização da sintomatologia, foi possível verificar, em todas as variedades, que o isolado de *P. dissotocum* foi o mais agressivo, sendo responsável pela inibição da formação de raízes laterais e necrose acentuada da raiz principal, enquanto para *P. middletonii* não foi observada sintomatologia nas variedades analisadas. Tanto o isolado de *P. dissotocum*, como o de *P. middletonii*, não ocasionaram a morte das plântulas inoculadas à 20°C e, todas as plântulas não inoculadas com os patógenos exibiram desenvolvimento normal de crescimento (Figuras 5E, 5F).

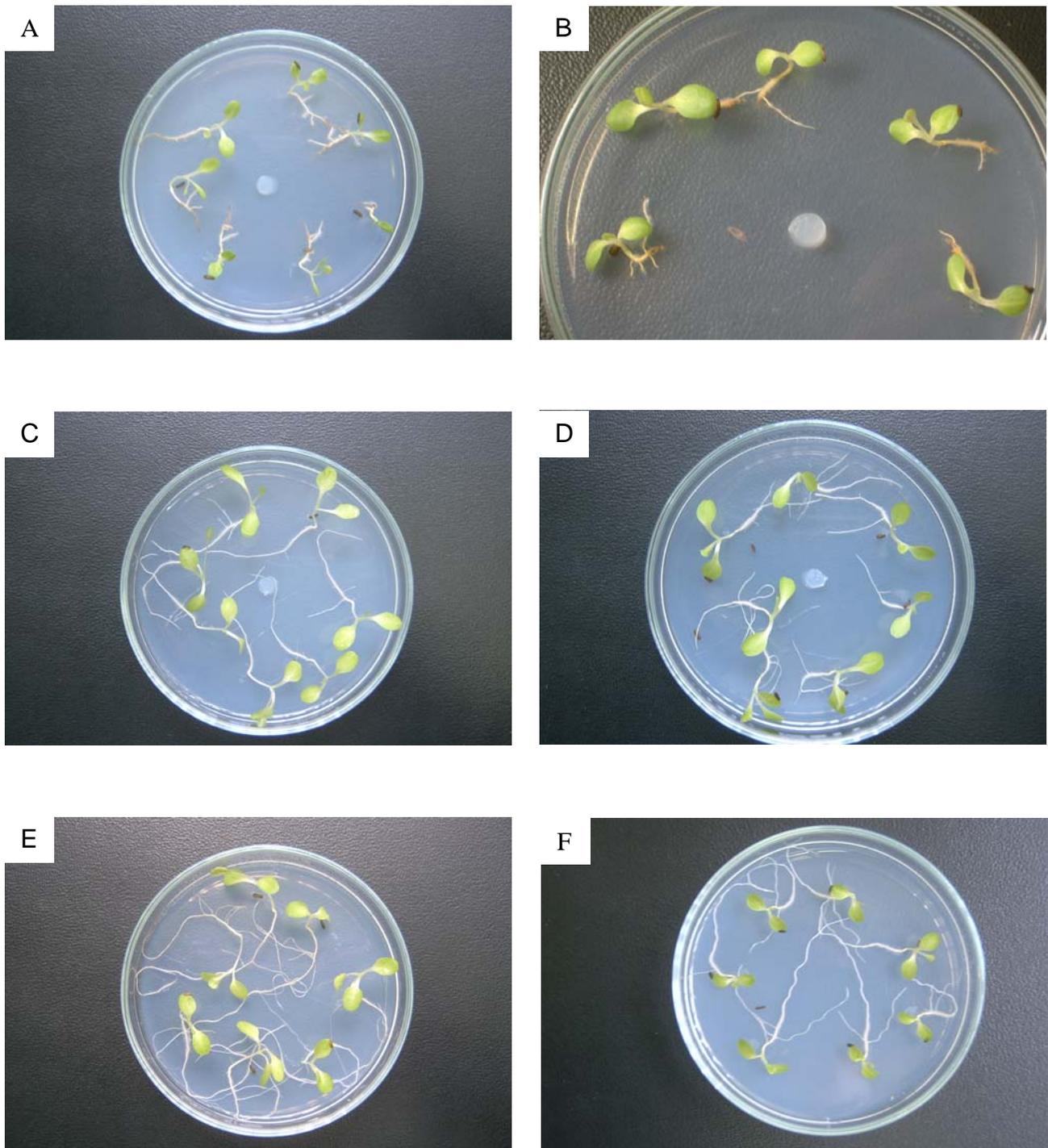


Figura 5. Avaliação Patogênica *in vitro* na temperatura de 20°C A-F: A. *Pythium dissotocum* - variedade Mimosa B. *P. dissotocum* - variedade Vera C. *Pythium middletonii* - variedade Mimosa. D. *P. middletonii* - variedade Vera. E. Placa controle - variedade Mimosa. F. Placa controle - variedade Vera.

Mesmo quando avaliado em sua temperatura ideal de crescimento (23°C), *P. middletonii* provocou uma redução no comprimento das radículas e hipocótilos em todas as variedades analisadas (Tabelas 2A, 2B), mas nenhuma sintomatologia, como inibição da formação de raízes laterais ou necrose nas raízes. Diante dos dois parâmetros avaliados, a variedade Mimosa foi considerada a menos suscetível, e as variedades Vera, Tainá e Elisa as mais suscetíveis, com a variedade Vera diferindo do tratamento controle.

Tabela 2. Avaliação Patogênica *in vitro* de *P. middletonii* na temperatura de 23°C referente ao comprimento da radícula (A) e do hipocótilo (B).

COMPRIMENTO RADÍCULA (cm)				
Variedades	MIMOSA	VERA	TAINÁ	ELISA
Patógeno				
Controle	5,72bA	6,16bB	4,00aA	5,58bB
<i>P.middletonii</i>	5,24bA	3,86aA	3,70aA	4,22aA

COMPRIMENTO HIPOCÓTILO (cm)				
Variedades	MIMOSA	VERA	TAINÁ	ELISA
Patógeno				
Controle	0,92bB	0,46aB	0,44aA	0,40aA
<i>P.middletonii</i>	0,80bA	0,34aA	0,40aA	0,44aA

Obs: minúscula comparada na horizontal e maiúscula comparada na vertical
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Para *P. dissotocum*, a temperatura de 27°C (Figuras 6A, 6B), provou não ser somente a temperatura ideal de crescimento para o espécime, como também, temperatura responsável pela baixa porcentagem de plântulas sobreviventes entre as variedades, sendo que, a porcentagem mais baixa (54%), foi verificada na variedade Vera, considerada entre as variedades, a mais suscetível ao *P. dissotocum* (Tabela 3A, 3B, 3C). A variedade Mimosa apresentou maior porcentagem de plântulas sobreviventes e maior comprimento das radículas e hipocótilos, mostrando-se menos suscetível ao patógeno.

A severidade da doença foi significativamente mais elevada na temperatura de 27°C, mostrando, em todas as variedades, uma grande agressividade do espécime, ocasionando inibição da formação de raízes laterais, necrose das pontas das raízes principal e laterais e, necrose acentuada na raiz principal. As plântulas não inoculadas foram menores que aquelas cultivadas a 20°C, apresentando um bom desenvolvimento, porém com uma menor quantidade de raízes laterais, evidenciando que em temperaturas mais altas, as plântulas de alface começam a apresentar menor índice de desenvolvimento.

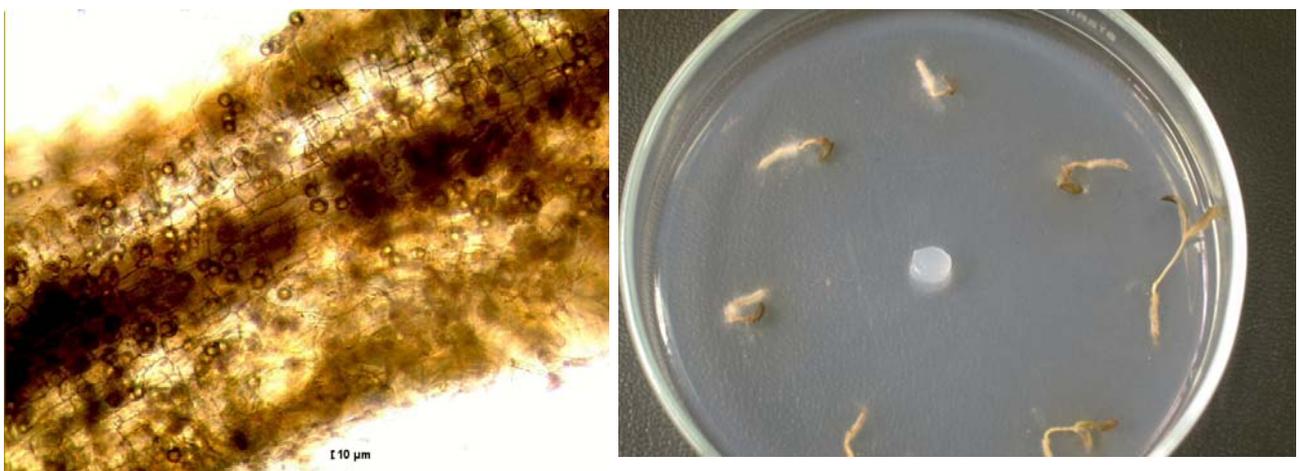


Figura 6. Avaliação patogênica *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C (Variedade Vera): A. Oogônios na raiz. B. Plântulas mortas em uma das repetições.

Tabela 3. Avaliação Patogênica *in vitro* de *P. dissotocum* na temperatura de 27°C referente ao comprimento da radícula (A), do hipocótilo (B) e plântulas sobreviventes (C).

COMPRIMENTO RADÍCULA (cm)				
Variedades Patógeno	MIMOSA	VERA	TAINÁ	ELISA
Controle	4,88bB	4,22bB	2,86aB	4,54bB
<i>P.dissotocum</i>	1,88bA	0,54aA	0,76aA	0,98aA

COMPRIMENTO HIPOCÓTILO (cm)				
Variedades Patógeno	MIMOSA	VERA	TAINÁ	ELISA
Controle	0,88bB	0,46aB	0,50aB	0,50aB
<i>P.dissotocum</i>	0,46bA	0,24aA	0,31aA	0,26aA

PLÂNTULAS SOBREVIVENTES (%)				
Variedades Patógeno	MIMOSA	VERA	TAINÁ	ELISA
Controle	100aA	100aB	100aB	100aA
<i>P.dissotocum</i>	88,57bA	54,28aA	68,57abA	85,71bA

Obs: minúscula comparada na horizontal e maiúscula comparada na vertical
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Os parâmetros avaliados (comprimento da radícula, do hipocótilo e plântulas sobreviventes) foram bastante apropriados para os resultados obtidos na avaliação patogênica *in vitro*, pois, segundo Teixeira *et al.* (2006), a massa fresca das plântulas inoculadas não foi um parâmetro adequado para a avaliação da patogenicidade *in vitro*, evidenciando pouquíssimas diferenças entre os tratamentos.

No presente estudo, o isolado *P. middletonii* provocou uma redução no comprimento das radículas e hipocótilos mesmo na ausência de sintomas de podridão radicular. Segundo Stanghellini & Kronland (1986), essas condições são chamadas de infecções subclínicas, levando a uma redução no desenvolvimento da planta, sem a exibição de sintomas óbvios da doença.

A influência da temperatura nos espécimes de *Pythium* é um fator estudado por diversos autores (Middleton 1943, Frezzi 1956, Plaats-Niterink 1981, Owen-Going *et al.* 2002, Herrero *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2006) podendo estar relacionada com o crescimento micelial, formação das estruturas reprodutivas, patogenicidade e desenvolvimento de doenças radiculares. Segundo Ribeiro (1993), a temperatura é um parâmetro crítico para o desenvolvimento de propágulos infectivos de fitopatógenos, e apesar da maioria das espécies crescer bem em uma extensa faixa de temperatura, as condições ótimas para o desenvolvimento de doenças são encontradas em uma restrita faixa.

De acordo com Plaats-Niterink (1981), a influência da temperatura na patogenicidade e severidade de doença, pode depender tanto de variações entre as espécies e espécimes de *Pythium*, quanto aos hospedeiros envolvidos.

Ingram e Cook (1990) estudaram o efeito da temperatura na incidência de “damping-off” de pré-emergência em diversos hospedeiros, com *P. ultimum* var. *sporangiferum* causando “damping-off” em trigo (*Triticum aestivum* L.) nas temperaturas compreendidas entre 15 e 25°C, em lentilhas (*Lens culinaris* Medik.) entre 10 e 25°C e, em ervilhas (*Pisum sativum* L.) entre 5 e 25°C. Esses autores concluíram que, a manifestação da doença causada por um mesmo espécime de *Pythium*, depende da temperatura e dos hospedeiros envolvidos.

Ploetz (2004) investigou no sul da Flórida, o impacto da temperatura na ocorrência de infecções radiculares causadas por *Pythium splendens* em carambola (*Averrhoa carambola L.*), concluindo que grandes infecções de raízes ocorreram entre 15 e 20°C, bem abaixo da temperatura ideal verificada para o crescimento do isolado (30°C).

Plaats-Niterink (1981) relata, “Quando condições são favoráveis para o fungo, mas não são favoráveis para o hospedeiro, espécies de *Pythium* podem tornar-se muito patogênicas”. Isto reflete claramente as condições demonstradas no presente estudo, onde em condições desfavoráveis para o crescimento da alface, *P. dissotocum*, em sua temperatura ideal de crescimento (27°C), mostrou uma grande patogenicidade.

A grande maioria dos trabalhos de patogenicidade, com espécies de *Pythium* em cultura de alface, é realizado sob condições *in vivo*, sendo poucos *in vitro*. Stanghellini & Kronland (1986), avaliaram a patogenicidade *in vitro* de *Pythium* spp. isoladas de raízes assintomáticas de plantas de alface, cultivadas pelo sistema convencional, e observaram que houve morte de semente e/ou plântulas quando inoculadas com *P. irregulare* e *P. sylvaticum*, enquanto apenas necrose da ponta da raiz e inibição da formação de raízes laterais ocorreram em plantulas inoculadas com *P. dissotocum*, *P. uncinulatum* e *P. violae*. As espécies, *P. catenulatum* e *P. rostratum* não provocaram óbvios sintomas em alface.

Teixeira *et al.* (2006) estudaram o efeito da temperatura no potencial patogênico de *Pythium* spp. na variedade de alface Verônica. Segundo os autores, os isolados de *P. helicoides* foram notadamente os mais patogênicos, ocasionando 100% de mortalidade das sementes logo após sua germinação. A 21°C, todos os isolados induziram subdesenvolvimento de plântulas, acompanhado ou não de necrose dos tecidos radiculares.

Segundo Pinto *et al.* (2005) há respostas diferentes dos cultivares de alface, tendo os mesmos relatado que, cultivares crespas foram mais suscetíveis a *Pythium helicoides*, quando comparadas com cultivares do tipo mimosa e lisa, concordando com os resultados observados neste estudo.

A temperatura de 20°C, foi a estabelecida para selecionar o isolado de *Pythium* mais patogênico e as variedades mais e menos suscetíveis, exatamente para avaliar a patogenicidade de *P. dissotocum* e *P. middletonii* na temperatura ideal do crescimento da alface e não em suas condições ótimas de crescimento. Assim conclui-se que *P. dissotocum* foi considerado o isolado de *Pythium* mais patogênico e a variedade Mimosa, a menos suscetível e, a variedade Vera a mais suscetível ao patógeno.

Conforme pesquisa realizada na região de Mogi das Cruzes, maior centro paulista de produção da hortaliça, o mercado consumidor de folhas crespas gira em torno de 70% no estado de São Paulo, evidenciando que, a variedade crespa é uma das variedades mais importantes para o segmento no mercado brasileiro de alfaces, devido à preferência do consumidor (Horticeres 2000). Essas informações demonstram a necessidade de pesquisas utilizando a variedade, visto que, no presente estudo, a variedade crespa (Vera) apresentou-se bastante suscetível aos patógenos avaliados.

Literatura Citada

- Carvalho, I. & Milanez, A.I.** 1989. Efeitos da temperatura e umidade de solo sobre *Pythium splendens*. Revista de Microbiologia. 20: 477-482.
- Drechsler, C.** 1930. Some new species of *Pythium*. Journal of the Washington Academy of Sciences. 20:398-418.
- Figueiredo, M.B.** 1967. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. O Biológico 33: 9-13.
- Furlani, P.R.** 1996. Hidroponia. Instituto Agrônomo de Campinas, Boletim Técnico. 100: 1-277.
- Furlani, P.R.** 1999. Hydroponic vegetable production in Brazil. Acta Horticulturae 481: 777-778.
- Frezzi, M.J.** 1956. Espécies de *Pythium* fitopatógenas identificadas en la República Argentina. Revista de Investigaciones Agrícolas 10:113-241.

- Herrero, M.L.; Hermansen, A. & Elen O.N.** 2003. Occurrence of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. in Norwegian Greenhouses and their Pathogenicity on Cucumber Seedlings. *Journal of Phytopathology* 151: 36-41.
- Hidrogood.** 2007. Sobre hidroponia. Disponível: <http://www.hidrogood.com.br> (acesso em Janeiro de 2007).
- Horticerres.** 2000. Horticerres lança nova variedade de alface crespa. Disponível: <http://www.horticerres.com.br> (acesso em Março de 2007).
- Ingram, D.M. & Cook, R.J.** 1990. Pathogenicity of four *Pythium* species to wheat, barley, peas and lentils. *Plant Pathology* 39: 110-117.
- Labhidro.** 2006. Hidroponia. Disponível: <http://www.labhidro.cca.ufsc.br> (acesso em Novembro de 2006).
- Middleton, J.T.** 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 20: 1-171.
- Milanez, A.I.** 1989. Fungos de águas continentais. *In:* O. Fidalgo & V.L. Bononi (coords.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 17-20.
- Nascimento, W.M & Cantliffe, D.J.** 2002. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. *Horticultura Brasileira* 20(1): 103-106.
- Owen-Going, N.; Sutton, J.C. & Grodzinski, B.** 2002. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25 (2): 155-167.
- Pinto, Z.V.; Sousa, A.L.O.P.; Silva, C.P.; Duarte, D.G.; Patrício, F.R.A.; Santos, A.S. & Teixeira, L. D.** 2005. Reação de cultivares de alface à podridão de raízes, causada por *Pythium helicoides*, em sistemas hidropônicos. *Summa Phytopathologica* 31 (supl.): 96.
- Pires-Zottarelli, C.L.A.** 1999. Fungos zoospóricos dos vales dos rios Moji e Pilões, região de Cubatão, SP. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 300p.

- Plaats-Niterink, A.J.** van der. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21. 242 p.
- Ploetz, R.C.** 2004. Influence of temperature on *Pythium splendens* – induced root disease on carambola, *Averrhoa carambola*. Mycopathologia 157: 225-231.
- Ribeiro, O.K.** 1993. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. Pp. 55-70. In: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P.H. [Eds.] *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Rocha, J.R.S.; Milanez, .A.I. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2001. O gênero *Pythium* (Oomycota) em áreas de cerrado no Parque Nacional de Sete Cidades, Piauí, Brasil. Hoehnea 28:209-230.
- Rodrigues, L.R.F.** 2002. Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em ambiente protegido. Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão, 762 p.
- Stanghellini, M.E. & Kronland, W.C.** 1986. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. Plant Disease 70(11): 1053-1056.
- Stanghellini, M.E. & Rasmussen, S.L.** 1994. Hydroponics – A solution for zoosporic pathogens. Plant Disease 78: 1129-1138.
- Teixeira-Yañez, L.D.** 2000. Identificação, Patogenicidade e Sensibilidade a produtos químicos *in vitro* de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa L.*). Dissertação de Mestrado, ESALQ, Piracicaba, SP, 74 p.
- Teixeira, L.D.; Pires-Zottarelli, C.L.A. & Kimati, H.** 2006. Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica no Brasil. Summa Phytopathologica 32: 221-226.
- Utkhede, R.S.; Levesque, C.A. & Dinh. D.** 2000. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. Canadian Journal of Plant Pathology 22 (2): 138-144.

- Vanachter, A.** 1995. Development of *Olpidium* and *Pythium* in the nutrient solutions of NFT grown lettuce, and possible control methods. *Acta Horticulturae* 382: 187-196.
- Waterhouse, G.** 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. *Mycological Papers* 109: 1-15.

Controle Biológico de *Pythium dissotocum* Drechsler em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.)

Resumo - (Controle biológico de *Pythium dissotocum* Drechsler em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.). No Brasil, o cultivo hidropônico de alface perfaz a preferência de 90% dos hidroponicultores, com uma ampla aceitação no mercado, entretanto, em condições hidropônicas, patógenos como *Pythium* spp., principalmente nos meses mais quentes do ano, são responsáveis por podridões em raízes que resultam em prejuízos consideráveis para os produtores. Atualmente, a introdução de microrganismos antagonistas no controle desses patógenos é uma alternativa para a substituição do uso de agroquímicos. O fungo *Trichoderma* está entre os microrganismos mais estudados com potencial para controle biológico, havendo disponíveis no mercado, produtos comerciais formulados com este antagonista, como é o caso do Biotrich. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do produto biológico comercial Biotrich, como controle biológico, *in vitro* e *in vivo*, de *Pythium dissotocum*, em duas variedades de alface, a variedade Mimosa e a Vera. Na avaliação *in vitro*, placas de Petri contendo ágar-água receberam uma alíquota de 1mL de suspensão, contendo 0,1; 0,2 e 0,3mL de produto comercial por litro de suspensão, em seguida, plântulas de alface recém germinadas foram transferidas para as placas. As concentrações foram testadas com e sem a presença do patógeno. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de petri. O experimento foi conduzido nas temperaturas de 20° e 27°C e, após 10 dias, foram avaliados o comprimento das radículas, dos hipocótilos e porcentagem de plântulas sobreviventes. Para o teste de controle biológico *in vivo*, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x2 (variedade x inoculação x produto), perfazendo oito tratamentos, cada qual realizado com seis repetições, sendo cada repetição representada por uma planta. A aplicação de Biotrich foi realizada na concentração pré-estabelecida no teste *in vitro*. Para os tratamentos com plantas inoculadas com o isolado de *Pythium dissotocum* foi produzida uma suspensão de zoósporos de 5×10^3 zoósporos/mL. Após colheita, foram avaliadas as massas fresca e seca da parte aérea e

raízes das plantas de alface e, além disso, para os tratamentos inoculados, o sistema radicular de uma planta, coletada ao acaso, foi utilizado para o reisolamento do patógeno. Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados obtidos demonstraram o efeito positivo do produto biológico comercial Biotrich no controle de *P. dissotocum in vitro* e *in vivo*, verificando-se uma grande efetividade na redução de podridão radicular.

Palavras-chaves: *Trichoderma* sp., *Pythium* spp., hidroponia, patogenicidade.

ABSTRACT - (Biological control of *Pythium dissotocum* Drechsler in varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.). In Brazil, hydroponically grown lettuce has the preference of 90% of growers with a huge acceptance in the market, however, in hydroponic system, *Pythium* spp. are regarded as important pathogen mainly in the hottest months of the year, these organisms are responsible for root rot resulting in considerable damages for the growers. Currently, the introduction of antagonistic microorganisms in the control of these pathogens is being an alternative for the replacement of chemical compounds. Among of microbial agents, *Trichoderma* spp. are highly studied with potential for biological control, including commercially available products formulated with this antagonist, as Biotrich. The objective of the present study was to evaluate the effect of the biological product Biotrich, in the biological control *in vitro* and *in vivo* of *Pythium dissotocum* in two varieties of lettuce, the variety Mimosa and Vera. In the evaluation *in vitro*, petri dishes contained water-agar had received 1mL of suspension contained 0,1; 0,2 and 0,3mL of commercial product for liter of suspension, after which lettuce seedlings pre-germinated was placed on the surface of water-agar. The concentrations were tested with and without the pathogen. The experimental design was completely randomized with five replicates being each replicate represented for a petri dish. The experiment was carried out during ten days at different temperatures, 20° and 27°C. It was evaluated the hypocotyls, primary root length and the percentage of survivors seedlings. In the biological control tests *in vivo*, the experimental design was

completely randomized following a factorial scheme 2x2x2 (variety x inoculation x product), totalizing eight treatments, each one carried through with six replicates, being each replicate represented for just one plant. The application method of the Biotrich was carried out following the concentration pre-established in the test *in vitro*. For the treatments containing inoculated plants with *Pythium dissotocum* were produced a zoospore suspension of 5×10^3 zoospores/mL. After harvest, fresh and dry weights of shoots and roots were recorded, and moreover, for the inoculated treatments, the root system of one plant collected randomly, was responsible for reisolated of pathogen. The data was analyzed statistically using variance analysis and test of Tukey with level of 5%. The results indicated the positive effect of the biological product Biotrich in the control of *P. dissotocum in vitro* and *in vivo*, revealing a great effectiveness in the root rot control.

Key-word: *Trichoderma* sp., *Pythium* spp., hydroponic system, pathogenicity.

Introdução

A Hidroponia é um sistema de cultivo protegido sem a utilização do solo, onde os nutrientes que a planta precisa para seu desenvolvimento são fornecidos por meio de solução nutritiva, sendo o sistema NFT (“Nutrient Film Technique”), o mais utilizado mundialmente.

No Brasil, a produção de hortaliças em sistemas hidropônicos teve início na década de 90, expandido-se principalmente no Estado de São Paulo, atualmente o maior produtor (Furlani 1999, Labhidro 2006). Dentre as hortaliças, a alface (*Lactuca sativa* L.) perfaz a preferência de 90% dos hidroponicultores, pois apresenta ciclo de vida curto, alta produtividade e ampla aceitação no mercado. Entre as vantagens para a expansão da técnica hidropônica destacam-se, a melhor ergonomia pelo uso de bancadas, melhor controle do meio nutritivo para crescimento das plantas, alta qualidade do produto, e maior tempo de prateleira para a comercialização do produto (Hidrogood 2007).

Apesar de uma menor incidência de pragas e doenças, podridões radiculares ocasionadas por espécies do gênero *Pythium* podem comprometer as culturas desenvolvidas em sistemas

hidropônicos, causando enormes prejuízos aos produtores. A circulação contínua da solução pelo sistema favorece a disseminação e sobrevivência do patógeno, podendo infestar e atingir rapidamente todas as plantas do sistema.

Atualmente, a introdução de microrganismos antagonistas no controle desses patógenos é uma alternativa para a substituição do uso de agroquímicos. Atualmente, há mais de 80 produtos comerciais formulados com agentes de biocontrole em todo o mundo, sendo a maior parte das formulações de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* e fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Gliocladium* (Paulitz & Bélanger 2001). O fungo *Trichoderma* está entre os mais estudados microrganismos com potencial para controle biológico, exercendo antagonismo a vários fitopatógenos através do parasitismo e/ou antibiose (Krugner & Bacchi 1995), bem como, por hiperparasitismo (Melo 1996). Além dos efeitos no controle de patógenos, certas linhagens de *Trichoderma* podem ter um efeito direto no crescimento e no florescimento de plantas hortícolas (Baker, 1989). Algumas linhagens de *Trichoderma* têm sido também utilizadas em preparações comerciais, como é o caso do Biotrich. Visto que a alface é uma das hortaliças mais utilizadas na alimentação dos brasileiros, da freqüente presença de isolados de *Pythium* como importantes patógenos em hidroponia, das significantes perdas verificadas em cultivos hidropônicos, a falta de pesquisa sobre o efeito do Biotrich no controle de *Pythium* e escassez de dados sobre o assunto no Brasil, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito do Biotrich como controle biológico.

Material e Métodos

Teste com produto biológico comercial – Biotrich® *in vitro*

O produto biológico comercial Biotrich é um formulado biológico à base de *Trichoderma* sp., o qual atua por mais de um mecanismo, sendo um deles primeiramente penetrar e depois de colonizar as raízes das plantas, protegendo e estimulando assim seu desenvolvimento e,

conseqüentemente, proporcionando resultados positivos no crescimento da parte aérea e floração das espécies vegetais de frutíferas, flores, hortaliças, gramados e jardins (Anponline 2006).

O efeito do Biotrich foi testado inicialmente *in vitro* com relação ao seu potencial para o controle do isolado de *Pythium dissotocum*, espécime mais patogênico, em duas variedades de alface, a variedade Vera (mais suscetível) e a variedade Mimosa (menos suscetível) (vide capítulo 1).

Placas de Petri contendo ágar-água receberam uma alíquota de 1mL de suspensão, contendo 0,1; 0,2 e 0,3mL de produto comercial por litro de suspensão, em seguida, plântulas de alface recém germinadas por 24 horas em papel de filtro umedecidos foram transferidas para as placas, seguindo metodologia descrita em Souza *et al.* (2005). Para avaliar o efeito preventivo do produto, discos de 6mm de diâmetro contendo micélio do isolado de *Pythium dissotocum* crescido em CMA, foram colocados após 24 horas no centro das placas. As concentrações foram testadas com e sem a presença do patógeno. As testemunhas controle foram representadas por placas contendo apenas as sementes de alface, com e sem Biotrich. Os tratamentos inoculados foram representados por placas contendo discos de micélio de *Pythium dissotocum*, com e sem Biotrich. O experimento foi conduzido em diferentes temperaturas, na temperatura ideal de crescimento da alface (20°C) e, na temperatura ideal de crescimento de *P. dissotocum* (27°C) (dados apresentados no capítulo 1). Após 10 dias, com o auxílio de uma régua graduada em centímetros foram avaliados, o comprimento das radículas e dos hipocótilos, assim como, a porcentagem de plântulas sobreviventes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de petri. Os resultados foram analisados estatisticamente, utilizando-se para isto, análise de variância e teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises efetuadas constam no anexo 2.

Testes de patogenicidade e controle biológico *in vivo*

Sistema hidropônico

O experimento *in vivo* foi conduzido em estufa hidropônica da Tropical Estufas® (Figura 1). no Instituto de Botânica de São Paulo, utilizando o sistema hidropônico (NFT). A bancada de cultivo hidropônico utilizada foi o Kit hidropônico residencial da Hidrogood® (Figura 2), de 1,00m x 0,70m x 0,80m, fabricado em polipropileno atóxico, contendo um reservatório de solução nutritiva de 17 L, dois perfis para o berçário com 16 orifícios de 50mm de largura no espaçamento de 10 cm x 10 cm e, três perfis fase final com 12 orifícios no espaçamento 25 cm x 25 cm. A solução nutritiva utilizada foi a Maxsol Hidroponia da Jaraguá + nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). A troca da solução foi realizada a cada três semanas segundo recomendação da Hidrogood. A condutividade elétrica (CE), o pH e a temperatura da solução nutritiva foram monitorados diariamente através do instrumento de mensuração modelo Combo da Hanna Instruments.



Figura 1. Estufa hidropônica da Tropical Estufas® (Foto: Filipe R. Baptista, 2007)



Figura 2. Kit hidropônico da Hidrogood® (Foto: Filipe R. Baptista, 2007)

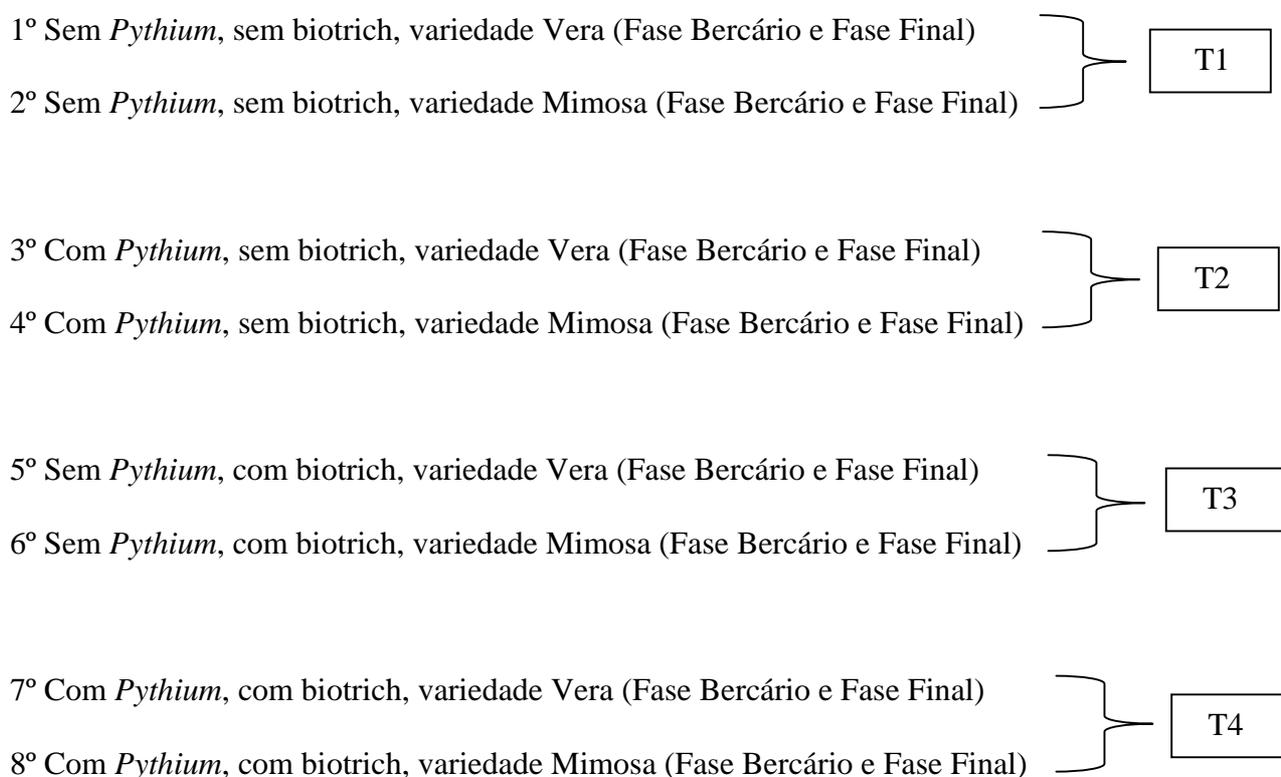
Semeadura e Germinação das variedades de alface

A semeadura das variedades de alface foi realizada em bandejas de isopor contendo substrato de fibra de coco, Golden Mix (esterilizado). Segundo a Dra. Liliane D. D. Teixeira (comunicação pessoal), a utilização do substrato facilita um melhor manejo das plântulas, quando do transplante para o sistema hidropônico.

As sementes utilizadas para os tratamentos *in vivo* foram as peletizadas, o que facilita o trabalho de plantio, pois apresentam alto vigor, poder germinativo superior a 90% e homogeneidade de germinação (Dr. Pedro Furlani, comunicação pessoal). Após cerca de vinte dias, as plântulas germinadas foram transferidas para o sistema hidropônico (berçário) onde passaram a receber a solução nutritiva. Em treze dias foi realizado o transplante dessas mudas para o local definitivo de cultivo, correspondendo à fase final do desenvolvimento, onde permaneceram por mais 17 dias até a colheita.

Procedimento dos testes de patogenicidade e controle biológico *in vivo*

O delineamento experimental utilizado para o teste de patogenicidade *in vivo* foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x2 (variedade x inoculação x produto), em duas variedades de alface, a Mimosa e a Vera; com e sem inoculação com *Pythium* e, com e sem aplicação de Biotrich. Sendo assim, foram oito tratamentos, cada qual realizado com seis repetições, sendo cada repetição representada por uma planta:



Visto que, nos meses mais quentes do ano, ocorre uma alta incidência do aparecimento de *Pythium* spp. em culturas hidropônicas de hortaliças, os experimentos *in vivo* foram executados durante os meses de verão.

A aplicação de Biotrich foi realizada na concentração pré-estabelecida no teste com o produto biológico comercial Biotrich® *in vitro*, nas diferentes fases: berçário e fase final do

desenvolvimento. Nesses tratamentos, presumivelmente de caráter preventivo, foi de fundamental importância a aplicação do Biotrich antes do aparecimento e disseminação do patógeno.

Para os tratamentos com plantas inoculadas com o isolado de *Pythium dissotocum* (T₂ e T₄) foi produzida uma suspensão de zoósporos, adaptando a técnica descrita por Owen-Going *et al.* (2002), na qual discos de micélio de 6mm de diâmetro, retirados de colônias do isolado após três a quatro dias de desenvolvimento em CMA, foram transferidos para placa de petri contendo meio de cultura MP (200g de Pepino, 1,5g de CaCO₃, 15g de Agar, 1L de água destilada esterilizada), e mantidos em temperatura ambiente (\pm 23°C). Após três dias, faixas de aproximadamente um cm de largura foram cortadas com o auxílio de uma espátula, sendo parte delas retiradas, de modo que ficassem espaços intercalados vazios para a adição de água destilada esterilizada (aproximadamente 20mL). Após 24 horas, foi realizada a troca da água, estimulando assim a liberação dos zoósporos e, em aproximadamente 05 horas, os zoósporos foram visualizados, paralisados com Tween 80 e quantificados.

No experimento foi empregada uma suspensão com concentração de aproximadamente 5×10^3 zoósporos/mL, concentração ideal para o aparecimento de sintomas nas plantas e disseminação do patógeno, segundo metodologia descrita por Owen-Going *et al.* (2002), sendo a contagem dos zoósporos realizada com o auxílio de uma lâmina Fuchs Rosenthal.

Para os tratamentos T₂ e T₄, as raízes de todas as plantas foram inoculadas com o patógeno por meio da imersão das mesmas em 40mL na suspensão preparada com zoósporos, por 30 minutos, seguindo-se a metodologia utilizada por Owen-Going *et al.* (2002) e Dr. John Sutton (comunicação pessoal). No tratamento T₄, somente após sete dias da aplicação de Biotrich, período de tempo ideal segundo Utkhede *et al.* (2000) para a ação de biocontrole formulado com *Trichoderma* sp., as raízes foram inoculadas com o patógeno. Cada planta inoculada foi imediatamente retornada para a unidade hidropônica. A sintomatologia foi observada nos dias subseqüentes. Esse experimento determinou em qual fase de crescimento as variedades de alface são mais suscetíveis ao patógeno,

quantos dias foram necessários para o aparecimento da doença e, o efeito do Biotrich como controle biológico.

O sistema radicular de uma planta por tratamento (T₂ e T₄), coletada ao acaso, foi utilizado para o reisolamento do patógeno, através da desinfestação superficial das raízes necróticas com hipoclorito de sódio e a transferência dos fragmentos radiculares para placa-de-petri adicionando água destilada esterilizada e duas metades de sementes previamente fervidas de *Sorghum* sp.

Como o cultivo da alface é de aproximadamente 45 - 50 dias, após colheita, foram avaliadas em gramas, as massas fresca e seca da parte aérea e raízes das plantas, utilizando balança digital Marte, sendo que a massa seca foi determinada após secagem à 80°C até atingir peso constante.

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa estatístico SISVAR, utilizando-se análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises efetuadas constam no anexo 2.

Resultados e Discussão

Teste com produto biológico comercial – Biotrich® *in vitro*

Nas temperaturas de 20° e 27°C, avaliando-se os parâmetros comprimento da radícula e o do hipocótilo, nos tratamentos inoculados, todas as concentrações testadas do Biotrich (0,1; 0,2 e 0,3mL/L) mostraram diferenças estatísticas significativas em relação aos tratamentos com o *Pythium dissotocum* sem a aplicação do biocontrole, para as duas variedades analisadas (Mimosa e Vera), inibindo o desenvolvimento do patógeno e reduzindo parcialmente os níveis de doença. Entre as concentrações testadas, não houve diferença estatística, evidenciando que, todas as concentrações foram eficientes no controle do patógeno (Tabela 1A,1B; 2A, 2B; 3A, 3B; 4A, 4B). Como não houve diferença estatística entre as concentrações testadas no experimento com o produto biológico comercial Biotrich® *in vitro*, optou-se por utilizar, no experimento *in vivo*, a concentração recomendada no rótulo, 1 litro de Biotrich gel para 6000 litros de água (0,2mL/L).

Nos tratamentos controle, avaliando-se o comprimento da radícula para variedade Vera, a 20°C, todas as concentrações testadas, mostraram diferenças significativas em relação a testemunha sem o biocontrole, demonstrando que além do controle do patógeno, o Biotrich foi fundamental na promoção de crescimento do comprimento da radícula (Tabela 2A). Isso também foi observado na temperatura de 27°C para o comprimento da radícula, na variedade Mimosa, nas concentrações de 0,2 e 0,3mL/L, das quais, também diferiram estatisticamente da testemunha sem o biocontrole (Tabela 3A).

Tabela 1. Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 20°C (Variedade Mimosa) referente ao comprimento da radícula (A), do hipocótilo (B) e plântulas sobreviventes (C)

(A)

COMPRIMENTO RADÍCULA (cm)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	6,34aB	5,92aA	6,35aA	6,26aA
<i>P.dissotocum</i>	1,92aA	5,60bA	5,80bA	6,06bA

(B)

COMPRIMENTO HIPOCÓTILO (cm)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	0,84aB	0,90aA	0,88aA	0,82aA
<i>P.dissotocum</i>	0,48aA	0,80bA	0,82bA	0,80bA

(C)

PLÂNTULAS SOBREVIVENTES (%)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	100aA	100aA	100aA	100aA
<i>P.dissotocum</i>	100aA	100aA	100aA	100aA

Obs: minúscula comparada na horizontal e maiúscula comparada na vertical
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 2. Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 20°C (Variedade Vera) referente ao comprimento da radícula (A), do hipocótilo (B) e plântulas sobreviventes (C)

(A)

COMPRIMENTO RADÍCULA (cm)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	4,72aB	7,26bA	7,36bA	7,18bA
<i>P.dissotocum</i>	0,88aA	7,16bA	7,18bA	7,04bA

(B)

COMPRIMENTO HIPOCÓTILO (cm)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	0,58aB	0,58aA	0,58aA	0,60aA
<i>P.dissotocum</i>	0,26aA	0,58bA	0,58bA	0,56bA

(C)

PLÂNTULAS SOBREVIVENTES (%)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	100aA	100aA	100aA	100aA
<i>P.dissotocum</i>	100aA	100aA	100aA	100aA

Obs: minúscula comparada na horizontal e maiúscula comparada na vertical
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 3. Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C (Variedade Mimosa) referente ao comprimento da radícula (A), do hipocótilo (B) e plântulas sobreviventes (C)

(A)

COMPRIMENTO RADÍCULA (cm)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	4,88aB	5,36abA	6,31cA	6,26bcA
<i>P.dissotocum</i>	1,88aA	5,32bA	5,74bA	5,80bA

(B)

COMPRIMENTO HIPOCÓTILO (cm)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	0,88aB	0,88aA	0,88aA	0,88aA
<i>P.dissotocum</i>	0,46aA	0,82bA	0,82bA	0,88bA

(C)

PLÂNTULAS SOBREVIVENTES (%)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL de Biotrich
Controle	100aB	100aA	100aA	100aA
<i>P.dissotocum</i>	88,57aA	100bA	100bA	100bA

Obs: minúscula comparada na horizontal e maiúscula comparada na vertical
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 4. Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C (Variedade Vera) referente ao comprimento da radícula (A), do hipocótilo (B) e plântulas sobreviventes (C)

(A)

COMPRIMENTO RADÍCULA (cm)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	4,22aB	4,32aA	4,64aA	4,88aA
<i>P.dissotocum</i>	0,54aA	4,14bA	4,54bA	4,56bA

(B)

COMPRIMENTO HIPOCÓTILO (cm)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	0,46aB	0,44aA	0,46aA	0,48aA
<i>P.dissotocum</i>	0,24aA	0,44bA	0,46bA	0,44bA

(C)

PLÂNTULAS SOBREVIVENTES (%)				
Concentração Patógeno	Sem Biotrich	0,1mL/L de Biotrich	0,2mL/L de Biotrich	0,3mL/L de Biotrich
Controle	100aB	100aA	100aA	100aA
<i>P.dissotocum</i>	54,28aA	100bA	100bA	100bA

Obs: minúscula comparada na horizontal e maiúscula comparada na vertical
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Segundo os resultados apresentados no capítulo 1, o isolado de *P. dissotocum* não ocasionou a morte das plântulas inoculadas à 20°C, para nenhuma das variedades analisadas, entretanto, mostrou redução no comprimento dos hipocótilos e radículas, sendo responsável pela inibição da formação de raízes laterais e necrose da raiz principal. Assim, avaliando-se o percentual das plântulas sobreviventes, nos tratamentos inoculados na temperatura de 20°C, não houve diferença estatística entre as concentrações testadas e o tratamento com *P. dissotocum* sem o biocontrole, apresentando 100% de plântulas sobreviventes para as duas variedades (Tabela 1C, 2C). Apesar de não ter ocorrido diferença estatística, as diferentes concentrações de Biotrich, promoveram o controle do patógeno, sem sintomatologia nas duas variedades analisadas.

Avaliando-se o parâmetro plântulas sobreviventes na temperatura de 27°C, foi possível observar que, o isolado de *P. dissotocum* ocasionou morte de plântulas nas duas variedades de alface, exibindo necrose acentuada da raiz principal, inibição da formação de raízes laterais e uma mais baixa porcentagem de plântulas sobreviventes para a variedade Mimosa (88,57%) e para a variedade Vera (54,28%) (Tabela 3C, 4C). Porém, avaliando os tratamentos inoculados na temperatura de 27°C, diferenças estatísticas significativas foram obtidas, entre as concentrações testadas e o tratamento com *Pythium* sem o biocontrole, mostrando resultados extremamente positivos e uma grande efetividade do produto no controle do patógeno. Para todas as concentrações testadas do biocontrole, foi verificada a sobrevivência de 100% das plântulas para as duas variedades analisadas e uma redução significativa da severidade da doença, nas quais não foi observada sintomatologia de podridão radicular.

Avaliando-se, as duas variedades, Mimosa e Vera, nas duas temperaturas 20 e 27°C e nos dois parâmetros, comprimento da radícula e do hipocótilo (Tabela 1A,1B; 2A, 2B; 3A, 3B; 4A, 4B), não houve diferença estatística entre as concentrações testadas dos tratamentos controle e as concentrações testadas dos tratamentos inoculados, indicando que, mesmo na presença do patógeno, as plântulas não foram prejudicadas, desenvolvendo-se normalmente sem a visualização de necroses nas radículas.

Segundo a Biovale (2007), o Biotrich é um composto orgânico à base de *Trichoderma* sp., o qual pode atuar primeiramente na colonização das raízes das plantas, protegendo e estimulando o desenvolvimento das mesmas ou, pode atuar diretamente no patógeno, produzindo enzimas, tais como celulase e hemicelulase, capazes de degradar materiais lignocelulolíticos e paredes de células de fungos fitopatogênicos. Esses mecanismos de atuação podem estar relacionados com o efeito positivo *in vitro* do Biotrich no controle de *P. dissotocum*. O produto foi capaz de proteger as raízes contra o patógeno e, além disso, com o auxílio de um microscópio estereoscópio, foi possível observar o crescimento micelial limitado de *P. dissotocum* em relação ao desenvolvimento do patógeno sem o Biotrich, indicando a atuação do *Trichoderma* diretamente nas hifas do fungo, inibindo parcialmente o desenvolvimento micelial do patógeno (Figuras 3, 4).



Figura 3. Crescimento micelial limitado de *Pythium dissotocum* *in vitro* ocasionado pela presença de Biotrich (Foto: Filipe R. Baptista, 2007).

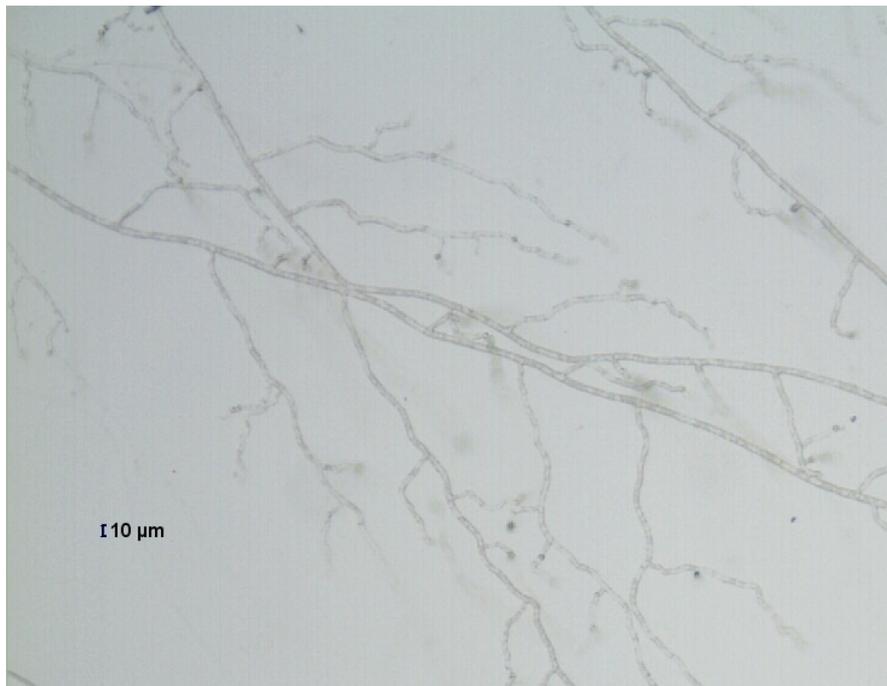


Figura 4. Crescimento micelial de *Pythium dissotocum* *in vitro* sem a presença de Biotrich (Foto: Filipe R. Baptista, 2007).

Diversos estudos abordam o modo de ação de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole (Papavizas 1985, Chet 1987, Melo, 1996). Entre os mecanismos mais estudados de atuação deste fungo, estão a produção de enzimas hidrolíticas, tais como as quitinases e celulases que lisam ou degradam a parede celular do patógeno (Elad *et al.* 1982, Cotes *et al.* 1996), assim como, a inibição do crescimento do patógenos pela produção de antibióticos ativos (Smith *et al.* 1990, Chambers & Scott 1995). Lifshitz *et al.* (1986), também observaram que, a produção de metabólitos tóxicos provenientes de sete isolados de *Trichoderma*, causaram sinais evidentes de stress nas hifas de *Pythium ultimum* Trow. Esses mecanismos podem variar de espécie para espécie e, também, de linhagem para linhagem dentro da mesma espécie, de acordo com a interação hospedeiro-parasita (Melo 1996).

Corabi-Adell *et al.* (2002) avaliaram *Trichoderma* spp., na produção de celulase, metabólitos tóxicos/inibidores, assim como, a atividade antagônica *in vitro* e *in vivo* sobre *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp, tendo os resultados *in vitro* mostrado que a maioria dos isolados de

Trichoderma cresceram agressivamente sobre o patógeno, com alguns deles inibindo o crescimento micelial do patógeno pela produção de metabólitos inibidores.

De acordo com Patricio *et al.* (2001), experimentos *in vitro* mostraram que diversos isolados de *Trichoderma* produziram substâncias tóxicas que inibiram o desenvolvimento das colônias de *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani* Kühn.

Jackisch-Matsuura & Menezes (1999), estudaram o efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e verificaram que todas as espécies de *Trichoderma* avaliadas, exerceram efeito inibitório sobre o crescimento de *P. aphanidermatum* *in vitro*, observando também alterações morfológicas, sendo a mais freqüente ao nível celular, como a destruição das hifas e a perda do conteúdo protoplasmático, em decorrência do pareamento com o antagonista *in vitro*.

Testes de patogenicidade e controle biológico *in vivo*

O experimento *in vivo* foi realizado no período de 28 de Dezembro de 2006 a 17 de Fevereiro de 2007, totalizando 50 dias de cultivo, desde a semeadura até a avaliação das plantas de alface. Os dados meteorológicos da temperatura externa do ar registrados durante o experimento, foram fornecidos pela Estação meteorológica do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo. A temperatura do ar registrada externamente a estufa, variou entre 14°C (mínima) e 31,9°C (máxima), com a média de 22,5°C, porém, observou-se uma variação entre a temperatura externa e a temperatura no interior da estufa, a qual, variou 15°C (mínima) e 36°C (máxima). Essa variação, conseqüentemente, afetou a temperatura da solução nutritiva, na qual foi registrado valores de 15°C (mínima) e 33°C (máxima). Além da temperatura, foram monitorados a condutividade elétrica da solução nutritiva, em 1,5 mS cm e, o pH, o qual variou entre 5,5 a 6,5.

Na fase de berçário, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, avaliando-se todos os parâmetros (massa fresca e seca do sistema aéreo e radicular), tanto para a variedade Mimosa, quanto para Vera (Tabelas 5, 6), no entanto, no tratamento T₂, principalmente a variedade Vera, apresentou uma sintomatologia evidente de podridão radicular, como traços de necrose, redução no número de raízes e nos valores de peso radicular em relação aos demais tratamentos. Em algumas plantas foram observados sinais de necrose na base do caule, caracterizando o início do “damping-off” e sintomas na parte aérea, como murchamento e diminuição da área foliar (Figura 5A). O tratamento T₄ mostrou-se eficiente, reduzindo a podridão radicular observada no tratamento T₂ e apresentando valores aproximados aos do tratamento T₁ (Figura 5B). No tratamento T₃ foram observados valores superiores de massa fresca e seca do sistema aéreo e radicular aos demais tratamentos, porém, sem diferença estatística (Figura 5C).



Figura 5. Fase de Bercário: A. Raízes necrosadas de alface (variedade Vera) referente ao tratamento T₂ (com *Pythium* sem Biotrich). B. Aspecto das raízes da alface (variedade Vera) referente ao tratamento T₄ (com *Pythium* com Biotrich). C. Aspecto das raízes da alface (variedade Mimosa) referente ao tratamento T₃ (sem *Pythium* com Biotrich) (Foto: Filipe R. Baptista, 2007).

Tabela 5. Controle biológico *in vivo* de *Pythium dissotocum* (Variedade Mimosa) referente à, massa fresca raiz (A), massa seca raiz (B), massa fresca parte aérea (C) e massa seca parte aérea (D)

MASSA FRESCA RAIZ (g)				
Tratamentos Fases	T₁ (Controle)	T₂ (<i>Pythium</i>)	T₃ (<i>Biotrich</i>)	T₄ (<i>Biotrich</i> + <i>Pythium</i>)
(A) Fase Bercário	1,51a	1,11a	2,44a	1,37a
Fase Final	11,88b	6,15a	15,35c	11,58b
MASSA SECA RAIZ (g)				
Tratamentos Fases	T₁ (Controle)	T₂ (<i>Pythium</i>)	T₃ (<i>Biotrich</i>)	T₄ (<i>Biotrich</i> + <i>Pythium</i>)
(B) Fase Bercário	0,14a	0,08a	0,22a	0,12a
Fase Final	0,81b	0,52a	1,08c	0,81b
MASSA FRESCA PARTE AÉREA (g)				
Tratamentos Fases	T₁ (Controle)	T₂ (<i>Pythium</i>)	T₃ (<i>Biotrich</i>)	T₄ (<i>Biotrich</i> + <i>Pythium</i>)
(C) Fase Bercário	24,26a	15,53a	25,27a	23,44a
Fase Final	178,95b	109,46a	186,54b	174,60b
MASSA SECA PARTE AÉREA (g)				
Tratamentos Fases	T₁ (Controle)	T₂ (<i>Pythium</i>)	T₃ (<i>Biotrich</i>)	T₄ (<i>Biotrich</i> + <i>Pythium</i>)
(D) Fase Bercário	1,30a	0,74a	1,45a	1,07a
Fase Final	7,49b	5,75a	8,51b	7,37b

Obs: minúscula comparada na horizontal
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 6. Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* (Variedade Vera) referente à, massa fresca raiz (A), massa seca raiz (B), massa fresca parte aérea (C) e massa seca parte aérea (D)

MASSA FRESCA RAIZ (g)				
Tratamentos Fases	T₁ (Controle)	T₂ (<i>Pythium</i>)	T₃ (Biotrich)	T₄ (Biotrich + <i>Pythium</i>)
(A) Fase Bercário	1,21a	0,56a	2,35a	1,11a
Fase Final	9,51b	4,62a	13,11c	8,84b
MASSA SECA RAIZ (g)				
Tratamentos Fases	T₁ (Controle)	T₂ (<i>Pythium</i>)	T₃ (Biotrich)	T₄ (Biotrich + <i>Pythium</i>)
(B) Fase Bercário	0,10a	0,05a	0,20a	0,07a
Fase Final	0,61b	0,38a	0,90c	0,59b
MASSA FRESCA PARTE AÉREA (g)				
Tratamentos Fases	T₁ (Controle)	T₂ (<i>Pythium</i>)	T₃ (Biotrich)	T₄ (Biotrich + <i>Pythium</i>)
(C) Fase Bercário	12,13a	5,68a	15,27a	11,67a
Fase Final	139,18b	105,20a	140,63b	124,03ab
MASSA SECA PARTE AÉREA (g)				
Tratamentos Fases	T₁ (Controle)	T₂ (<i>Pythium</i>)	T₃ (Biotrich)	T₄ (Biotrich + <i>Pythium</i>)
(D) Fase Bercário	0,60a	0,33a	1,10a	0,50a
Fase Final	6,56b	4,61a	7,25b	5,94ab

Obs: minúscula comparada na horizontal
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Durante a fase final de desenvolvimento da variedade Mimosa, o tratamento T₂ apresentou significativamente o menor desenvolvimento das plantas de alface, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, quando avaliado os parâmetros massa fresca e seca do sistema radicular e aéreo (Tabela 5A, 5B, 5C, 5D). *P. dissotocum* mostrou ter um grande potencial patogênico, reduzindo consideravelmente a massa fresca e seca do sistema radicular e aéreo, com exibição de traços de podridão radicular nas raízes (Figura 6A).

Avaliando-se a massa fresca e seca do sistema radicular, foi possível observar que durante a fase final de desenvolvimento da variedade Mimosa (Tabela 5A, 5B), não houve diferença estatística entre os tratamentos T₁ e T₄, entretanto, o tratamento T₃ diferiu significativamente dos demais tratamentos, mostrando um efeito estimulatório no crescimento do sistema radicular, no qual promoveu um aumento na massa fresca e seca radicular (Figura 6B). Além disso, não houve diferença estatística entre os tratamentos T₁, T₃ e T₄ quando avaliado a massa fresca e seca do sistema aéreo (Tabela 5C, 5D). Esses resultados obtidos demonstraram o potencial significativo de controle biológico do Biotrich em *P. dissotocum* na variedade Mimosa, reduzindo as necroses nas raízes e conseqüentemente a severidade da doença (Figura 6C).



Figura 6. Fase Final: A. Raízes necrosadas da alface (variedade Mimosa) referente ao tratamento T₂ (com *Pythium* sem Biotrich). B. Raízes da alface (variedade Mimosa) na fase final referente ao tratamento T₃ (sem *Pythium* com Biotrich). C. Aspecto geral da variedade Mimosa referente ao tratamento T₄ (com *Pythium* com Biotrich) (Foto: Filipe R. Baptista, 2007).

Na avaliação dos parâmetros massa fresca e seca radicular para a fase final de desenvolvimento da variedade Vera (Tabelas 6A e 6B), foi possível verificar que o tratamento T₄ diferenciou estatisticamente do tratamento T₂ e não diferenciou do tratamento T₁, demonstrando um efeito positivo do Biotrich no controle do patógeno e evidenciando uma inibição de forma significativa na sintomatologia observada no tratamento T₂ (Figura 7A). Já o tratamento T₃ diferenciou dos demais tratamentos, proporcionando maiores valores para massa fresca e seca do sistema radicular (Figura 7B).

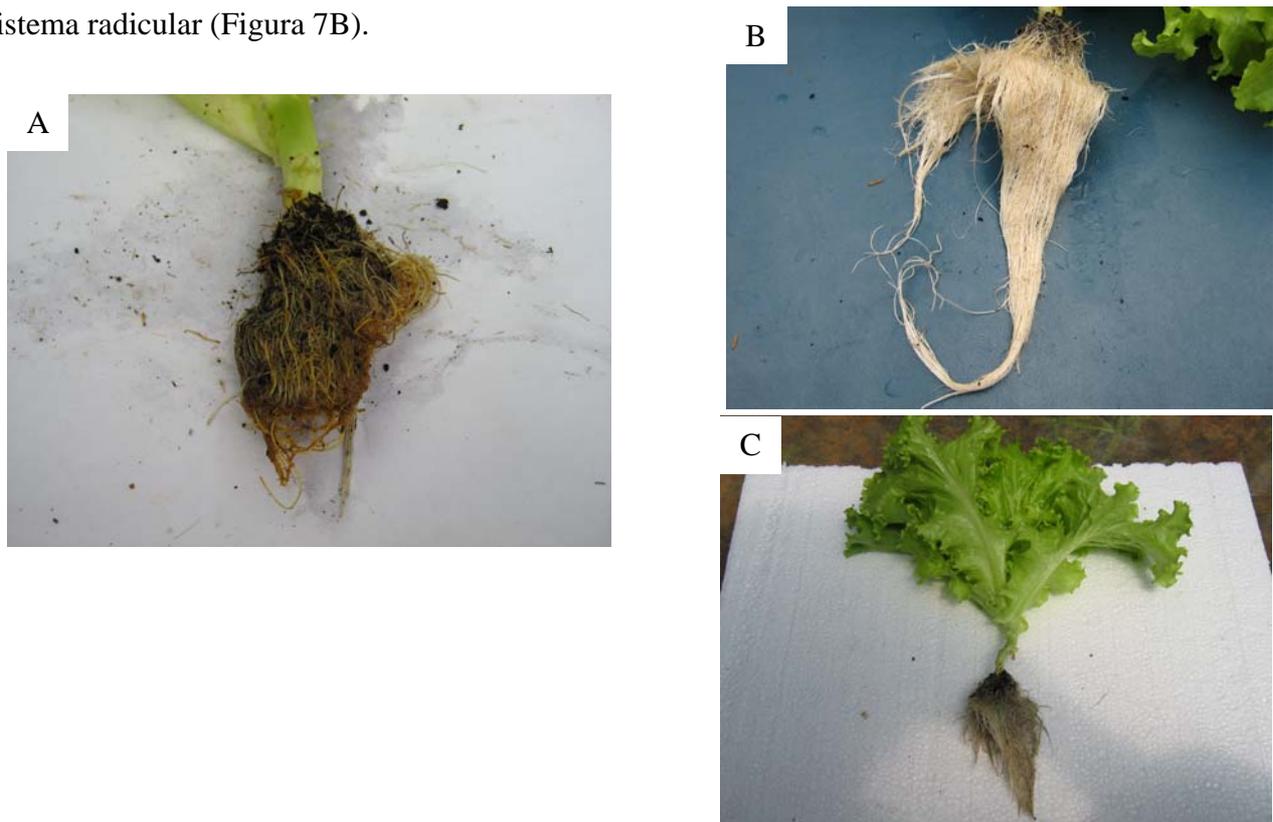


Figura 7. Fase Final (Variedade Vera) A. Raízes necróticas referente ao tratamento T₂ (com *Pythium* sem Biotrich). B. Aspectos da raízes referente ao tratamento T₃ (sem *Pythium* com Biotrich). C. Aspecto geral da planta de alface referente ao tratamento T₄ (com *Pythium* com Biotrich) (Foto: Filipe R. Baptista, 2007).

Durante a fase final de desenvolvimento da variedade Vera, não foi verificada diferença significativa quanto à massa fresca e seca da parte aérea (Tabelas 6C, 6D) entre os tratamentos T₂ e T₄, no entanto, o tratamento T₄ também não diferenciou estatisticamente dos tratamentos T₁ e T₃, dos quais, estes, apresentaram diferenças significativas ao tratamento T₂. Esses resultados demonstraram que apesar de não haver diferença estatística, entre os tratamentos T₁, T₃ e T₄, o

Biotrich promoveu parcialmente o controle de *P. dissotocum* na variedade Vera, visto que, o T₄ também não diferiu estatisticamente do T₂ (Figura 7C). Mesmo assim, foi possível verificar que o tratamento T₂ apresentou efeito negativo no desenvolvimento das plantas, reduzindo os valores de massa fresca e seca da parte aérea em relação ao T₄. Pode-se dizer que, a resistência das variedades foi altamente significativa para a ausência de doença e para a efetividade do controle biológico Biotrich, visto que, a variedade Vera mostrou-se mais suscetível quando comparada com a variedade Mimosa na avaliação da massa fresca e seca da parte aérea da fase final de desenvolvimento.

Estatisticamente a fase de berçário foi menos suscetível do que a fase final de desenvolvimento, pois não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabelas 5 e 6), mas como relatado anteriormente, as plantas de alface apresentaram, principalmente na variedade Vera, uma sintomatologia evidente de podridão radicular com sinais de necrose na base do caule, caracterizando o início do “damping-off” e, em algumas plantas, foram observados sintomas na parte aérea, como murchamento e diminuição da área foliar. Provavelmente, algumas plantas não sobreviveriam quando transplantadas para a fase final de desenvolvimento, por estarem bastante debilitadas e suscetíveis a novas infecções de podridão radicular. Apesar da fase final de desenvolvimento ter se mostrado mais suscetível com diferenças estatísticas em relação ao tratamento T₂, as plantas de alface de ambas as variedades, apresentaram melhor adaptação ao sistema hidropônico com emissão de novas raízes como forma de combate às infecções radiculares, sendo que, não houve morte das plantas até a avaliação final do experimento.

A densidade de inóculo de 5×10^3 zoósporos/mL utilizada nos experimentos *in vivo*, foi aparentemente, mais baixa do que a densidade exigida para causar a morte nas plantas por *P. dissotocum*, contudo, foi suficiente para o aparecimento da sintomatologia, diminuindo o peso fresco e seco das plantas de alface. Após sete dias da inoculação de *P. dissotocum* em todas as plantas do tratamento T₂, foi verificado o escurecimento e necrose pouco acentuada das raízes e uma diminuição da massa da parte aérea, quando comparada com o tratamento T₁. Houve uma

progressão da doença nos dias subseqüentes, como diminuição acentuada no comprimento das raízes devido as perdas de raízes laterais, necroses com tonalidades de marrom, murchamento da parte aérea e, sistema radicular parcialmente comprometido. Menzies *et al.* (1996) verificaram o desenvolvimento de doença em pepinos hidrôponicos, examinando os efeitos de diferentes densidades de inóculos de *Pythium aphanidermatum* aplicados diretamente na solução nutritiva. Os autores verificaram que o patógeno causou escurecimento das raízes em todas as concentrações testadas, de $0,2 \times 10^6$ a 2×10^6 CFU/100L, sendo que na concentração de 2×10^6 CFU/100L, todas as plantas morreram entre sete e 28 dias depois da inoculação. Também foi observado, que baixas densidades de inóculo, com valores iguais ou menores que $2,2 \times 10^3$ CFU/100L, não ocasionaram a morte das plantas, mas resultaram em uma diminuição no crescimento e perdas na produção. Assim, os autores concluíram que, as plantas testadas com níveis de inóculos mais baixos são capazes de superar as infecções iniciais nas raízes, e uma vez ativada as respostas de defesa, as plantas são capazes de tolerar as infecções ocasionadas pelo inóculo secundário produzidos pelas infecções primárias.

A utilização da técnica para o reisolamento do patógeno nos tratamento T₂ e T₄, através da desinfestação das raízes necróticas com hipoclorito de sódio e a transferência dos fragmentos para meio de cultura específico (CMA), possibilitou o aparecimento de contaminantes no meio de cultura, dificultando o reisolamento do patógeno. Sendo assim, foi realizado um novo reisolamento, através da desinfestação superficial das raízes necróticas com hipoclorito de sódio e a transferência dos fragmentos radiculares para placa-de-petri esterilizada adicionando água destilada esterilizada e duas metades de sementes previamente fervidas de *Sorghum* sp. Após quatro dias, com o auxílio de um microscópio estereoscópio, foi possível observar o crescimento micelial ao redor das sementes e a formação das estruturas reprodutivas do *P. dissotocum*. O reisolamento do *P. dissotocum* no T₂ mostrou que as estruturas reprodutivas do patógeno foram também observadas no interior das raízes necróticas, demonstrando a intensa colonização e o ótimo desenvolvimento do patógeno no interior do hospedeiro (Figuras 8A e 8B).

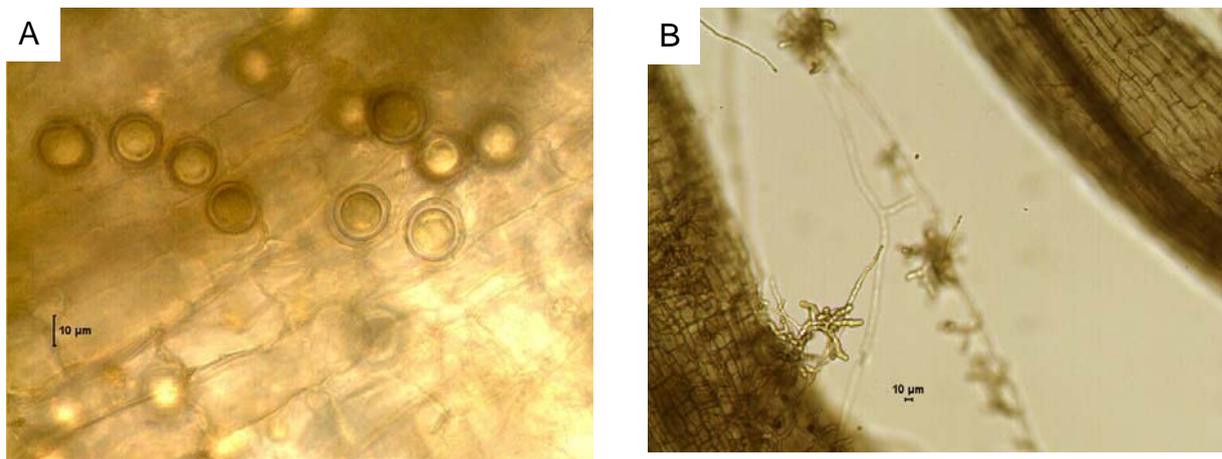


Figura 8. Estruturas reprodutivas de *Pythium dissotocum* na variedade Vera referente ao tratamento T₂ (com *Pythium* sem Biotrich): A. Oogônios na raiz. B. Zoosporângios na raiz (Foto: Filipe R. Baptista, 2007).



Figura 9. *Trichoderma* sp. em associação com as raízes de alface (variedade Mimosa): A. *Trichoderma* sp. em raízes. B. Conidióforos, células conidiogênicas e conídios. C. Aspecto geral de *Trichoderma* próximo à raiz (Foto: Filipe R. Baptista, 2007)

P. dissotocum foi também reisolado do tratamento T₄, contudo, baseando-se na avaliação microscópica, visualizou-se um crescimento micelial limitado ao redor das sementes de sorgo (cultura em água), com hifas comprometidas e apenas a formação da reprodução assexuada. No interior das raízes necróticas, foi observado a formação das estruturas reprodutivas de *P. dissotocum*, porém, em menor quantidade quando comparada com as raízes observadas no tratamento T₂. A presença do *Trichoderma* sp. no tratamento T₄, indicou um efeito positivo do produto, prejudicando o desenvolvimento do patógeno, e além disso, através da observação microscópica, foi possível verificar a presença de *Trichoderma* sp. em associação com as raízes de alface, demonstrando sua capacidade em colonizar e crescer junto ao sistema radicular, permanecendo viável durante todo o ciclo da cultura da alface (Figuras 9A, 9B, 9C).

Segundo os resultados obtidos no presente estudo, o produto Biotrich mostrou um efeito estimulatório no desenvolvimento do sistema radicular das variedades Mimosa e Vera no tratamento T₃ (Biotrich), promovendo um aumento no peso fresco e seco radicular. De acordo com Kleifeld & Chet (1992), respostas à aplicação de *Trichoderma* spp. foram caracterizadas por aumentos significantes na porcentagem de germinação, no peso seco de plântulas e na área foliar de plantas de pimentão. Lynck (1992) relatou o potencial do *Trichoderma* como agente biológico na agricultura, pela habilidade em estimular o crescimento de plantas, visto que esse proporcionou um aumento de 54 a 100% na produção de alface, quando incorporado ao composto utilizado na adubação.

Corrêa (2006) estudou a capacidade de diversos agentes de controle biológico, entre eles, *Trichoderma* sp. no controle de podridão radicular causada por *Pythium aphanidermatum* e a influência destes agentes na promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico. *Trichoderma* sp. não foi capaz de promover o crescimento de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico e as concentrações de 10⁷ conídios/mL de *Trichoderma* sp., foram prejudiciais ao desenvolvimento das plantas, causando uma diminuição acentuada na massa média das plantas de alface. A autora conclui que os resultados encontrados nos experimentos com

promoção de crescimento de *Trichoderma* sp. demonstraram que doses elevadas de *Trichoderma*, aplicadas nos tanques de solução hidropônicas, podem prejudicar o desenvolvimento da planta, podendo agravar ainda mais a situação dos produtores que buscam por um controle para epidemias radiculares.

De acordo com Punja & Yip (2003), a utilização de produtos biológicos utilizando isolados de *Trichoderma* sp. não reduziram a severidade de *P. aphanidermatum* em pepinos cultivados no substrato lã de rocha, concluindo que a falta de efetividade dos produtos Rootshield™ Drench (*Trichoderma harzianum* T-22) e Soilgard™ 12G (*Trichoderma virens* GL-21), foi em virtude, da grande intensidade da doença e a utilização da lã de rocha como substrato. Além disso, agentes de biocontrole, geralmente, não demonstram grande resultados com excessivos níveis de inóculos do patógeno (Paulitz 1996). Outros estudos, no entanto, mostraram uma grande efetividade dos produtos acima citados, reduzindo a podridão radicular em pepino, causada por *Pythium* spp. (Paulitz *et al.* 1990, Paulitz & Bélanger 2001).

Em condições de casa-de-vegetação, Jackisch-Matsuura & Menezes (1999), não verificaram um efeito positivo de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*), observando o aparecimento de diversos sintomas (murcha, necrose e escurecimento da região do colo) em todos os tratamentos efetuados, após 48 horas da inoculação do patógeno. Nesses estudos, as suspensões de conídios de *Trichoderma* foram aplicados em solo natural e, em solo esterilizado, 24 h antes simultaneamente e 24 h após a inoculação de *Pythium* em plantas de fumo. Segundo os autores, o baixo nível de controle obtido pode ter ocorrido por vários fatores, tais como, suspensão de conídios em concentração insuficiente, com pouco tempo de pré-inoculação dos conídios. Esses resultados diferem do presente estudo, no qual, foi verificado uma grande efetividade do produto Biotrich no controle *in vivo* de *P. dissotocum* em sistema hidropônico, quando aplicado sete dias antes da inoculação dos zoósporos de *P. dissotocum*. A eficiência dos tratamentos T₄ (Biotrich + *Pythium*) em controlar a podridão radicular causada por *P. dissotocum*, pode ser explicada pelo método preventivo utilizado no experimento, no qual o

biocontrole Biotrich foi bastante eficiente. Segundo Harman (2000), a efetividade no controle de doenças por espécies de *Trichoderma*, pode ser comparada aos tratamentos com fungicidas, mas aplicando sempre em caráter preventivo antes da manifestação da doença.

Corabi-Adell *et al.* (2002) avaliaram *Trichoderma* spp. no controle do fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* em condições de casa-de-vegetação, utilizando plântulas de pepino como bioindicadoras, concluindo que alguns isolados de *Trichoderma* reduziram até 75% o número de plantas mortas.

Cipriano *et al.* (2005) estudaram o potencial de quatro isolados de *Trichoderma* spp., para controle de *P. aphanidermatum* em sistemas hidropônicos, utilizando plântulas de pepino e recipientes de vidro (10 mL), contendo 3,5 mL da suspensão de zoósporos de *P. aphanidermatum* e o mesmo volume de uma suspensão de *Trichoderma* spp. Os autores concluíram que os tratamentos com os isolados IB/LF 11 e IB/LF 18 não provocaram o controle do patógeno resultando em morte de todas as plântulas, além de pesos de plântulas semelhantes às testemunhas com *P. aphanidermatum*. Por outro lado, verificaram que a adição dos isolados de *Trichoderma* spp. IB/LF 28 e IB/LF 85 às suspensões promoveu a proteção das plântulas de pepino contra o ataque de *P. aphanidermatum*, pois as plântulas tratadas apresentaram número e peso semelhantes aos da testemunha sem o patógeno.

Simoni *et al.* (2005) verificaram a utilização de inoculante biológico do *Trichoderma* no controle do *Pythium* em alface hidropônica (sistema NFT), aplicando-se a dose de 1.000mL do produto comercial ControlBio 2001 para 1.000L de solução nutritiva, diretamente no reservatório do sistema, isso segundo os autores para conter a infestação generalizada. Foi verificado a viabilidade da inoculação do fungo *Trichoderma* na hidroponia de alface, mesmo sob infestação intensa, mas há necessidade de maiores estudos para chegar-se a uma dosagem mínima de manutenção do sistema em caráter preventivo, isto porque, quando a mesma já estava em 50 mL, o *Pythium* voltou a se manifestar na horta hidropônica.

No presente estudo, os resultados obtidos demonstraram o efeito positivo do produto biológico comercial Biotrich no controle de *P. dissotocum in vitro* e *in vivo*, verificando-se uma grande efetividade na redução de podridão radicular.

Literatura Citada

- Anponline.** 2006. Guia de fornecedores-Qualifertil insumos agropecuários. Disponível: <http://www.anponline.org.br/guiadefornecedores/qualifertil.htm> (acesso em Novembro de 2006).
- Baker, R.** 1989. Improved *Trichomonas* spp. for promoting crop productive. Trends in Biotechnology 7(2): 34-38.
- Biovale.** 2007. Produtos. Disponível: <http://www.biovale.com.br> (acesso em Fevereiro de 2007).
- Cipriano, M.A.P.; Santos, A.S.; Patrício, F.R.A.; Freitas, R.P. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2005. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Pythium aphanidermatum* em sistemas hidropônicos. In: Anais do 3º Congresso de iniciação científica em ciências agrárias, biológicas e ambientais, Arquivos do Instituto Biológico 72: 24.
- Corrêa, E.B.** 2006. Controle de podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento em alface hidropônica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 96p.
- Chambers, S.M. & Scott, E.S.** 1995. *In vitro* antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. Journal of Phytopathology 143: 471-477.
- Chet, I.** 1987. *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I. (Ed.). Innovative approaches to plant disease control. New York: John Wiley & Sons, pp. 137-160.

- Corabi-Adell C., Lucon C.M.M & Koike C.M.** 2002. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. Arquivos do Instituto Biológico 69: 158-191.
- Cotes, A.M.; Lepoivre, P. & Semal, J.** 1996. Correlation between hydrolitic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment and the protective effect against *Pythium splendens*. European Journal of Plant Pathology 102: 497-506.
- Elad, Y.; Chet, I. & Henis, Y.** 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology, v.28, p.719-725.
- Furlani, P.R.** 1999. Hydroponic vegetable production in Brazil. Acta Horticulturae, 481: 777-778.
- Harman, G. E.** 2000. The Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* Strain T-22. Plant Disease 84 (4):377-393.
- Hidrogood.** 2007. Sobre hidroponia. Disponível: <http://www.hidrogood.com.br> (acesso em Janeiro de 2007).
- Jackisch-Matsuura, A. B. & Menezes, M.** 1999. Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*). Summa Phytopathologica 25: 161-164.
- Kleifeld, O. & Chet, I.** 1992. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth. Plant Soil 144: 267-72.
- Krugner, T.L. & Bacchi, L. M. A.** 1995. Agentes Causais - Fungos. In: Bergamin Filho, A.; Amorim, L.; Kimati, H.. (Org.). Agentes Causais - Fungos. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1: 46-96.
- Labhidro.** 2006. A hidroponia na Segunda Guerra. Disponível: <http://www.labhidro.cca.ufsc.br> (acesso em Novembro de 2006).
- Lifshitz, R.; Windham, M.T.; Baker, R.** 1986. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. Phytopathology 76: 720-725.
- Lynck, J.** 1992. Pesquisa inglesa com agentes biológicos. Jornal Agroceres 212:2.

- Melo, I.S.** 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas 4: 261-295.
- Menzies, J.G.; Ehret, D.L. & Stan, S.** 1996. 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 18(1): 51-54.
- Owen-going, N.; Sutton, J.C. & Grodzinski, B.** 2002. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. Canadian Journal of Plant Pathology, 25 (2): 155-167.
- Papavizas, G.C.** 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23-25.
- Patrício, F. R. A.; Kimati, H. & Barros, B.C.** 2001. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. Summa Phytopathologic, 27(2): 223-229.
- Paulitz T.C.; Ahmad J.S & Baker R.** 1990. Integration of *Pythium nunn* and *Trichoderma harzianum* isolate T-95 for the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. Plant Soil 121: 243-250.
- Paulitz, T.C.** 1996. Biological control of root pathogens in soilless and hydroponic systems. HortScience 32(2): 193-196.
- Paulitz, T.C. & Bélanger, R.R.** 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 39: 103-133.
- Punja, Z.K. & Yip, R.** 2003. Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. Canadian Journal of Plant Pathology 25: 411-417.
- Simoni, R.; Lipiarski, V.C.; Coelho, R.; Pereira Jr, C.T.; & Oliveira, J.L.B.** 2004. Uso de inoculante biológico *Trichoderma* no controle de *Pythium* em cultivo de alface hidropônica. In: IV Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão. UFSC: Florianópolis.

- Smith, V.L.; Wilcox, W.F. & Harman, G.E.** 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80: 880-885.
- Sousa, A.L.O.P.; Pinto, Z.V.; Patrício, F.R.A.; Cipriano, M.A.P; Santos, A.S. & Teixeira-Yañez, L.D.D.** 2005. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Pythium helicoides* em sistemas hidropônicos. *Summa Phytopathologica* 31 (supl.): 95.
- Utkhede, R.S; Levesque, C.A. & Dinh. D.** 2000. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22 (2): 138-144.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram-se bastante promissores no controle de podridão radicular *in vitro* e *in vivo*, de *Pythium dissotocum*, utilizando o produto biológico comercial Biotrich. Resultados semelhantes não foram obtidos por Jackisch-Matsuura & Menezes (1999) e Patricio *et al.* (2001), os quais estudaram *in vitro* e *in vivo* o efeito de *Trichoderma* spp no controle de *Pythium aphanidermatum* em solo, para as culturas de fumo (*Nicotiana tabacum*) e em plântulas de pepino. Provavelmente esses resultados são decorrentes do uso de diferentes linhagens de *Trichoderma*, de diferentes espécimes de *Pythium*, de diferentes patogenicidades, de diferentes modos de cultivos. Segundo Corrêa (2006), diversos autores discutem os fatores que influenciam o desempenho de *Trichoderma* como biocontrolador, entre eles, fatores como tipo do solo, temperatura, pH, composição da microflora e disponibilidade de nutrientes são descritos como fatores de regulação de *Trichoderma*.

As estratégias para o uso racional e com relativa eficiência de antagonistas devem ser baseadas no conhecimento das habilidades que eles possuem, sendo que em muitos casos, o insucesso do biocontrole deve-se ao desconhecimento da ecologia e fisiologia do micoparasita (Melo 1996). Assim, o conhecimento de mecanismos de ação do *Trichoderma* é de fundamental importância no emprego de métodos racionais de melhoramento genético e para aumentar a vantagem competitiva no ambiente. Estes mecanismos variam de espécie para espécie e, também, de linhagem para linhagem dentro da mesma espécie, de acordo com a interação hospedeiro-parasita (Melo 1996).

Significativas diferenças podem existir não somente entre as espécies e espécimes de *Trichoderma*, que podem diferenciar na ação antagonista, como também entre a variação da patogenicidade e os isolados de *Pythium* envolvidos, podendo ocorrer variações intraespecíficas, resultando em diferentes níveis de patogenicidade. Nos testes de patogenicidade *in vitro*, diferenças significativas mostraram diferentes níveis de patogenicidade entre *P. dissotocum* e *P. middletonii*, no qual *P. dissotocum* mostrou ser altamente patogênico nas variedades de alface. Owen-Going *et*

al. (2003), verificaram a capacidade de um isolado de *P. aphanidermatum* e cinco isolados de *P. dissotocum* em colonizar e produzir sintomas no sistema radicular de pimentão crescidos em unidades individuais aeradas com solução nutritiva. Segundo os autores, observações no desenvolvimento de sintomas nas raízes inoculadas indicaram que existe uma diversidade substancial na patogenicidade entre os isolados testados, incluindo aqueles pertencentes a mesma espécie, como os isolados de *P. dissotocum*.

Experimentos iniciais de patogenicidade *in vitro*, foram realizados com a utilização do meio de cultura CMA, meio específico comumente utilizado para isolamentos de espécies do gênero *Pythium*. Porém, a utilização do CMA, favoreceu o crescimento de bactérias e outros fungos contaminantes, impedindo o desenvolvimento adequado do experimento. Assim, para a realização dos experimentos de patogenicidade *in vitro*, recomenda-se a utilização do meio de cultura ágar-água, meio pobre sobre o qual raramente desenvolvem-se contaminantes, além de ser freqüentemente utilizado nos testes de fitopatologia e permitir o desenvolvimento dos fungos.

Os testes *in vitro* evidenciaram a influência da temperatura no crescimento micelial do isolados, influenciando diretamente nas diferenças obtidas entre o crescimento ótimo e máximo dos espécimes estudados e o efeito de diferentes temperaturas na expressão da doença. *P. dissotocum* foi responsável pela alta patogenicidade e desenvolvimento de plântulas com sintomas de podridão de raízes, desenvolvendo-se severamente nas temperaturas de 20° e 27°C.

As condições ambientais podem influenciar diretamente na patogenicidade dos isolados de *Pythium*, sendo a temperatura um dos parâmetros mais importantes na ocorrência da doença. Paulitz (1996) resumem que no caso de doenças ocasionadas por espécies de *Pythium*, os hospedeiros possuem um período limitado de suscetibilidade ao patógeno, sendo de fundamental importância, a aplicação do controle biológico durante o tempo em que a planta é mais suscetível à infecção. Na hidroponia, em virtude da sensibilidade das plantas às elevadas temperaturas que ocorrem no verão e a alta adaptação dos patógenos, a planta torna-se bastante suscetível ao ataque de *Pythium*. Segundo Corrêa (2006), quanto maior a temperatura da solução nutritiva, maior a predisposição das

plantas ao ataque de *Pythium* e o progresso da doença, sendo que os propágulos de *Pythium* spp. germinam rapidamente em resposta aos exudatos das sementes e raízes, infectando rapidamente a planta (Whipps & Lumsden 1991). Assim torna-se imprescindível, a utilização do controle biológico antes do aparecimento e detecção da doença, como forma de ação preventiva, pois uma vez o patógeno dentro do sistema hidropônico, torna-se difícil o controle da doença, em virtude, da rápida adaptação e disseminação das espécies de *Pythium* no ambiente aquático.

Estudos indicaram que a podridão radicular causada por *Pythium dissotocum* em espinafre foi severa nas temperaturas de 21° a 27°C (Gold & Stanghellini 1985) ou mais severa nos meses de inverno, quando a temperatura da solução nutritiva estava comparativamente mais baixa, entre 17° e 22°C, *P. dissotocum* reduziu o desenvolvimento das plantas (Bates & Stanghellini 1984). Variações de temperaturas podem ocorrer entre isolados da mesma espécie, possivelmente por diferenças instraespecíficas e adaptações dos isolados as diferentes localidades no qual o fungo se desenvolve. No presente estudo, avaliando *P. dissotocum*, a temperatura da solução nutritiva variou entre 15°C e 33°C, resultando no desenvolvimento de sintomas de podridão radicular, sem a ocorrência de morte nas plantas. Segundo Gold & Stanghellini (1985), diferenças na patogenicidade ocorrem em temperaturas específicas dando uma vantagem competitiva temporária e resultando no aumento da população e predominância das espécies mais agressivas. Segundo os autores, *P. dissotocum* foi mais agressivo na temperatura de 17°C, mantendo esta predominância até o aumento da temperatura, quando tornou-se mais favorável para a ocorrência de *Pythium aphanidermatum*.

O aumento da temperatura no interior da estufa pode influenciar o aparecimento e o desenvolvimento de doenças. Martinez Garcia (1978) relata que o efeito da estufa sobre a temperatura está relacionado com o balanço de energia, dependendo, portanto, do tipo de cobertura, do ângulo de incidência da radiação solar e principalmente, do tamanho e do volume da estufa (Seeman 1979). De acordo com Vida *et al.* (2004), o ambiente na estufa geralmente é mais favorável ao crescimento e produção das plantas, no entanto, mudanças em determinados fatores do ambiente, principalmente nas variáveis climáticas e nutricionais, podem causar mudanças na

fisiologia e/ou anatomia das plantas podendo torná-las mais predispostas à infecção por patógenos. Alguns recursos como a utilização de um termômetro de máxima e mínima, o posicionamento ideal para a instalação da estufa proporcionando melhor ventilação, o uso de telas sintéticas de sombreamento e a nebulização, são recomendados para o monitoramento e manejo da temperatura no interior dos ambientes protegidos (Jarvis 1992, Purquerio & Tivelli 2005).

Além da temperatura, fator como a densidade de inóculo utilizada nos experimentos *in vivo*, podem influenciar nas diferenças de patogenicidade. A suspensão de zoósporos utilizada no presente estudo, não causou morte nas plantas na concentração utilizada, mas possivelmente, um aumento da concentração, ocasionaria a morte nas plantas. A concentração utilizada foi ideal para o aparecimento de sintomas e disseminação do patógeno, evidenciando que a técnica empregada para a inoculação do patógeno através da imersão das plantas em 40mL de suspensão durante 30 minutos, foi eficaz para a ocorrência de podridão radicular nas plantas de alface. Muitas vezes, o patógeno é difícil de ser isolado diretamente da solução nutritiva, mesmo quando há evidência da presença do patógeno no cultivo hidropônico (Sanogo & Moorman 1993). Isso demonstra, a dificuldade de detectar o patógeno no sistema hidropônico, pois este encontra-se em baixas concentrações de densidade de inóculo e a visualização da sintomatologia de podridão radicular pode não ser detectada pelos produtores, ocorrendo assim, as infecções subclínicas com diminuição no tamanho e produção das plantas, sem a visualização de sintomas.

O comportamento das variedades precisa ser conhecido, e as mais resistentes podem ser sugeridas aos agricultores, como mais uma medida para o manejo do patógeno nos sistemas hidropônicos. Segundo Vida *et al.* (2004), o uso de variedades resistentes, imunes ou tolerantes é o método ideal para controlar doenças de plantas, pois não onera diretamente o custo de produção e não apresenta riscos. Mas segundo os autores, o problema é a disponibilidade de variedades resistentes aos patógenos, que podem causar epidemias nos cultivos protegidos.

O kit residencial da Hidrogood foi bastante apropriado para a execução dos experimentos *in vivo*, no entanto, devido ao grande crescimento das plantas durante o cultivo, algumas plantas do

bercário foram encobertas pelas plantas da fase final de desenvolvimento, impedindo a passagem de luz e, como consequência, apresentaram estiolamento (processo no qual uma planta cresce na ausência de luz). Talvez a redução do tempo para a colheita deva ser antecipado para não prejudicar o desenvolvimento das demais plantas nesse sistema.

Diversos trabalhos relatam a importância do estudo e conhecimento sobre os isolados de *Trichoderma* na preparação dos produtos de biocontrole. O agente de biocontrole tem que ocupar um nicho ecológico similar ao do patógeno e o modo de ação, competição, parasitismo, antibioses, deve interferir com precisão no desenvolvimento do patógeno. Todavia, a literatura é ampla com artigos sobre o potencial dos antagonistas contra doenças de plantas, baseando-se em estudos *in vitro*, mas poucos são os agentes de biocontrole colocados em prática fora do laboratório (Paulitz & Bélanger 2001). De acordo com Papavizas (1985), antes das linhagens de *Trichoderma* tornarem-se comercialmente disponíveis para o biocontrole, prioridades de pesquisas são necessárias, como por exemplo, o entendimento dos mecanismos de biocontrole; a manipulação genética do aumento da habilidade do organismo no controle das doenças; o entendimento dos fatores econômicos como custo/benefício, investimento no desenvolvimento e distribuição; acessibilidade pelos produtores, entre outros.

Segundo Melo & Costa (2005), a falta de formulações adequadas de fungos para controle de fitopatógenos tem sido um sério entrave na comercialização de agentes de controle biológicos, onde a eficácia, praticidade, segurança e métodos para aplicação, são fundamentais tanto para o sucesso do biocontrole nos sistemas de cultivo, quanto para a aceitação do biocontrole pelos agricultores e sociedade. Assim, é de grande importância os testes exigidos para o registro do biocontrole, incluindo testes toxicológicos e impacto ambiental (Melo 1996), além de, periodicidade nos laudos técnicos comprovando a formulação, concentração e a viabilidade do produto, garantindo assim, a comercialização e qualidade do produto.

Assim como os produtos de biocontroles, é de fundamental importância o conhecimento sobre o patógeno. De acordo com Sutton *et al.* (2006), o conhecimento e entendimento da etiologia e

epidemiologia de podridão radicular por *Pythium* e seus efeitos na fisiologia das plantas, são essenciais em relação às novas perspectivas das pesquisas e ao desenvolvimento de melhores práticas para o manejo da doença em cultivos hidropônicos.

Além do controle biológico, medidas culturais podem ser empregadas como manejo da doença em sistemas hidropônicos. De acordo com Lopes *et al.* (2005), ao perceber que o sistema hidropônico está contaminado por *Pythium*, o sistema deve passar por um rigoroso processo de limpeza antes de iniciar nova safra. Em instalações hidropônicas, a demanda comercial dificulta a prática da limpeza, visto que, a necessidade em atender o cliente mostra-se como prioridade dos produtores de hidroponia e, dificilmente a limpeza torna-se uma prática rotineira. Uma alternativa seria a utilização de bancadas hidropônicas montadas especialmente para substituir temporariamente a bancada infectada, viabilizando continuamente a prática da limpeza.

Como verificado no presente estudo, a temperatura exerce grande influência no aparecimento de podridão radicular ocasionadas por *Pythium* em cultivos hidropônicos e, atualmente, dados confirmam a influência de fenômenos físicos de diversas naturezas sobre a temperatura do ar. Alterações significativas no clima e no aumento da temperatura global, são conseqüências da crescente interferência humana, ocasionando o desmatamento e o aumento de poluentes que levam à acumulação na atmosfera de gases propícios ao efeito estufa. Este aumento gradativo da temperatura pode afetar as gerações futuras e talvez, em menor tempo, pode proporcionar um significativo aumento na severidade de doenças especialmente nos cultivos hidropônicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth, G.C.** 1973. Introduction and keys to higher taxa. *In*: Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S. (Eds.). *The Fungi: an advanced treatise*. New York: Academic Press Inc., v. 4B, cap.1, pp. 1-7.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M.** 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed., John Wiley, Sons, Inc, NewYork.
- Anponline.** 2006. Guia de fornecedores-Qualifértil insumos agropecuários. Disponível: <http://www.anponline.org.br/guiadefornecedores/qualifertil.htm> (acesso em Novembro de 2006).
- Baker, R.** 1989. Improved *Trichomonas* spp. for promoting crop productive. *Trends in Biotechnology* 7(2): 34-38.
- Bates, M.L.; Stanghellini, M.E.** 1984. Root rot of hydroponically grown spinach caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium dissotocum*. *Plant Disease* 68(11): 989-991.
- Beltrão, J.; Trindade, D. & Correia, P.J.** 1997. Lettuce yield response to salinity of. sprinkle irrigation water. *Acta Horticulturae* 449: 623-627.
- Berry, L.A.; Jones, E.E & Deacon, J.W.** 1993. Interaction of the mycoparasite *Pythium oligandrum* with other *Pythium* species. *Biocontrol Science and Technology* 3: 247-260.
- Bettiol, W.** 1995. Isolamento seletivo de *Bacillus*. *In*: I.S. Melo, & R.M.V. Sanhueza (eds.). *Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos*. Jaguariúna: Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente, Manual Técnico, pp. 35-36.
- Biovale.** 2007. Produtos. Disponível: <http://www.biovale.com.br> (acesso em Fevereiro de 2007).

- Blanco, M.C.S.G.; Groppo, G.A.; Tessarioli Neto, J.** 1997. Alface (*Lactuca sativa* L.). Manual Técnico das Culturas 2(8): 13-18.
- Bosco, S.M.G.; Bagagli, E.; Araujo Jr., J.P.; Candeias, J.M.G.; Franco, M.F.; Marques, M.E.A.; Mendoza, L.; Camargo, R.P.; Marques, A.S.** 2005. Human Pythiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 11(5): 715-718.
- Carvalho, I. & Milanez, A.I.** 1989. Efeitos da temperatura e umidade de solo sobre *Pythium splendens*. *Revista de Microbiologia*. 20: 477-482.
- Cavalier-Smith, T.** 1981. Eukaryote Kingdoms: seven or nine? *Biosystems, Limerick*. 14: 461-481.
- Cipriano, M.A.P.; Santos, A.S.; Patrício, F.R.A.; Freitas, R.P. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2005. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Pythium aphanidermatum* em sistemas hidropônicos. *In: Anais do 3º Congresso de iniciação científica em ciências agrárias, biológicas e ambientais, Arquivos do Instituto Biológico* 72: 24.
- Cipriano, M.A.P.; Magalhães, M.; Pinto, Z.V.; Macedo, B.B.A.; Patrício, F.R.A. & Santos A.S.** 2005. Controle biológico de *Pythium aphanidermatum* com *Trichoderma* sp. em mudas de alface, repolho e pepino. *In: XXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia, São Paulo, SP. Summa Phytopathologica* 31: 95.
- Corrêa, E.B.** 2006. Controle de podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento em alface hidropônica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 96p.
- Chambers, S.M. & Scott, E.S.** 1995. *In vitro* antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Journal of Phytopathology* 143: 471-477.
- Chérif, M. & Bélanger, R.R.** 1992. Use of potassium silicate amendments in recirculating nutrient solutions to suppress *Pythium ultimum* on long English cucumber. *Plant Disease* 76: 1008-1011.

- Chérif, M.; Tirilly, Y. & Bélanger, R.R.** 1997. Effect of oxygen concentration on plant growth, lipid peroxidation, and receptivity of tomato roots to *Pythium* F under hydroponic conditions. *European Journal of Plant Pathology* 103(3): 255-264.
- Chet, I.** 1987. *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. *In: I. Chet (ed.). Innovative approaches to plant disease control.* New York: John Wiley & Sons, pp. 137-160.
- Corabi-Adell C., Lucon C.M.M & Koike C.M.** 2002. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. *Arquivos do Instituto Biológico* 69: 158-191.
- Cotes, A.M.; Lepoivre, P. & Semal, J.** 1996. Correlation between hydrolitic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment and the protective effect against *Pythium splendens*. *European Journal of Plant Pathology* 102: 497-506.
- Dick, M. W.** 2001. The Peronosporomycetes, pp. 39-72. *In: D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin, & P. A. Lemke (eds.). The Mycota VII, part A. Systematics and evolution,* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Drechsler, C.** 1930. Some new species of *Pythium*. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 20: 398-418.
- Elad, Y.; Chet, I. & Henis, Y.** 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719-725.
- Favrin, R.J.; Rahe, J.E. & Mauza, B.** 1988. *Pythium* spp. associated with crown rot of cucumbers in British Columbia Greenhouses. *Plant Disease* 72(8): 683-687.
- Figueiredo, M.B.** 1967. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico* 33: 9-13.
- Filgueira, F.A.R.** 2000. Novo manual de olericultura: agrotcnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: Editora UFV, 402p.

- Furlani, P.R.** 1994. Cultivo de Alface pela Técnica de hidroponia NFT, Campinas: Instituto Agronômico, Sao Paulo, 21p.
- Furlani, P.R.** 1996. Hidroponia. Instituto Agronômico de Campinas, Boletim Técnico. 100: 1-277.
- Furlani, P.R.; Silveira, L.C.P.; Bolonhezi, D. & Faquin, V.** 1999. Cultivo hidropônico de plantas. Campinas: Instituto Agronômico, 52 p.
- Furlani, P.R.** 1999. Hydroponic vegetable production in Brazil. *Acta Horticulturae* 481: 777-778.
- Frezzi, M.J.** 1956. Espécies de *Pythium* fitopatogénicas identificadas en la República Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas* 10: 113-241.
- Gold, S.E. & Stanghellini, M.E.** 1985. Effects of temperature on *Pythium* root rot of spinach grown under hydroponic conditions. *Phytopathology* 75(3): 333-337.
- Goldberg, S.E. & Stanghellini, M.E.** 1992. Ingestion-egestion and aerial transmission of *Pythium aphanidermatum* by shore flies (Ephydrinae: *Scatella stagnalis*). *Phytopathology* 90(11): 1244-1246.
- Gomes, M.A.A.; Michereff, S.J & Mariano, R.L.R.** 2004. Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. *Summa Phytopathologica* 30(1): 38-42.
- Harman, G. E.** 2000. The Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* Strain T-22. *Plant Disease* 84 (4): 377-393.
- Hawksworth, D.L.; Kirk, P. M.; Sutton, B.C. & Pegler, D. N.** 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed., Egham, International Mycological Institute, 616p.
- Herrero, M.L.; Hermansen, A. & Elen O.N.** 2003. Occurrence of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. in Norwegian Greenhouses and their Pathogenicity on Cucumber Seedlings. *Journal of Phytopathology* 151: 36-41.
- Hidrogood.** 2007. Sobre hidroponia. Disponível: <http://www.hidrogood.com.br> (acesso Janeiro de 2007).
- Hydromall.** 2006. Nutrient Temperature, oxygen and *Pythium* in hydroponics. Disponível: <http://www.hydromall.com> (acesso em Setembro de 2006).

- Horticeres.** 2000. Horticeres lança nova variedade de alface crespa. Disponível: <http://www.horticeres.com.br> (acesso em Março de 2007).
- Ingram, D.M. & Cook, R.J.** 1990. Pathogenicity of four *Pythium* species to wheat, barley, peas and lentils. *Plant Pathology* 39: 110-117.
- Jackisch-Matsuura, A.B. & Menezes, M.** 1999. Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*). *Summa Phytopathologica* 25: 161-164.
- Jarvis, W.R.** 1992. Managing diseases in greenhouse crops. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, 288 p.
- Jarvis, W.R.; Shipp, J.L. & Gardiner, R.B.** 1993. Transmission of *Pythium aphanidermatum* to greenhouse cucumbers by the fungus gnat *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Annals of Applied Biology, Cambridge*. 122(1): 23-29.
- Jenkins, S.F., Jr. & Averre, C.W.** 1983. Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in North Carolina greenhouses. *Plant disease* 67(9): 968-970.
- Kamoun, S.; Huitema, E. & Vleeshouwers, V.G.A.A.** 1999. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends in Plant Science, Kidlington* 4(5): 196-200.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A.** 2001. *Dictionary of Fungi*. CABI Bioscience, 9th edition, 655p.
- Kleifeld, O. & Chet, I.** 1992. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth. *Plant Soil* 144: 267-72.
- Krugner, T.L. & Bacchi, L.M.A.** 1995. Agentes Causais - Fungos. *In: A. Bergamin Filho, L. Amorim, & H. Kimati (eds.). Agentes Causais - Fungos*. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1: 46-96.
- Labhidro.** 2006. Hidroponia. Disponível: <http://www.labhidro.cca.ufsc.br> (acesso em Novembro de 2006).

- Leal, A.B.M.; Leal, A.T.; Santurio, J.M.; Kommers, G.D. & Catto, J.B.** 2001. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínicos-patológicos de casos típicos e atípicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21(4): 151-156.
- Lenhardt, A.** 2000. Controle Biológico de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma sp.* em fumo cultivado no sistema float. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Rio Grande do Sul.
- Lévesque C.A & de Cock A.W.** 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108: 1363–1383.
- Lifshitz, R.; Windham, M.T. & Baker, R.** 1986. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 720-725.
- Lifshitz, R.; Zablutowicz, R.; Tippin, E.M.; Young, S. & Kloepper, J.W.** 1988. Biological control of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum* by *Pseudomonas putida* GR 12-2 which also stimulates seedling emergence directly. *Phytopathology* 78: 1521-1522.
- Lopes, C.A. & Quezado-Duval, A.M.** 1998. Doenças da alface. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, Circular técnica 14:20.
- Lopes, C.A.** 2003. Manejo integrado de doenças em cultivos hidropônicos. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 195-197.
- Lopes, C.A.; Carrijo, O.A. & Makishima, N.** 2005. Contaminação com patógenos em sistemas hidropônico: como aparecem e como evitar. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, Comunicado Técnico, n. 31.
- Lynck, J.** 1992. Pesquisa inglesa com agentes biológicos. *Jornal Agroceres* 212:2.
- Margulis, L.** 1990. Introduction. *In*: L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian, & D.J. Chapman (eds.). *Handbook of Protoctista*. Boston: Jones and Barlett Publishers, 685p.

- Martin F.N & Loper J.E.** 1999. Soilborne Plant Diseases Caused by *Pythium* spp.: Ecology, Epidemiology, and Prospects for Biological Control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(2): 111-181.
- Martinez Garcia, P.F.** 1978. Características climáticas de los invernaderos de plástico. Instituto Nacional de Investigaciones Agrárias – INIA, Madrid, Hojas Tecnicas. 19: 48 p.
- Matsumura, A.T.S.; Lenhardt, A. & Weiler, C.A.** 1998. Viabilidade do uso de controle biológico em produção de mudas de alface. *Fitopatologia Brasileira* 23: 257.
- Melo, I.S.** 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4: 261-295.
- Melo, I.S. & Costa, F.G.** 2005. Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos. Jaguariuna, SP: Embrapa Meio Ambiente, Comunicado Técnico, n. 31.
- Mendoza, L.; Ajello, L. & Mcginnis, M.R.** 1996. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Medicale* 6(4): 151-164.
- Menezes, N.L.; Santos, O.S. & Schmidt D.** 2001. Produção de sementes de alface em cultivo hidropônico. *Ciência Rural* 31(4): 705-706.
- Menzies, J.G.; Ehret, D.L. & Stan, S.** 1996. 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* 18(1): 51-54.
- Middleton, J.T.** 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 20: 1-171.
- Milanez, A.I.** 1989. Fungos de águas continentais. *In: O. Fidalgo & V.L. Bononi (eds.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico.* Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 17-20.
- Moore-Landecker, E.** 1996. *Fundamental of the fungi.* 4th. ed., New Jersey: Prentice-Hall, 574p.

- Nascimento, W.M & Cantliffe, D.J.** 2002. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. *Horticultura Brasileira* 20(1): 103-106.
- Naseby, D. C., Pascual, J. A. & Lynch, J. M.** 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology* 88(1):161-169.
- Ohse, S.; Dourado-Neto, D.; Manfron, P. A. & Santos O. S.** 2001. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. *Scientia Agricola* 58(1): 181-185.
- Owen-Going, N.; Sutton, J.C. & Grodzinski, B.** 2002. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25 (2): 155-167.
- Papavizas, G.C.** 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-25.
- Patrício, F. R. A.; Kimati, H. & Barros, B.C.** 2001. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathologica* 27(2): 223-229.
- Paulitz T.C.; Ahmad J.S & Baker R.** 1990. Integration of *Pythium nunn* and *Trichoderma harzianum* isolate T-95 for the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Plant Soil* 121: 243-250.
- Paulitz, T.C.** 1996. Biological control of root pathogens in soilless and hydroponic systems. *HortScience* 32(2): 193-196.
- Paulitz, T.C. & Bélanger, R.R.** 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103-133.
- Pinto, Z.V.; Sousa, A.L.O.P.; Silva, C.P.; Duarte, D.G.; Patrício, F.R.A.; Santos, A.S. & Teixeira, L. D.** 2005. Reação de cultivares de alface à podridão de raízes, causada por *Pythium helicoides*, em sistemas hidropônicos. *Summa Phytopathologica* 31 (supl.): 96.

- Pires-Zottarelli, C.L.A.** 1999. Fungos zoospóricos dos vales dos rios Moji e Pilões, região de Cubatão, SP. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 300p.
- Plaats-Niterink, A.J. van der.** 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21: 1-242.
- Ploetz, R.C.** 2004. Influence of temperature on *Pythium splendens* – induced root disease on carambola, *Averrhoa carambola*. Mycopathologia 157: 225-231.
- Punja, Z.K. & Yip, R.** 2003. Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. Canadian Journal of Plant Pathology 25: 411-417.
- Purquerio, L.F.V. & Tivelli, S.W.** 2005. Manejo do Ambiente em Cultivo Protegido. In: Anais do Seminário Regional de Agricultura Sustentável, Mogi das Cruzes, pp. 109-121.
- Rankin, L. & Paulitz, T.C.** 1994. Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium* root rot of greenhouse cucumbers in hydroponic culture. Plant Disease 78(5): 447- 451.
- Rech, R.R., Graça, D.L. & Barros, C.S. L.** 2004. Pitiose em um cão: relato de caso e diagnósticos diferenciais. Clinica Veterinária 50: 68-72.
- Ribeiro, O.K.** 1993. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. pp. 55-70. In: D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia & P.H. Tsao (eds.). *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Rocha, J.R.S.; Milanez, .A.I. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2001. O gênero *Pythium* (Oomycota) em áreas de cerrado no Parque Nacional de Sete Cidades, Piauí, Brasil. Hoehnea 28:209-230.
- Rodrigues, L.R.F.** 2002. Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em ambiente protegido. Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão, 762 p.
- Sallis, E.S.V.; Pereira, D.I.B. & Raffi, M.B.** 2003. Pitiose cutânea em equinos: 14 casos. Ciência Rural 33 (5): 899-903.
- Sanogo, S. & G.W. Moorman.** 1993. Transmission and control of *Pythium aphanidermatum* in ebb-and-flow subirrigation system. Plant Disease 77:287-290.

- Santurio, J.M.; Monteiro, A.B.; Leal, A.T.; Kommers, G.D; Sousa, R.S. de & Catto, J.B.** 1998. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia* 141: 123-125.
- Seeman, J.** 1979. Greenhouse climate. *In*: J. Seeman, Y.I. Chirkorv, J. Lomas & B. Primault (eds.). *Agrometerology*, New York, Springer-Verlag, pp. 167-178.
- Simoni, R.; Lipiarski, V.C.; Coelho, R.; Pereira Jr, C.T.; & Oliveira, J.L.B.** 2004. Uso de inoculante biológico *Trichoderma* no controle de *Pythium* em cultivo de alface hidropônica. *In*: 4º Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão. UFSC: Florianópolis.
- Smith, V.L.; Wilcox, W.F. & Harman, G.E.** 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80: 880-885.
- Sousa, A.L.O.P.; Pinto, Z.V.; Patrício, F.R.A.; Cipriano, M.A.P; Santos, A.S. & Teixeira-Yañez, L.D.D.** 2005. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Pythium helicoides* em sistemas hidropônicos. *Summa Phytopathologica* 31 (supl.): 95.
- Stanghellini, M.E. & Kronland, W.C.** 1986. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. *Plant Disease* 70(11): 1053-1056.
- Stanghellini, M.E.; White, J.G.; Tomlinson, J.A. & Clay, C.** 1988. Root rot of hydroponically grown cucumbers caused by zoospore-producing isolates of *Pythium intermedium*. *Plant Disease* 72(4): 358-359.
- Stanghellini, M.E. & Rasmussen, S.L.** 1994. Hydroponics – A solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease* 78: 1129-1138.
- Stanghellini, M.; Rasmussen, S.L.; Kim, D.H. & Rorabaugh, P.A.** 1996. Efficacy of nonionic surfactants in the control of zoospore spread of *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system. *Plant Disease* 80(4): 422-428.

- Sutton, J.C.;** Sopher, C.R.; Owen-Going, T.N.; Liu, W.; Grodzinski, B.; Hall, J.C. & **Benchimol, R.L.** 2006. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica* 32(4): 307-321.
- Teixeira-Yañez, L.D.** 2000. Identificação, Patogenicidade e Sensibilidade a produtos químicos *in vitro* de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa L.*). Dissertação de Mestrado, ESALQ, Piracicaba, SP, 74 p.
- Teixeira, L.D.;** Pires-Zottarelli, C.L.A. & **Kimati, H.** 2006. Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica no Brasil. *Summa Phytopathologica* 32: 221-226.
- Utkhede, R.S.;** Levesque, C.A. & **Dinh. D.** 2000. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22(2): 138-144.
- Vanachter, A.** 1995. Development of *Olpidium* and *Pythium* in the nutrient solutions of NFT grown lettuce, and possible control methods. *Acta Horticulturae* 382: 187-196.
- Vida, J.B.;** Zambolim, L.; Tessman, D.J.; **Brandão Filho, J.U.T.;** **Verzignassi, J.R. & Caixeta, Marilda Pereira.** 2004. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. *Fitopatologia Brasileira* 29(4): 355-372.
- Wang, P.H.;** Wang, Y.T. & **White, J.G.** 2003. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. *Letters in Applied Microbiology* 37 (2), 127-132.
- Waterhouse, G.** 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. *Mycological Papers* 109: 1-15.
- Whipps, J.M. & Lumsden, R.D.** 1991. Biological control of *Pythium* species. *Biocontrol Science Technology* 1: 75-90.
- Whittaker, R.H.** 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163 : 150-160.
- Zeroni, M.;** Gale, J. & **Ben-Asher, J.** 1983. Root aeration in a deep hydroponic system and its effect on growth and yield of tomato. *Scientia Horticulturae* 19(3): 213-220.

Zheng, J.; Sutton, J.C. & Yu, H. 2000. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. Canadian Journal of Plant Pathology 22(4): 368-379.

ANEXO 1

Avaliação Patogênica *in vitro* de *Pythium dissotocum* e *P. middletonii* na temperatura de 20°C referente ao comprimento da radícula.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	40.610000	13.536667	122.596	0.0000
PATÓGENOS	2	148.156333	74.078167	670.897	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	6	8.797000	1.466167	13.278	0.0000
erro	48	5.300000	0.110417		
Total corrigido	59	202.863333			
CV (%) =	10.33				
Média geral:	3.2166667	Número de observações:	60		

Avaliação Patogênica *in vitro* de *Pythium dissotocum* e *P. middletonii* na temperatura de 20°C referente ao comprimento do hipocótilo.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	0.894000	0.298000	41.581	0.0000
PATÓGENOS	2	0.752333	0.376167	52.488	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	6	0.173000	0.028833	4.023	0.0024
erro	48	0.344000	0.007167		
Total corrigido	59	2.163333			
CV (%) =	16.39				
Média geral:	0.5166667	Número de observações:	60		

Avaliação Patogênica *in vitro* de *Pythium middletonii* na temperatura de 23°C referente ao comprimento da radícula.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	14.186000	4.728667	15.568	0.0000
PATÓGENOS	1	12.321000	12.321000	40.563	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	6.329000	2.109667	6.945	0.0010
erro	32	9.720000	0.303750		
Total corrigido	39	42.556000			
CV (%) =	11.46				
Média geral:	4.8100000	Número de observações:	40		

Avaliação Patogênica *in vitro* de *Pythium middletonii* na temperatura de 23°C referente ao comprimento do hipocótilo.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	1.499000	0.499667	102.496	0.0000
PATÓGENOS	1	0.036000	0.036000	7.385	0.0105
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	0.044000	0.014667	3.009	0.0446
erro	32	0.156000	0.004875		
Total corrigido	39	1.735000			
CV (%) =	13.30				
Média geral:	0.5250000	Número de observações:	40		

Avaliação Patogênica *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C referente comprimento da radícula.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	13.052750	4.350917	28.886	0.0000
PATÓGENOS	1	95.172250	95.172250	631.849	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	3.892750	1.297583	8.615	0.0002
erro	32	4.820000	0.150625		
Total corrigido	39	116.937750			
CV (%) =	15.03				
Média geral:	2.5825000	Número de observações:	40		

Avaliação Patogênica *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C referente ao comprimento do hipocótilo.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	0.625000	0.208333	32.680	0.0000
PATÓGENOS	1	0.576000	0.576000	90.353	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	0.146000	0.048667	7.634	0.0005
erro	32	0.204000	0.006375		
Total corrigido	39	1.551000			
CV (%) =	17.17				
Média geral:	0.4650000	Número de observações:	40		

Avaliação Patogênica *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C referente a plântulas sobreviventes.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	1918.604090	639.534697	3.299	0.0328
PATÓGENOS	1	6614.669610	6614.669610	34.119	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	1918.604090	639.534697	3.299	0.0328
erro	32	6203.861400	193.870669		
Total corrigido	39	16655.739190			
CV (%) =	15.98				
Média geral:	87.1405000	Número de observações:	40		

ANEXO 2

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 20°C (Variedade Mimosa) referente ao comprimento da radícula.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	28.046750	9.348917	72.967	0.0000
PATÓGENOS	1	20.022250	20.022250	156.271	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	30.470750	10.156917	79.273	0.0000
erro	32	4.100000	0.128125		
Total corrigido	39	82.639750			
CV (%) =	6.45				
Média geral:	5.5525000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 20°C (Variedade Mimosa) referente ao comprimento do hipocótilo.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	0.244750	0.081583	3.932	0.0170
PATÓGENOS	1	0.182250	0.182250	8.783	0.0057
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	0.176750	0.058917	2.839	0.0534
erro	32	0.664000	0.020750		
Total corrigido	39	1.267750			
CV (%) =	18.18				
Média geral:	0.7925000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 20°C (Variedade Mimosa) referente a plântulas sobreviventes.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
PATÓGENOS	1	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
erro	32	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000		
Total corrigido	39	0.000000			
CV (%) =	0.00				
Média geral:	100.0000000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 20°C (Variedade Vera) referente ao comprimento da radícula.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	145.110750	48.370250	131.620	0.0000
PATÓGENOS	1	11.342250	11.342250	30.863	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	25.676750	8.558917	23.290	0.0000
erro	32	11.760000	0.367500		
Total corrigido	39	193.889750			
CV (%) =	9.94				
Média geral:	6.0975000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 20°C (Variedade Vera) referente ao comprimento do hipocótilo.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	0.192000	0.064000	12.488	0.0000
PATÓGENOS	1	0.081000	0.081000	15.805	0.0004
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	0.179000	0.059667	11.642	0.0000
erro	32	0.164000	0.005125		
Total corrigido	39	0.616000			
CV (%) =	13.26				
Média geral:	0.5400000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 20°C (Variedade Vera) referente a plântulas sobreviventes.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
PATÓGENOS	1	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
erro	32	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000		
Total corrigido	39	0.000000			
CV (%) =	0.00				
Média geral:	100.0000000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C (Variedade Mimosa) referente ao comprimento da radícula.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	46.045000	15.348333	49.431	0.0000
PATÓGENOS	1	12.321000	12.321000	39.681	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	12.517000	4.172333	13.437	0.0000
erro	32	9.936000	0.310500		
Total corrigido	39	80.819000			
CV (%) =	10.73				
Média geral:	5.1950000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C (Variedade Mimosa) referente ao comprimento do hipocótilo.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	0.276750	0.092250	6.308	0.0017
PATÓGENOS	1	0.182250	0.182250	12.462	0.0013
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	0.276750	0.092250	6.308	0.0017
erro	32	0.468000	0.014625		
Total corrigido	39	1.203750			
CV (%) =	14.88				
Média geral:	0.8125000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C (Variedade Mimosa) referente a plântulas sobreviventes.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	245.044920	81.681640	16.000	0.0000
PATÓGENOS	1	81.681640	81.681640	16.000	0.0004
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	245.044920	81.681640	16.000	0.0000
erro	32	163.363280	5.105103		
Total corrigido	39	735.134760			
CV (%) =	2.29				
Média geral:	98.5710000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C (Variedade Vera) referente ao comprimento da radícula.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	35.422000	11.807333	44.640	0.0000
PATÓGENOS	1	11.449000	11.449000	43.285	0.0000
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	22.769000	7.589667	28.694	0.0000
erro	32	8.464000	0.264500		
Total corrigido	39	78.104000			
CV (%) =	12.92				
Média geral:	3.9800000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C (Variedade Vera) referente ao comprimento do hipocótilo.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	0.082750	0.027583	3.245	0.0347
PATÓGENOS	1	0.042250	0.042250	4.971	0.0329
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	0.082750	0.027583	3.245	0.0347
erro	32	0.272000	0.008500		
Total corrigido	39	0.479750			
CV (%) =	21.57				
Média geral:	0.4275000	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vitro* de *Pythium dissotocum* na temperatura de 27°C (Variedade Vera) referente a plântulas sobreviventes.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VARIEDADES	3	3918.318367	1306.106122	8.983	0.0002
PATÓGENOS	1	1306.106122	1306.106122	8.983	0.0052
VARIEDADES*PATÓGENOS	3	3918.318367	1306.106122	8.983	0.0002
erro	32	4652.824520	145.400766		
Total corrigido	39	13795.567377			
CV (%) =	12.79				
Média geral:	94.2857500	Número de observações:	40		

Controle biológico *in vivo* de *Pythium dissotocum* (Variedade Mimosa) referente à massa fresca raiz.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASES	1	1113.420675	1113.420675	256.511	0.0000
TRATAMENTOS	3	167.738950	55.912983	12.881	0.0000
FASES*TRATAMENTOS	3	98.129242	32.709747	7.536	0.0004
erro	40	173.625600	4.340640		
Total corrigido	47	1552.914467			
CV (%) =	32.44				
Média geral:	6.4233333	Número de observações:	48		

Controle biológico *in vivo* de *Pythium dissotocum* (Variedade Mimosa) referente à massa seca raiz.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASES	1	5.326669	5.326669	616.542	0.0000
TRATAMENTOS	3	0.739156	0.246385	28.518	0.0000
FASES*TRATAMENTOS	3	0.266440	0.088813	10.280	0.0000
erro	40	0.345583	0.008640		
Total corrigido	47	6.677848			
CV (%) =	19.73				
Média geral:	0.4710417	Número de observações:	48		

Controle biológico *in vivo* de *Pythium dissotocum* (Variedade Mimosa) referente à massa fresca parte aérea.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASES	1	236081.424252	236081.424252	499.665	0.0000
TRATAMENTOS	3	14460.181490	4820.060497	10.202	0.0000
FASES*TRATAMENTOS	3	8744.693190	2914.897730	6.169	0.0015
erro	40	18899.185817	472.479645		
Total corrigido	47	278185.484748			
CV (%) =	23.56				
Média geral:	92.2539583	Número de observações:	48		

Controle biológico *in vivo* de *Pythium dissotocum* (Variedade Mimosa) referente à massa seca parte aérea.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASES	1	452.702252	452.702252	526.508	0.0000
TRATAMENTOS	3	18.656206	6.218735	7.233	0.0005
FASES*TRATAMENTOS	3	6.446040	2.148680	2.499	0.0733
erro	40	34.392783	0.859820		
Total corrigido	47	512.197281			
CV (%) =	22.03				
Média geral:	4.2093750	Número de observações:	48		

Controle biológico *in vivo* de *Pythium dissotocum* (Variedade Vera) referente à massa fresca raiz.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASES	1	713.175008	713.175008	305.090	0.0000
TRATAMENTOS	3	159.352383	53.117461	22.723	0.0000
FASES*TRATAMENTOS	3	68.871708	22.957236	9.821	0.0000
erro	40	93.503567	2.337589		
Total corrigido	47	1034.902667			
CV (%) =	29.62				
Média geral:	5.1616667	Número de observações:	48		

Controle biológico *in vivo* de *Pythium dissotocum* (Variedade Vera) referente à massa seca raiz.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASES	1	3.177552	3.177552	317.213	0.0000
TRATAMENTOS	3	0.679523	0.226508	22.612	0.0000
FASES*TRATAMENTOS	3	0.200040	0.066680	6.657	0.0009
erro	40	0.400683	0.010017		
Total corrigido	47	4.457798			
CV (%) =	27.69				
Média geral:	0.3614583	Número de observações:	48		

Controle biológico *in vivo* de *Pythium dissotocum* (Variedade Vera) referente à massa fresca parte aérea.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASES	1	161677.385269	161677.385269	412.646	0.0000
TRATAMENTOS	3	3712.776823	1237.592274	3.159	0.0350
FASES*TRATAMENTOS	3	1483.725023	494.575008	1.262	0.3003
erro	40	15672.271883	391.806797		
Total corrigido	47	182546.158998			
CV (%) =	28.60				
Média geral:	69.2214583	Número de observações:	48		

Controle biológico *in vivo* de *Pythium dissotocum* (Variedade Vera) referente à massa seca parte aérea.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASES	1	357.411675	357.411675	420.240	0.0000
TRATAMENTOS	3	18.439892	6.146631	7.227	0.0005
FASES*TRATAMENTOS	3	6.312825	2.104275	2.474	0.0754
erro	40	34.019800	0.850495		
Total corrigido	47	416.184192			
CV (%) =	27.44				
Média geral:	3.3604167	Número de observações:	48		