

KATYA DA SILVA PATEKOSKI

**Patogenicidade e controle biológico de *Pythium*
aphanidermatum (Edson) Fitzp. em variedades
de alface (*Lactuca sativa* L.) em sistema
hidropônico**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a 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

2010

KATYA DA SILVA PATEKOSKI

Patogenicidade e controle biológico de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.) em sistema hidropônico

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a 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 AMORIM PIRES-ZOTTARELLI

À minha querida mãe Ismarina, pelo inestimável amor, incentivo e apoio que desde os primeiros passos ajudaram-me a trilhar o caminho.

DEDICO

“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquentando e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”
João Guimarães Rosa

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme todas as tuas forças”.
Salomão (Provérbios 9:10)

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão a Deus, que de forma grandiosa tem guiado a minha vida, dando-me sobretudo força, ânimo e coragem.

Aos meus pais Jair Patekoski e Ismarina da Silva Patekoski; aos irmãos Hueder da Silva Patekoski e Kellen da Silva Patekoski Pioker, cujo amor, incentivo e apoio sempre presentes são o meu alicerce.

À Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli, pela excelente orientação dada, pela dedicação, responsabilidade, competência, amizade e paciência durante a execução deste projeto.

Ao Wemeson Ferreira da Silva, pelo apoio, cuidado, companheirismo e incentivo.

Ao Filipe Rosa Baptista, que com grande dedicação e simpatia ensinou-me grande parte das técnicas utilizadas no projeto e esteve sempre disposto em ajudar.

À pós-graduação do Instituto de Botânica, pelo apoio e oportunidade de desenvolver este projeto.

À CAPES, pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de Mestrado.

Às empresas Biovale, Empresa Caxiense de Controle Biológico, Hidrogood e Sakata; e ao Sr. Hideo Kuramoto, que contribuíram para a execução do projeto através de esclarecimentos, sugestões e doação de materiais utilizados nos experimentos.

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica, pela disposição ao emprestar os equipamentos e pelos ensinamentos: Adriana de Mello Gugliotta, Dácio Roberto Matheus, Iracema Helena Schoenlein-Crusius, José Ivanildo de Souza, Marcelo Pinto Marcelli, Marina Capelari, Michel Navarro Benatti, Rosely Ana Piccolo Grandi e Vera Maria Valle Vitali.

Às funcionárias de apoio do Núcleo de Pesquisa em Micologia, Rosimeire Aparecida Inácio e Marli Gomes Lima do Nascimento, pelo apoio e constante disposição em ajudar.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Micologia, pelo excelente convívio e experiências compartilhadas, em especial: Adriano Afonso Spielmann, Camila Pedral Aidar, Carolina Gasch Moreira, Cristiane de Almeida Nascimento, Fabiane Tamehiro, Fernanda Karstedt, Jailson Francisco dos Santos, Janaina Pinheiro Costa, Josie Paraizo, Juliana Possatto Takahashi, Luciana da Silva Canêz, Luciana Jandelli Gimenes, Luiz Antonio Silva Ramos, Maira Cortellini Abrahão, Marcos Junji Kitaura, Nelson Menolli Junior, Patrícia Junghblut, Priscila da Silva, Thiara Siqueira Bento e William Okada.

Aos alunos do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica, Fernanda Rios e Rodrigo Carminatti Burbarelli (em memória), pelos ensinamentos referentes à contagem em câmara de Fucs Rosenthal.

Às funcionárias Maria Helena Simões Costa Fernandes Gallo e Márcia Regina Ângelo, da biblioteca e pós-graduação do Instituto de Botânica respectivamente, pelo excelente atendimento prestado.

À Dra. Cleusa Maria Mantovanello Lucon e à Dra. Flavia Rodrigues Alves Patrício, pelas sugestões dadas durante a realização do trabalho e esclarecimentos referentes a algumas técnicas utilizadas no projeto.

Ao Dr. Pedro Roberto Furlani pelo incentivo e esclarecimentos sobre sistemas hidropônicos.

Aos funcionários do Instituto de Botânica, cujo auxílio foi essencial para a execução deste projeto, em especial: Arnaldo de Carvalho Lima, Alípio Santana de Oliveira, José Roberto Mourelli, Marco Antônio Machado, Afonso Lucidio Correia de Lima, Mauro Semaco e todo o pessoal da jardinagem e da sub-frota.

Aos amigos e colegas com os quais compartilhei ótimos momentos no alojamento do IBT: Ana Livia Negrão Leite Ribeiro, Ana Margarita Loaiza Restano, Camila Francieli da Silva Malone, Cintia Hering Rinnert, Elisa Mitsuko Aoyama, Ewerton Caltran Manarin, Fernanda Tresmondi, Luana Delega, Luciana Aparecida Giacomini, Mauricio Batista Fialho, Nidia Mara Marchiori, Simone Ferreira Silva, Simone Wengrat e Talita Silveira Amador.

Ao amigo Celso Nobuo Kawano Junior, cuja amizade verdadeira, o incentivo e apoio, sempre me ajudaram a prosseguir.

À amiga Elisa Mitsuko Aoyama, pelas sugestões dadas, companheirismo e amizade em todos os momentos.

Aos amigos Rafael da Silva e Dan Jesse Gonçalves da Mota, pelas experiências compartilhadas, pelo carinho e cuidado.

Às amigas Patrícia Couceiro e Vera Lucia Xavier da Costa, que mesmo à distância sempre torceram pela realização dos meus objetivos.

À Fernanda Karstedt, pelo empréstimo da máquina fotográfica para registro das imagens, pelo apoio e amizade.

Ao Jailson Francisco dos Santos, pelo incentivo e apoio.

Ao Heber Gomes de Haro Dias e à sua família, pelo auxílio, principalmente durante os primeiros meses do Mestrado.

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

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hidroponia: História e expansão	1
1.2. Sistemas hidropônicos e culturas produzidas no Brasil	3
1.3. Solução nutritiva: composição e manejo	5
1.4. Patógenos em cultivos hidropônicos: Gênero <i>Pythium</i> Pringsheim	6
1.5. Fatores que interferem na ocorrência e severidade de podridão de raiz, e patogenicidade de <i>Pythium</i> spp.	9
1.6. Manejo e controle de <i>Pythium</i> em cultivos hidropônicos	10
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Isolado de <i>Pythium</i> , variedades de alface e produtos empregados nos experimentos	15
3.2. Testes <i>in vitro</i>	16
3.2.1. Teste com os produtos biológicos comerciais – Biotrich®, Trichodermil® e Trichodel®	16
3.2.2. Concentração dos produtos Biotrich®, Trichodermil® e Trichodel® para os testes de controle biológico	17
3.3. Testes <i>in vivo</i>	18
3.3.1. Sistema hidropônico	18
3.3.2. Obtenção das mudas e cultivo das variedades de alface	19
3.3.3. Procedimento dos testes <i>in vivo</i>	19
3.3.4. Produção e inoculação dos zoósporos e aplicação dos biocontroles	21
3.3.5. Avaliação dos sintomas e da ação dos produtos biológicos comerciais	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Testes <i>in vitro</i>	23
4.1.1. Teste com o produto biológico Biotrich®	25
4.1.2. Teste com o produto biológico Trichodermil®	27
4.1.3. Teste com o produto biológico Trichodel®	29
4.2. Testes <i>in vivo</i>	31
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	45
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
8. LITERATURA CITADA	48

RESUMO

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzp. destaca-se como um dos patógenos mais comuns e destrutivos em cultivos hidropônicos, afetando uma ampla gama de hospedeiros ao redor do mundo. O controle desta espécie torna-se um desafio, especialmente nas épocas quentes do ano, devido à diminuição da resistência natural das plantas e à maior adaptação do patógeno nestas condições. A introdução de microrganismos antagonistas no controle de fitopatógenos é uma alternativa viável para a redução do uso de agroquímicos e proteção das culturas, sendo que *Trichoderma* spp. estão entre os agentes de biocontrole mais estudados e utilizados, havendo inclusive produtos formulados com tais antagonistas à disposição no mercado brasileiro, dentre eles o Biotrich®, o Trichodermil® e o Trichodel®. O presente estudo teve por objetivos avaliar o potencial patogênico de um isolado de *Pythium aphanidermatum* nas variedades de alface Vera e Elisa *in vitro* e em condições hidropônicas semelhantes às empregadas pelos hidroponicultores brasileiros na produção de alface; e testar o efeito dos produtos Biotrich®, Trichodermil® e Trichodel® no controle deste patógeno e na promoção de crescimento das variedades nas condições estudadas. Nos testes *in vitro*, placas de Petri com agar-água receberam uma alíquota de 1mL de suspensão dos produtos com as concentrações de 0,2mL/L (Biotrich®); 0,05, 0,1 e 0,2mL/L (Trichodermil®); e 0,25, 0,5 e 1mL/L (Trichodel®); plântulas recém germinadas (sete plântulas/placa) e, após 24h, discos com micélio do isolado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Placas contendo apenas as sementes de alface, com e sem os produtos serviram como controle. Ao final de 10 dias de incubação em 20 e 31°C, avaliou-se estatisticamente o comprimento das radículas e hipocótilos e a porcentagem de plântulas sobreviventes. Os testes *in vivo* foram conduzidos durante a primavera e verão, em sistema NFT (*Nutrient Film Technique*), com os produtos Biotrich® (0,2mL/L) e Trichodel® (0,25mL/L) e com a inoculação do patógeno feita por meio da imersão das raízes das plantas em suspensão de zoósporos na concentração de 5×10^3 zoósporos/mL. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3 (inoculação x produto), totalizando 12 tratamentos com seis repetições, sendo cada repetição representada por uma planta. Após 28 dias de permanência das plantas no sistema hidropônico, avaliou-se estatisticamente as massas fresca e seca da parte aérea e raízes das mesmas. *Pythium aphanidermatum* apresentou patogenicidade nos testes *in vitro*, reduzindo o comprimento das radículas e a porcentagem de plântulas sobreviventes das variedades, com maior agressividade verificada em 31°C. Nos experimentos *in vivo*, não foi verificada influência do patógeno sobre o desenvolvimento das plantas com a concentração de zoósporos

estudada. De maneira geral, os produtos nas concentrações testadas não promoveram o crescimento das plantas, e diminuíram o seu desenvolvimento em alguns tratamentos controle dos experimentos conduzidos *in vitro*. Entretanto, maior crescimento das plantas foi verificado com a aplicação dos produtos na presença do patógeno nos experimentos *in vitro*, o que demonstra que os biocontroles estudados possuem potencial para o controle de *Pythium aphanidermatum*, podendo ser utilizados em outros estudos visando o controle deste patógeno.

Palavras-chave: Hidroponia, alface, *Pythium*, podridão de raiz, controle biológico, *Trichoderma*

ABSTRACT

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzp. is one of the most common pathogens and destructive in hydroponic crops, affecting a wide range of hosts around the world. The control of this species becomes a challenge, especially in warm periods of the year, due to low natural resistance of plants and greater adaptation of the pathogen to these conditions. The introduction of antagonistic microorganisms to control plant pathogens is a viable alternative to reduce the use of agrochemicals in crop protection, and *Trichoderma* spp. are among the biocontrol agents most studied and used. There are even products made of such antagonists available at Brazilian market, for example Biotrich®, Trichodermil® and Trichodel®. This study aimed to evaluate the pathogenic potential of an isolate of *Pythium aphanidermatum* in varieties of lettuce (Vera and Elisa), in vitro and in hydroponic conditions, similar to those employed by Brazilian producers in hydroponic lettuce, and to test the effect of Biotrich®, Trichodermil® and Trichodel® as control this pathogen and in the promotion of growth of varieties under the conditions studied. In vitro, Petri dishes with water-agar received 1 mL of suspension products with concentrations of 0.2 mL/L (Biotrich®), 0.05, 0.1 and 0.2 mL/L (Trichodermil®), and 0.25, 0.5 and 1mL/L (Trichodel®), germinated seedlings (seven seedlings/plate) and after 24 hours, plugs with mycelium of the isolate. The experimental design was completely randomized with five replicates, where each replication was represented by a Petri dish. Plates containing only the seeds of lettuce, with and without the products served as controls. After 10 days of incubation at 20 and 31°C, the length of primary root, hypocotyls and the percentage of survivors seedlings were statistically analyzed. In vivo experiments were conducted during the spring and summer in NFT system (Nutrient Film Technique), with products Biotrich® (0.2 mL/L) and Trichodel® (0.25 mL/L) and the inoculation was made through immersion of plant roots suspended of zoospores concentration of 5×10^3 zoospores/mL. The experimental design was completely randomized following a factorial design 2x3 (inoculation x product), completing 12 treatments with six replicates, being each replicate represented by one plant. After 28 days of the plants in hydroponic system, the fresh and dry weight of shoots and roots were statistically analyzed. *Pythium aphanidermatum* showed pathogenicity in vitro experiments, reducing the primary root length and the percentage of survivors seedlings of varieties with increased aggressiveness observed in 31°C. In vivo experiments, there was no influence of the pathogen on plant growth with the concentration of zoospores studied. In general, the products at different concentrations did not promote plant growth, and decreased its development in some treatments of control experiments conducted in vitro. However, higher plant growth was observed with application

of the products in the presence of the pathogen in vitro experiments, showing that the biocontrol studies have the potential to control *Pythium aphanidermatum*, and can be used in other studies to control this pathogen.

Key words: Hydroponic system, lettuce, *Pythium*, root rot, biological control, *Trichoderma*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hidroponia: História e expansão

A hidroponia, termo derivado das palavras de origem grega *hidro* (água) e *ponos* (trabalho) é uma técnica alternativa de cultivo protegido, na qual o solo é substituído por uma solução aquosa que contém todos os elementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas (Resh 2001, Furlani *et al.* 2009a).

A técnica de cultivo hidropônico tal qual conhecemos atualmente possui uma história recente, entretanto, o seu uso é relatado desde as antigas civilizações. Os Jardins flutuantes chineses da dinastia Chou (1027-770 a.C), os Jardins Suspensos da Babilônia construídos pelo rei Nabucodonosor II por volta de 600 a.C. e as chinampas astecas que flutuavam em águas pantanosas no México (1325-1521) foram construídos baseados no conceito do atual cultivo hidropônico (Resh 2001, Portal Hidroponia 2010).

O desenvolvimento científico da hidroponia iniciou-se no século XVII, com estudos de John Woodward (1699), com o intuito de determinar as substâncias responsáveis pelo desenvolvimento das plantas e a constituição das mesmas. Woodward cultivou plantas em água contendo vários tipos de solo e concluiu que as plantas desenvolvem-se devido às substâncias presentes na água, derivadas do solo. O progresso na identificação destas substâncias foi lento, devido à ausência de técnicas sofisticadas de pesquisa. No século XIX, com os avanços no campo da química foi possível identificar os elementos requeridos para o desenvolvimento das plantas e cultivá-las na ausência de solo. Boussingult (1851), um químico francês, desenvolveu plantas em substratos inertes tais como areia, quartzo e carvão vegetal, com a adição de solução de conhecida composição, e Sachs (1860) e Knop (1861), em experimentos posteriores, eliminaram os meios e cultivaram as plantas em solução contendo apenas água e os minerais. Em anos seguintes, pesquisadores desenvolveram diversas fórmulas básicas para o estudo da nutrição de plantas (Douglas 1987, Resh 2001).

Em 1925, surgiu o interesse comercial das indústrias de casa de vegetação pela utilização dos cultivos em solução nutritiva, uma vez que os solos das estufas tinham que ser substituídos frequentemente para superar os problemas de estrutura, fertilidade e pragas. Foi então que na década de 30, o Dr. William F. Gerick, da Universidade da Califórnia, desenvolveu uma grande diversidade de frutas, flores, cereais e tubérculos, em sistema hidropônico quase comercial, pela primeira vez utilizando o termo hidroponia (Resh 2001, Jones Jr 2005). A nova técnica de cultivo sem solo recebeu impulso adicional com o surgimento da 2ª Guerra Mundial, onde toneladas de verduras e legumes foram produzidas pelo exército norte-americano e a Real Força Aérea em unidades hidropônicas instaladas em

suas bases militares, as quais foram consumidas pelos soldados aliados durante os anos da Guerra (Douglas 1987).

Nas décadas de 50 e 60, houve grande expansão da utilização de casas de vegetação na Ásia e Europa e o cultivo hidropônico já havia se espalhado em vários países como Alemanha, França, Itália, Suécia, antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS), Israel, Japão, Inglaterra e Espanha. Em meados de 1960, o *Glasshouse Crops Research Institute* (CGRI) desenvolveu a técnica do fluxo laminar de nutrientes (NFT), a partir da qual foram desenvolvidos outros sistemas hidropônicos. No Brasil, o cultivo hidropônico comercial teve início na década de 80, quando a técnica foi trazida do Japão por Shigeru Ueda e Takanori Sekine (Portal Hidroponia 2010). Desde a grande expansão ocorrida na década de 90, o cultivo hidropônico tem se difundido em todo o país, sendo encontrado nos cinturões verdes de algumas capitais e cidades do interior, especialmente nas regiões sul e sudeste (Lopes *et al.* 2003, Silva & Lima Neto 2007, Labhidro 2010). De acordo com o Coblasi (Comitê Brasileiro de Plasticultura), a estimativa de utilização da técnica de cultivo hidropônico por profissionais e hobistas é de 4.000 produtores somente no Estado de São Paulo, e outros 4.000 nos demais estados (Mathias 2008); além de sua utilização como atividade pedagógica em escolas, com o intuito de ampliar a concepção dos alunos sobre o conceito de ambiente e auxiliar na formação do cidadão profissional, oferecendo alternativas de trabalho e renda (Abrantes 2004, Santos 2006).

Atualmente, há em todo o mundo grandes áreas cultivadas através da hidroponia. Destacam-se por sua atuação no campo de pesquisa e utilização da técnica, o Japão, cuja escassez de grandes áreas cultiváveis e condições climáticas como invernos rigorosos exigem formas alternativas de cultivo; Israel, que produz hortaliças e flores ornamentais em grande escala; e os Estados Unidos, com grandes áreas de cultivo hidropônico e importantes projetos de pesquisa em andamento, principalmente pela NASA e empresas por ela contratadas. O grande interesse da agência espacial americana por esta técnica agrícola dá-se pelo fato de ser a hidroponia a principal forma de obtenção de alimentos no espaço (Revista da Terra 2009).

Dentre os fatores que contribuíram para a expansão da hidroponia estão a produção de hortaliças de ótima qualidade, melhor aproveitamento do espaço físico pelo uso de bancadas; perenidade na produção, principalmente em países onde é feito o controle das variáveis climáticas; menor incidência de pragas e doenças que seriam veiculadas pelo solo; melhor controle do meio nutritivo para o crescimento das plantas; além da menor contaminação do lençol freático por elementos químicos, uma vez que a solução nutritiva geralmente recircula no sistema (Furlani 1996, Rodrigues 2002, Beninni *et al.* 2005). Entretanto, algumas dificuldades podem ser encontradas na utilização desta técnica, tais como o custo inicial alto,

devido à necessidade das instalações básicas; necessidade de conhecimento técnico efetivo do sistema; acompanhamento permanente do funcionamento dos sistemas hidráulico e elétrico, onde a falta de energia sem que haja uma fonte alternativa pode levar à perda de toda a produção e facilidade de disseminação de determinados patógenos no sistema pela própria solução nutritiva circulante (Silva & Schwonka 2001, Labhidro 2010, Portal Hidroponia 2010).

1.2. Sistemas hidropônicos e culturas produzidas no Brasil

Os sistemas hidropônicos são compostos basicamente pelas bancadas com canais ou mesas de cultivo e pelo conjunto hidráulico (um ou mais reservatórios de solução nutritiva, conjunto moto-bomba, encanamentos e registros) responsável pelo armazenamento, recalque e drenagem da solução nutritiva (Furlani *et al.* 2009a); e as estruturas utilizadas variam de acordo com a região e os custos de implantação (Silva & Schwonka 2001). Podem ser classificados de acordo com a movimentação da solução nutritiva em estáticos ou passivos, quando a solução permanece estática junto ou próxima às raízes e é conduzida às plantas por meio de capilaridade; e em dinâmicos ou ativos, quando há a circulação forçada de água ou de ar efetuada geralmente por uma bomba (Hydor 2010). Prevalece atualmente a utilização de sistemas dinâmicos por propiciarem condições adequadas à respiração aeróbia das raízes, com boa absorção de água e nutrientes (Silva *et al.* 2005). Os sistemas hidropônicos são classificados também em abertos, quando a solução aplicada passa pelo sistema radicular e não retorna ao reservatório; e em sistemas fechados, quando a solução nutritiva percorre o sistema e o excesso é devolvido ao reservatório, possibilitando sua reutilização (Jones Jr 2005).

A escolha do sistema hidropônico a ser empregado depende, dentre outros fatores, do porte da espécie a ser cultivada, do consumo de energia, da disponibilidade e custo dos materiais e das exigências laborais para o manejo das culturas (Andriolo *et al.* 2004). Os sistemas mais utilizados são o NFT (*Nutrient Film Technique*) ou técnica do fluxo laminar de nutrientes; o DFT (*Deep Film Technique*) também denominado de cultivo na água ou *floating* e o sistema com substratos (Furlani *et al.* 2009a). No sistema NFT, predominante no Brasil, a produção é feita em bancadas com canais de cultivo. A solução nutritiva é bombeada aos canais e escoar por gravidade formando uma fina lâmina de solução que irriga as raízes das plantas, e é conduzida de volta ao reservatório por um sistema de retorno de solução (Teixeira-Yañez 2000, Furlani *et al.* 2009a). No sistema DFT, ao invés de canais de cultivo,

são utilizadas mesas planas ou caixas rasas niveladas e as raízes das plantas ficam submersas numa lâmina profunda de solução (5 a 20 cm), que circula através de um sistema de entrada e drenagem característicos. Este sistema é amplamente utilizado para a produção de mudas em bandejas de isopor contendo substrato, tais como algodão e vermiculita (Furlani *et al.* 2009a, Hydor 2010). O sistema com substratos tem sido utilizado para a produção de hortaliças frutíferas, flores e culturas que possuem sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos, sendo o substrato responsável pela sustentação das plantas, retenção de umidade, além de propiciar espaço poroso para aeração. São usados como substrato a areia, pedras diversas como a brita e o cascalho, a perlita, a vermiculita, a fibra de coco, a lã de rocha, a espuma fenólica e a casca de arroz carbonizada; os quais podem ser dispostos em sacos, vasos plásticos ou bancadas de canais, por onde a solução nutritiva é percolada e drenada, retornando ao reservatório (Stanghellini & Rasmussen 1994, Furlani *et al.* 2009a, Portal Hidroponia 2010). Além dos sistemas hidropônicos mencionados, há os sistemas de pavio, de sub-irrigação, de gotejamento, a aeroponia (Labhidro 2010), o CC (*Container Culture*) (Rodrigues 2002), e os e os sistemas em “pirâmide” e vertical, adaptados a partir do sistema NFT, com o propósito de reduzir custos, aproveitar melhor a área das estufas e aumentar a produtividade (Bliska Júnior 2008, Furlani & Fernandes 2008).

No Brasil, a produção hidropônica é desenvolvida em casas de vegetação, geralmente cobertas com filme plástico transparente, com proteção mínima contra as adversidades do ambiente (vento, chuva e intensa radiação solar) e sem sofisticado controle das variáveis climáticas (Sutton *et al.* 2006). Dentre as culturas produzidas no país, a alface (*Lactuca sativa* L.) é a planta cultivada em maior escala pela Técnica do NFT, que junto com o agrião (*Lepidium sativum* L.) e a hortelã (*Mentha* spp.), são responsáveis por 80% da produção hidropônica brasileira (Ohse 2001, Ornelas 2007). A preferência dos hidroponicultores pelo cultivo da alface se deve ao seu pioneirismo como cultura hidropônica no país; à sua fácil adaptação ao sistema, no qual tem revelado alto rendimento; melhor aspecto visual e redução do ciclo em relação ao cultivo no solo, viabilizando desta forma, o rápido retorno do capital investido nas instalações do sistema hidropônico (Ohse 2001, Lopes *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2006). Destacam-se também o tomate (*Lycopersicon esculentum* P. Miller), a cebolinha (*Allium fistulosum* L.), o morango (*Fragaria* spp.), a rúcula (*Eruca sativa* L.), a salsa (*Petroselinum* spp.) e o pepino (*Cucumis sativus* L.) (Furlani 1999, Hidrogood 2010).

1.3. Solução nutritiva: composição e manejo

Em hidroponia, a solução nutritiva destaca-se como fator de grande importância e preocupação àqueles que utilizam a técnica, uma vez que esta é responsável pelo fornecimento dos elementos essenciais ao desenvolvimento e produção das plantas e falhas no manejo e na formulação podem relacionar-se diretamente com produções escassas e subdesenvolvimento das culturas (Vital *et al.* 2002, Jones Jr. 2005, Hidrogood 2010).

Ao preparar a solução, primeiramente o hidroponicultor deve atentar para a qualidade da água, sendo indispensável fazer análises química e microbiológica, para verificar a presença de possíveis patógenos e coliformes fecais e a quantidade de nutrientes já existente, a ser descontada da fórmula da solução, dependendo de sua concentração na água (Jones Jr. 2005, Labhidro 2010).

Os elementos essenciais que compõem a solução nutritiva são os macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e o enxofre e os micronutrientes boro, cloro, cobre, ferro, manganês, molibdênio e o zinco, podendo as fontes de nutrientes ter diferentes composição e solubilização (Furlani *et al.* 1999, Lopes *et al.* 2005). Os elementos essenciais não minerais (carbono, hidrogênio e oxigênio) são incorporados ao metabolismo vegetal através da água e do ar atmosférico. Outros elementos químicos têm sido estudados e considerados benéficos ao crescimento das plantas, como o sódio, o silício, o cobalto, o níquel e o vanádio, sem contudo atender aos critérios de essencialidade (Jones Jr. 2005, Furlani *et al.* 2009b). Diversas fórmulas de solução nutritiva foram desenvolvidas por pesquisadores, mas não há uma solução que seja padrão e melhor que as demais, visto que cada espécie ou variedade possui sua própria exigência nutricional, esta variando também de acordo com o estágio fenológico da planta, com o tipo de sistema hidropônico, com a época do ano (duração do período da luz) e com o clima onde esta é cultivada (Vital *et al.* 2002, Lopes *et al.* 2005, Furlani *et al.* 2009b).

A solução nutritiva deve receber manejo adequado para manter suas características físico-químicas, sendo importante a análise periódica do pH, da condutividade elétrica, da temperatura e da oxigenação da solução. O pH sugerido para a maioria das soluções hidropônicas está entre 5,8 e 6,5, com tolerância para variações entre 4,5 e 7,5, sem ocasionar problemas ao crescimento das plantas. A oscilação do pH depende de fatores como a temperatura, absorção diferenciada de cátions e ânions, quantidade de CO₂ absorvido do ar, e tipo de íons presentes na solução (Jones Jr. 2005, Furlani *et al.* 2009b), devendo o mesmo ser mantido preferencialmente com solução nutritiva equilibrada em cátions e ânions, o que confere mais tamponamento à mesma (Furlani *et al.* 2009b); ou através da adição de NaOH

(hidróxido de sódio) 2N em caso de acidez; e de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 1N ou HCl (ácido clorídrico), em condição de pH alcalino (Ohse *et al.* 2001, Vital *et al.* 2002, Jones Jr. 2005).

Em sistemas hidropônicos fechados, é importante manter o volume original da solução, acrescentando-se diariamente a água utilizada pelas plantas. A reposição de nutrientes durante o desenvolvimento das culturas é o maior desafio dos produtores hidropônicos (Furlani *et al.* 2009b), sendo o controle da concentração salina geralmente feito mediante monitoramento da condutividade elétrica com condutivímetro portátil (Jones Jr. 2005, Lacerda 2009). Entretanto, uma vez que o condutivímetro não discrimina os nutrientes, para repor a solução nutritiva a quantidade de nutrientes absorvidos, são necessários outros testes, como a análise química (Resh 1998, Furlani *et al.* 2009b). Recentemente, esforços têm sido direcionados no Brasil, para o desenvolvimento de sensores que estimam a concentração de nutrientes individualmente, todavia, não há nada definitivo e confiável à disposição no mercado do país (Furlani *et al.* 2009b).

A temperatura da solução nutritiva não deve apresentar valores discrepantes abaixo ou acima da temperatura ambiente (Jones Jr. 2005), sendo que em países de clima tropical como o Brasil, sua diminuição é feita em épocas quentes geralmente pela instalação de nebulisadores de ar ou telas de sombreamento e cobertura.

Atenção deve ser dada também à taxa de oxigênio da solução, especialmente em sistemas como o NFT, onde pouco oxigênio pode chegar ao final dos canais de cultivo, pois a oxigenação da solução influencia diretamente na absorção de água e nutrientes. O borbulhamento de ar pode ser empregado na solução, visando aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido na mesma (Jones Jr. 2005, Furlani *et al.* 2009a).

1.4. Patógenos em cultivos hidropônicos: Gênero *Pythium* Pringsheim

A princípio, acreditava-se que, eliminando-se o solo no sistema de produção hidropônica, e por consequência os patógenos nele contidos, seria preservada a integridade dos órgãos subterrâneos da planta, principalmente as raízes. Entretanto, passada a euforia dos primeiros cultivos, percebe-se que a frequência com que as doenças aparecem é proporcional ao tempo de uso e das práticas de manejo do sistema (Lopes *et al.* 2005). Em cultivos hidropônicos, tem sido detectados bactérias como *Pseudomonas solanacearum* e espécies de *Erwinia*; o vírus Mirafiori da alface (MiLV), vírus do mosaico da alface (LMV); e fungos como *Bremia lactucae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e espécies do gênero *Pythium* (Jenkins & Averre 1983, Vida *et al.* 2004, Silva & Lima Neto 2007). Isolados de *Pythium* são

frequentemente destrutivos na maioria das culturas produzidas em sistemas hidropônicos, principalmente nas épocas em que ocorre a elevação da temperatura da solução nutritiva e do ambiente das casas de vegetação (Sutton *et al.* 2006).

O gênero *Pythium* criado por Pringsheim em 1858 é classificado atualmente como pertencente à família *Pythiaceae*, ordem *Pythiales*, classe *Oomycetes*, filo *Oomycota*, dentro do Reino *Chromista* (*Straminipila pro parte*). O gênero possui cerca de 150 espécies conhecidas, sendo a maioria delas cosmopolita, as quais podem ser sapróbias em diferentes tipos de substratos na água e no solo e/ou parasitas em algas, crustáceos, outros fungos, plantas vasculares, mamíferos, e inclusive no homem (Kirk *et al.* 2008). É considerado como um dos gêneros de organismos zoospóricos de maior importância, principalmente devido ao alto potencial parasítico de muitas de suas espécies em plantas de interesse econômico, causando apodrecimento de raízes, caules e frutos; a podridão de sementes na pré-emergência; e o tombamento de plântulas na pós-emergência, conhecido como *damping off*. Muitas espécies podem parasitar uma ampla variedade de hospedeiros, enquanto que outras são restritas à apenas uma espécie de hospedeiro (Plaats-Niterink 1981). Representantes de *Pythium* podem também ocasionar reduções significativas na produção de diversas culturas, mesmo na ausência de sintomas radiculares e foliares visíveis, o que tem sido classificado como infecção subclínica (Stanghellini & Kronland 1986, Owen-Going *et al.* 2003).

Diversos isolados de *Pythium* são citados em cultivos hidropônicos, tais como *Pythium catenulatum* Matthews, *P. dissotocum* Drechsler, *P. intermedium* de Bary, *P. irregulare* Buisman, *P. mamillatum* Meurs, *P. violae* Chester & Hickman, *P. paroecandrum* Drechsler, *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix, *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. uncinulatum* Van der Plaats-Niterink & Blok, *P. ultimum* Trow, *P. helicoides* Drechsler, *P. rostratum* Butler, *P. myritylum* Drechsler, *P. middletonii* Sparrow e isolados de *Pythium* do “grupo F” e do “grupo T” (Stanghellini & Kronland 1986, Stanghellini & Rasmussen 1994, Herrero *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2006). Destes, *Pythium aphanidermatum* destaca-se como uma das espécies mais comuns e destrutivas, afetando uma ampla gama de hospedeiros ao redor do mundo (Bates & Stanghellini 1984, Stanghellini & Rasmussen 1994, Cipriano *et al.* 2005, Menzies *et al.* 1996, Owen-Going *et al.* 2003, Punja & Yip 2003, Calvo-Bado *et al.* 2006, Sutton *et al.* 2006). A agressividade desta espécie é altamente influenciada pela temperatura, sendo seu controle um desafio, especialmente nas épocas mais quentes do ano, quando a temperatura eleva-se acima de 23°C (Bates & Stanghellini 1984, Herrero *et al.* 2003, Cipriano *et al.* 2005). Dentre as culturas hidropônicas afetadas por *P. aphanidermatum* estão a salsa (Gull *et al.* 2004), o pepino (Jenkins & Averre 1983, Goldberg & Stanghellini 1990, Herrero *et al.* 2003), a alface (Utkhede *et al.* 2000, Pinto *et al.* 2005a), o tomate (Jenkins & Averre 1983), o

espinafre (Bates & Stanghellini 1984), o tabaco (Pires-Zottarelli, dados não publicados) e o agrião (Pires-Zottarelli *et al.* 2009).

As fontes de inóculo de *Pythium* spp. que atuam no processo de infecção das culturas compreendem os zoósporos (esporos biflagelados), oósporos (gametas femininos fecundados), zoosporângios (estruturas produtoras de zoósporos) e fragmentos de hifa (Stanghellini & Rasmussen 1994, Martin & Loper 1999, Owen-Going *et al.* 2003, Sutton *et al.* 2006). Os zoósporos são apontados como a principal fonte de inóculos primário e secundário, de grande importância no início da infecção radicular e na disseminação do patógeno pelo sistema (Sutton *et al.* 2006); e os oósporos são a principal estrutura de sobrevivência, podendo resistir à dessecação e à desinfecção do sistema hidropônico com determinados produtos químicos, e permanecer em estado de dormência constitutiva, para então germinar sob condições favoráveis (Plaats-Niterink 1981, Martin & Loper 1999, Sutton *et al.* 2006).

Os inóculos de *Pythium* spp. podem ser introduzidos dentro do sistema hidropônico através da água utilizada no preparo da solução nutritiva (Lopes 2003, Corrêa 2006, Lozano & Caldevilla 2007); solo contaminado aderido aos calçados e aos implementos agrícolas utilizados para as operações de poda, desbaste e colheita; fragmentos de plantas contaminadas (Vida *et al.* 2004, Lopes 2003, Lozano & Caldevilla 2007); substratos sem esterilização (Stanghellini & Rasmussen 1994, Lopes 2003); mudas contaminadas (Corrêa 2006); sementes infectadas, com os sintomas da doença já aparecendo nos primeiros estádios de desenvolvimento da planta (Lopes 2003); e através dos vetores conhecidos como “fungus gnats” (*Bradysia* spp.) e “shore flies” (*Scatella stagnalis* Fallen.). Durante o período larval, ao alimentarem-se de raízes infectadas com *Pythium* spp., tais vetores ingerem estruturas do patógeno, como oósporos, que são acondicionadas no trato digestivo e transmitidas posteriormente, via aérea, pelos indivíduos adultos (Goldberg & Stanghellini 1990, Stanghellini & Rasmussen 1994).

Quando introduzido no sistema hidropônico, o patógeno é rapidamente propagado, através da dispersão dos zoósporos móveis, da movimentação resultante da circulação da solução nutritiva e do contato entre as raízes das plantas (Vanachter 1995, Menzies *et al.* 1996, Stanghellini & Rasmussen 1994, Sutton *et al.* 2006).

1.5 Fatores que interferem na ocorrência e severidade da podridão radicular, e patogenicidade de *Pythium* spp.

Variáveis climáticas (temperatura e intensidade luminosa) e alterações físico-químicas na solução nutritiva (diminuição da concentração de oxigênio dissolvido e alterações significativas nos valores de pH e condutividade elétrica), podem influenciar diretamente a ocorrência e severidade da podridão radicular ocasionada por *Pythium* spp. em cultivos hidropônicos (Sutton *et al.* 2006, Lozano & Caldevilla 2007). Destes fatores, a temperatura é apontada por diversos autores como um dos mais importantes (Bates & Stanghellini 1984, Stanghellini & Kim 1998, Stanghellini & Rasmussen 1994, Owen-Going *et al.* 2003, Sutton *et al.* 2006, Baptista 2007, Lozano & Caldevilla 2007), uma vez que, com o aumento da temperatura da solução nutritiva, sob influência da temperatura do ar, geralmente ocorre uma maior adaptação de grande parte dos isolados de *Pythium*, e uma diminuição da resistência natural das plantas, predispondo-as ao ataque por este patógeno (Stirling *et al.* 2004, Corrêa 2006, Baptista 2007). Bates & Stanghellini (1984) verificaram a influência da temperatura na ocorrência de dois espécimes de *Pythium* em cultivo hidropônico de espinafre, onde *P. aphanidermatum* predominou como agente causal de podridão radicular durante os meses de verão, quando a temperatura da solução elevou-se acima de 23°C, enquanto que *P. dissotocum* foi o agente primário durante a produção de inverno, com temperaturas entre 17 e 22°C. Fortnum *et al.* (2000) avaliaram o efeito da temperatura na severidade da podridão radicular ocasionada por *Pythium myriotilum* em plântulas de tabaco cultivadas em sistema hidropônico *floating*. Os experimentos foram conduzidos em 15, 20, 25 e 30°C e observou-se que a taxa de necrose radicular aumentou com a temperatura, com a menor taxa obtida em 15°C e a maior em 30°C.

Estudos conduzidos em condições de laboratório também têm demonstrado o efeito da temperatura no potencial patogênico de *Pythium* spp. Chellemi *et al.* (2000), em estudo com pimentas cultivadas em câmaras de crescimento em 20, 28 e 34°C, observaram significativa interação entre a temperatura e o potencial patogênico de *P. aphanidermatum* e *P. myriotylum*, sendo que a mortalidade das plantas foi verificada apenas na temperatura mais elevada (34°C). Triki *et al.* (2001) avaliaram a capacidade de isolados de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium ultimum* em causar podridão e descoloração em batatas. As batatas inoculadas com os espécimes foram incubadas em 20, 25 e 30°C, sendo que maiores danos foram encontrados nas temperaturas de 30°C, para *Pythium aphanidermatum* e 25°C, para *Pythium ultimum*. Teixeira *et al.* (2006) ao estudar o efeito *in vitro* da temperatura no potencial patogênico de *Pythium* spp. na variedade de alface Verônica verificaram que

isolados de *Pythium helicoides*, considerados os mais patogênicos, ocasionaram em 30°C a mortalidade de 100% das sementes logo após sua germinação, enquanto que em 21°C induziram o subdesenvolvimento de plântulas, acompanhado ou não de necrose dos tecidos radiculares. Baptista (2007) estudando a patogenicidade *in vitro* de *Pythium middletonii* e *P. dissotocum* em variedades de alface, verificou grande influência da temperatura no potencial patogênico de *P. dissotocum*, isolado mais agressivo. Em 20°C, o espécime ocasionou a inibição da formação de raízes laterais e necrose acentuada da raiz principal, na ausência de morte das plântulas; enquanto que em 27°C, além da sintomatologia verificada na temperatura de 20°C, houve uma baixa porcentagem de plântulas sobreviventes entre as variedades inoculadas. Patekoski & Zottarelli (2009) analisaram o potencial patogênico de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* em variedades de alface, em câmaras de crescimento, sob diferentes temperaturas. Para *P. aphanidermatum*, isolado mais agressivo, analisando-se os valores de comprimento das radículas e porcentagem de plântulas sobreviventes, verificou-se maior patogenicidade em 31°C do que em temperatura mais amena, de 20°C.

A suscetibilidade à podridão radicular pode estar relacionada com o estágio de desenvolvimento em que a planta hospedeira se encontra, onde raízes jovens e plantas no início do desenvolvimento são preferencialmente afetadas, e esta sensibilidade decresce com a idade da planta (Martin & Loper 1999, Schwarz & Grosch 2003, Sutton *et al.* 2006). A suscetibilidade pode também variar de acordo com a cultura e variedades produzidas. Em estudo realizado por Utkhede *et al.* (2000) em condições de cultivo hidropônico, os autores citam que a cultura da alface mostrou-se mais suscetível à *Pythium aphanidermatum* do que a de pepino. Segundo Pinto *et al.* (2005b), há diferenças em suscetibilidade entre cultivares de alface, tendo os mesmos relatado que cultivares crespas foram mais suscetíveis à *Pythium helicoides*, quando comparadas com as do tipo mimosa e lisa, dados corroborados por Baptista (2007), em estudo realizado com isolado de *Pythium dissotocum*.

A severidade da podridão radicular pode ser ainda influenciada pela forte variação na patogenicidade e virulência verificada entre espécies e espécimes de *Pythium* que atacam os cultivos hidropônicos e pela densidade de inóculo presente no sistema (Plaats-Niterink 1981, Menzies *et al.* 1996, Owen-Going *et al.* 2003, Baptista 2007).

1.6. Manejo e controle de *Pythium* em cultivos hidropônicos

O manejo integrado de doenças em cultivo protegido deve combinar princípios de controle visando reduzir ou eliminar o inóculo inicial e reduzir a taxa de progresso da doença,

enfocando o patógeno, o hospedeiro e o ambiente (Vida *et al.* 2004). Em cultivos hidropônicos, a entrada de *Pythium* spp. no sistema pode ser evitada, principalmente, por meio da utilização de água de boa qualidade e mudas saudáveis. É importante também a adoção de medidas de sanitização como a desinfestação das ferramentas de trabalho e das bancadas entre cada ciclo de cultivo, o manejo adequado das culturas, além de se manter o reservatório da solução nutritiva limpo e tampado (Stanghellini & Rasmussen 1994, Teixeira-Yañez 2000, Lozano & Caldevilla, 2007, Lacerda 2009). Uma vez o patógeno no sistema, o controle da doença torna-se difícil, existindo diversos métodos culturais para o seu controle, incluindo a desinfestação da solução nutritiva por meio da irradiação com luz ultravioleta, da filtração, da ozonização, da pasteurização, bem como o uso de surfactantes (Stanghellini & Rasmussen 1994, Sutton *et al.* 2006). No entanto, a aplicação de tais métodos em sistemas de escala comercial é dificultada pela grande quantidade de água utilizada no sistema, além de apresentar um custo muito elevado (Stanghellini & Rasmussen 1994, Sutton *et al.* 2006).

A utilização de variedades resistentes de algumas plantas seria uma alternativa viável para o controle da doença, mas as tentativas para produzir plantas com esta finalidade não tem sido amplamente bem-sucedidas (Martin & Loper 1999), não havendo cultivares com esta característica à disposição no mercado (Corrêa 2006).

O uso de produtos químicos para o controle de *Pythium* tem sido restrito em vários países (Gaag & Wever 2005), pois estes podem causar fitotoxidade nas plantas, redução de peso da parte aérea e radicular, além da contaminação do ambiente (Bates & Stanghellini 1984, Paulitz & Bélanger 2001, Utkhede *et al.* 2000). Teixeira-Yañez (2000) testou o efeito *in vitro* de diversos produtos no controle de *Pythium helicoides* Drechsler e *Pythium* sp., isolados de alface hidropônica. Os isolados mostraram-se suscetíveis à aplicação dos fungicidas mancozeb, metalaxyl + mancozeb, cymoxanil + maneb e cymoxanil + famoxadone e de espalhantes adesivos, estes provocando em sua maioria, a lise dos zoósporos. Hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e amônia quaternária, assim como os surfactantes, foram ineficientes na inibição do crescimento micelial dos isolados.

Métodos naturais menos agressivos são necessários para diminuir os prejuízos causados por este patógeno. O controle biológico vem ao encontro desta demanda, pois se baseia em métodos ambientalmente corretos, e que pode fazer parte de um controle integrado de doenças, sendo considerado como uma medida promissora para a redução do uso dos agrotóxicos e proteção das culturas (Grigoletti Junior *et al.* 2000, Slininger *et al.* 2003, Morandi & Bettiol 2009). 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 (Paulitz

& Bélanger 2001). A utilização de controle biológico nestes sistemas apresenta também a vantagem da atuação de agentes de biocontrole diretamente na zona de infecção do fitopatógeno, com a competição de ambos os microrganismos pelos exsudados presentes na zona radicular (Corrêa 2006). Entretanto, verifica-se que em determinadas condições pode haver falhas no biocontrole, como no caso de podridões radiculares ocasionadas por *Pythium* spp. em épocas quentes do ano, onde os prejuízos causados tornam-se mais sérios (Gaag & Wever 2005).

Os microrganismos estudados para o controle de *Pythium* em cultivos hidropônicos, incluem espécies de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, e fungos dos gêneros *Clonostachys*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, e inclusive *Pythium oligandrum* Drechsler (Gravel *et al.* 2005, Corrêa 2006, Cipriano *et al.* 2005, Cipriano 2009). Alguns destes microrganismos são utilizados em preparações comerciais, havendo atualmente mais de 80 produtos formulados com agentes de biocontrole em todo o mundo (Paulitz & Bélanger 2001). Corrêa (2006) testou o efeito de alguns microrganismos e produtos biológicos comerciais na promoção de crescimento de plantas de alface cultivadas em hidroponia, bem como, no controle da podridão radicular ocasionada por *Pythium aphanidermatum*. A autora verificou que *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* sp, *Paenibacillus lentimorbus*, *Saccharomyces cerevisiae*, e os produtos P.S.B solan® (formulado com *Rodopseudomonas*), Fishfétil® (fermentado de peixe) e Polyversum® (*Pythium oligandrum*), não foram eficientes na promoção de crescimento da alface, enquanto que o meio de cultura fermentado por *Bacillus subtilis* na concentração de 1% promoveu o crescimento da cultura. Entretanto, o controle da podridão radicular foi alcançado com a utilização de *Clonostachys rosea*. Baptista (2007) avaliou a eficiência do produto Biotrich, formulado com *Trichoderma* sp. no controle de *Pythium dissotocum* em variedades de alface cultivadas em kits hidropônicos caseiros e em condições de laboratório, verificando-se que o produto apresentou eficiência no controle do patógeno e atuou como promotor de crescimento das variedades estudadas.

Entre os microrganismos citados, os isolados do fungo *Trichoderma* Pers. estão entre os mais estudados e utilizados mundialmente (Krugner & Bacchi 1995, Cipriano *et al.* 2005, Lopes 2009), correspondendo a 90% das aplicações de antagonistas para o controle de doenças de plantas (Benítez *et al.* 2004). O gênero possui 102 espécies, as quais são consideradas ubíquas e importantes saprófitas (Kirk *et al.* 2008, Pomella & Ribeiro 2009). Espécies do gênero têm despertado interesse científico como produtores de enzimas para uso industrial e como agentes de controle biológico, sendo considerados eficazes no controle de

fitopatógenos, principalmente daqueles com estruturas de resistência difíceis de serem atacadas por microorganismos antagonistas (Melo 1996, Pomella & Ribeiro 2009).

No processo de biocontrole, os mecanismos de ação dos isolados de *Trichoderma* podem ser representados pelos efeitos diretos e indiretos causados no fitopatógeno (Silva & Melo 2007). Os efeitos diretos incluem a antibiose, com a secreção de metabólitos secundários voláteis e não voláteis que inibem o crescimento do patógeno (Wolffhechel & Jensen 1992, Martins-Corder & Melo 1998, Reino *et al.* 2008); competição pelos nutrientes e espaço físico, apresentando crescimento agressivo e rápida colonização do substrato (Martins-Corder & Melo 1998, Corabi-Adell *et al.* 2002, Benítez *et al.* 2004); e o micoparasitismo, mecanismo complexo que envolve o crescimento em direção ao fungo alvo, seguido do enrolamento e formação de estruturas semelhantes a ganchos ou apressórios, e degradação da hifa do patógeno pela secreção de enzimas líticas (Martins-Corder & Melo 1998, Jackisch-Matsuura & Menezes 1999, Lu *et al.* 2004, Watanabe *et al.* 2007). Como efeito indireto, destaca-se como ação dos isolados de *Trichoderma*, a indução de resposta imune nas plantas, conhecida como resistência sistêmica adquirida-SAR (Ahmed *et al.* 2000, Khan *et al.* 2004), podendo ser o grau de proteção provido por tal mecanismo tão efetivo quanto o provido por fungicidas (Hoitink *et al.* 2006). Os mecanismos de ação podem atuar de forma coordenada e sua importância nos processos de biocontrole depende da cepa de *Trichoderma*, do fungo a que antagoniza, do tipo de cultivo e das condições ambientais, tais como disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura e concentração de ferro (Benítez *et al.* 2004). Considerando-se a importância das ações antagonísticas de *Trichoderma* spp., diversos autores têm estudado o potencial de cepas para o controle de *Pythium* sp, tanto em solo como em cultivos hidropônicos (Hadar *et al.* 1984, Sivan *et al.* 1984, Paulitz *et al.* 1990, Jackisch-Matsuura & Menezes 1999, Patricio *et al.* 2001, Corabi-Adell *et al.* 2002, Cipriano *et al.* 2005, Gravel *et al.* 2005, Magalhães *et al.* 2005, Sousa *et al.* 2005, Pinto *et al.* 2005b, Corrêa 2006, Baptista 2007).

Além dos mecanismos envolvidos no controle de patógenos, certas linhagens de *Trichoderma* podem ter um efeito direto no crescimento e no florescimento de plantas, estimulando a germinação de sementes e aumentando a área foliar, o peso seco da parte aérea e o comprimento e massa seca das raízes (Lynch *et al.* 1991, Kleifeld & Chet 1992, Yedidia *et al.* 2001, Hoyos-Carvajal *et al.* 2009, Arriagada *et al.* 2009).

Os isolados de *Trichoderma* são facilmente propagados e formulados em laboratório, apresentando boa capacidade de armazenamento, possibilitando assim sua comercialização (Melo, 1996). Atualmente, há mais de 50 produtos à base de *Trichoderma* comercializados no mundo (Pomella & Ribeiro 2009). No Brasil, o primeiro produto comercial foi produzido em

1987 pelo Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado (atual Embrapa) e atualmente a produção e comercialização têm sido feitas por 13 empresas, principalmente no Centro-Sul do país, as quais utilizam a técnica de fermentação sólida em grãos de arroz, milho ou outros cereais, normalmente visando a produção de conídios como ingrediente ativo do produto (Lopes 2009, Morandi & Bettiol 2009). Os produtos formulados com *Trichoderma* spp. são encontrados no mercado nas formulações pó-molhável (PM), grânulos dispersíveis em água (WG) e líquidas (conídios em suspensões oleosas ou aquosas), com acréscimo de adjuvantes que protegem os propágulos e aumentam a vida de prateleira (Pomella & Ribeiro 2009). As espécies mais pesquisadas em relação à produção são *Trichoderma harzianum* Rifai e *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg, usadas no controle de fungos habitantes do solo causadores de prodrições radiculares e murchas, bem como *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schulth usado para o controle de vassoura-de-brucha em cacau (Lopes 2009). Com o intuito de organizar a cadeia produtiva de produtos de biocontrole, inclusive dos formulados com *Trichoderma* spp., foi criada em 2007 a ABCBio (Associação Brasileira de Empresas de Controle Biológico), que tem atuado na defesa dos interesses do setor frente aos órgãos governamentais, na divulgação da técnica e ampliação do mercado, além de criar normas para os testes de controle de qualidade dos produtos, fornecendo desta forma segurança ao consumidor final dos mesmos (Pomella & Ribeiro 2009, Morandi & Bettiol 2009).

Dentre os produtos formulados com *Trichoderma* spp. à disposição no mercado brasileiro estão o Binat T®, Biotrich®, Trichonat EF® e Trichonat PM®, Trichodermil®, Trichodel® e Tricovab® (Silva & Melo 2007). Dos produtos citados, até o presente momento, há apenas um produto (Trichodermil®) registrado para o controle de *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* na cultura do feijão; com solicitações de várias empresas sendo analisadas pelos órgãos competentes para registro (Morandi & Bettiol 2009). Segundo Pomella & Ribeiro (2009), no Brasil é grande a dificuldade encontrada pelas empresas de biocontrole para registrar seus produtos, dado o alto custo para o registro e o fato de a legislação utilizada ser a mesma para os agrotóxicos, e esta dificuldade é um fator limitante para a evolução do mercado de bioprodutos no país. Ressalta-se que além da falta de registro dos produtos, são ainda escassos os trabalhos conduzidos com os mesmos no Brasil, especialmente em sistemas hidropônicos. Até o presente momento, dos estudos relatados em literatura com produtos à base de *Trichoderma* spp., apenas o estudo de Baptista (2007) foi conduzido em sistema hidropônico, necessitando-se de novos estudos e projetos na área, para a somatória de resultados aos já obtidos.

Considerando ser a alface uma das hortaliças mais apreciadas e utilizadas na alimentação dos brasileiros, o aumento do consumo de hortaliças hidropônicas no Brasil, a presença de *Pythium* spp. como importantes patógenos em hidroponia e a escassez ou falta de pesquisa sobre o efeito de produtos formulados com *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium* spp. em cultivos hidropônicos, o presente projeto foi desenvolvido.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o potencial patogênico de um isolado de *Pythium aphanidermatum* nas variedades de alface Vera e Elisa *in vitro* e *in vivo*, em condições hidropônicas semelhantes às empregadas pelos hidroponicultores brasileiros na produção de alface;
- Testar o efeito dos produtos comerciais formulados com *Trichoderma* spp., Biotrich®, Trichodel® e Trichodermil® na promoção de crescimento das variedades de alface e no controle de *Pythium aphanidermatum in vitro*, selecionando os biocontroladores mais eficientes para teste *in vivo*, de modo a prover informações quanto à eficiência de produtos biológicos no controle deste patógeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolado de *Pythium*, variedades de alface e produtos empregados nos experimentos

O presente trabalho foi conduzido em condições de laboratório (*in vitro*) e em sistema de cultivo hidropônico (*in vivo*), utilizando-se para isto um espécime de *Pythium aphanidermatum* isolado de raízes sintomáticas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) hidropônico do Rio de Janeiro (RJ), proveniente da Coleção de algas, cianobactérias e fungos do Instituto de Botânica, São Paulo (CCIBt 2006, antiga SPC), sendo o mesmo preservado pelo método de Castellani (Figueiredo 1967), em frascos *Wheaton* com água destilada esterilizada (Milanez 1989) e em tubos de ensaio com meio de cultura CMA + p.v.e. (*corn meal* ágar DIFCO acrescido de penicilina, vancomicina, e sulfato de estreptomicina) (Carvalho & Milanez 1989 modificado), sendo os frascos *Wheaton* e os tubos acondicionados em câmara fria (± 10 °C) (Milanez 1989, modificado).

Para os testes de controle biológico foram utilizadas sementes de alface não peletizadas da Sakata®, das variedades Elisa (lisa) e Vera (crespa).

Os produtos comerciais utilizados nos testes de controle biológico *in vitro* foram o Biotrich® (Lote 04/Set/2009) em formulação líquida (suspensão em gel), fabricado e doado pela Biovale Produtos Agropecuários Ltda.; o produto Trichodel® Hidroponia (Lote 18/Ago/2009) em formulação líquida (suspensão aquosa), fabricado e doado pela Empresa Caxiense de Controle Biológico, e o produto Trichodermil® (Lote Set/2008) em formulação líquida (suspensão oleosa), produzido e adquirido através da Itaforte BioProdutos. O produto Biotrich® é indicado para a prevenção de doenças ocasionadas por fungos dos gêneros *Fusarium* Link, *Phomopsis* (Sacc.) Sacc., *Phytophthora* de Bary, *Plasmodiophora* Woronin *Pythium* Pringsheim, *Rhizoctonia* DC., *Rosellinia* De Not., *Sclerotinia* Fuckel e *Verticillium* Nees (Biovale 2010). O Trichodel® Hidroponia é indicado para o tratamento de doenças ocasionadas por *Pythium* spp. e *Fusarium* sp. (Empresa Caxiense de Controle Biológico 2010), e o produto Trichodermil® é indicado para o controle de *Botrytis ricini* N.F. Buchw., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Phytophthora capsici* Leonian, *Phytophthora palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Itaforte BioProdutos 2010).

Os testes de controle biológico *in vivo* foram conduzidos com os produtos que apresentaram resultados significativos para o controle do isolado de *Pythium aphanidermatum* e para o crescimento da plantas nos testes *in vitro*, utilizando-se os mesmos lotes dos produtos para a realização de todos os experimentos.

3.2. Testes *in vitro*

3.2.1. Teste com os produtos biológicos comerciais – Biotrich®, Trichodel® e Trichodermil®

Os experimentos de controle biológico *in vitro* foram conduzidos em 20°C, temperatura relatada em literatura como ideal para germinação de sementes de alface e produção da cultura (entre 15 e 20°C) (Nascimento & Cantliffe 2002, Bezerra Neto *et al.* 2005); e a 31°C, que é a temperatura ótima para o crescimento do isolado de *Pythium aphanidermatum* em estudo (Patekoski & Zottarelli 2009).

Placas de Petri com meio de cultura AA (ágar-água) receberam uma alíquota de 1mL de suspensão de cada um dos produtos, em concentrações detalhadas no item 3.2.1.1. Em seguida, plântulas de alface (sete plântulas/placa) recém germinadas por 24 horas em papel de filtro umedecido foram transferidas para as placas com meio de cultura AA com as respectivas suspensões, seguindo metodologia descrita em Souza *et al.* (2005) e Teixeira *et al.*

(2006). Para avaliar o efeito preventivo dos produtos, discos de 6mm diâm. com micélio do isolado de *P. aphanidermatum* crescido em CMA foram colocados após 24 horas no centro das placas (Patrício, dados não publicados). Os produtos foram testados com e sem a presença do patógeno. As testemunhas controle foram representadas por placas contendo apenas as sementes de alface, com e sem os produtos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Após 10 dias de incubação em câmaras de germinação com fotoperíodo de 12 horas foram avaliados o comprimento das radículas, dos hipocótilos e a porcentagem de plântulas sobreviventes segundo método descrito por Pinto *et al.* (2005b) e Teixeira *et al.* (2006). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa SISVAR, utilizando-se análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.1.1 Concentração dos produtos Biotrich®, Trichodel® e Trichodermil® para os testes de controle biológico

O produto Biotrich® contém em sua formulação conídios de *Trichoderma* sp., em concentração mínima necessária para a ação do produto como agente de biocontrole (10^9 UFC/mL) (Lenhardt, dados não publicados), e a dose indicada para a aplicação em cultivos hidropônicos é de 0,17 a 0,25 mL/L (Biovale 2010). Baptista (2007) testou o efeito *in vitro* do produto Biotrich®, nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,3mL/L, no controle de *Pythium dissotocum* Drechsler em variedades de alface (Mimosa e Vera), sendo estas concentrações igualmente eficientes no controle do patógeno e na promoção de crescimento das variedades. Segundo o autor, o valor médio da dose indicada (0,2mL/L) apresentou eficiência no controle do patógeno e como promotor de crescimento das variedades analisadas, quando posteriormente testado em kits hidropônicos caseiros, sendo esta a concentração utilizada no presente estudo.

Para o produto Trichodermil®, formulado com conídios de *Trichoderma harzianum* Rifai na concentração de 2.10^9 UFC/mL, não há indicação para a aplicação em sistemas hidropônicos, e estudos com o produto não foram realizados nestes sistemas. Considerando-se que os produtos Biotrich® e Trichodermil® possuem em sua formulação conídios de *Trichoderma*, para os experimentos com o produto Trichodermil® foram utilizadas as concentrações de 0,05mL/L, 0,1mL/L e 0,2mL/L, concentrações similares à dose indicada para o produto Biotrich®.

Para o Trichodel®, produto formulado com conídios de *Trichoderma* spp., não há estudos em sistemas hidropônicos. Entretanto, diferentes dosagens do produto são indicadas pela empresa fabricante para a aplicação em sistemas hidropônicos, estas dependendo da estação do ano e da presença de espécies de *Pythium* durante os cultivos, das quais foram testadas as concentrações de 1mL/L, concentração indicada em caso de infestação do sistema por *Pythium* sp. e como método preventivo durante o verão; 0,25mL/L, indicada para a prevenção durante as demais épocas do ano, e a concentração de 0,5mL/L, indicada para o uso após o controle de infestações (Empresa Caxiense de Controle Biológico 2010).

Para verificar se os conídios dos isolados de *Trichoderma* spp. presentes nos produtos estavam viáveis, realizou-se o plaqueamento de uma alíquota de 1mL dos produtos nas concentrações de 0,2mL/L (Biotrich®), 0,1mL/L (Trichodermil®) e 0,2mL/L (Trichodel®), nos meios de cultura EM (extrato de malte) e AA. As placas foram incubadas por dez dias em câmara de germinação, sem regime de luz, nas temperaturas em que os experimentos *in vitro* foram conduzidos (20 e 31°C) e na temperatura ótima de crescimento para a maioria dos fungos (25°C), com três repetições para cada produto, sendo cada repetição representada por uma placa.

3.3. Testes *in vivo*

3.3.1. Sistema hidropônico

O experimento *in vivo* foi conduzido em estufa hidropônica da Tropical Estufas® (figura 1a) no Instituto de Botânica de São Paulo, utilizando o sistema NFT. A bancada de cultivo hidropônico utilizada foi o Kit hidropônico residencial da Hidrogood® (figura 1b), de 1,00m x 0,70m x 0,80m, fabricado em polipropileno atóxico, contendo um reservatório de solução nutritiva de 17L, dois perfis para o berçário com 16 orifícios de 50mm de largura no espaçamento de 10cm x 10cm e, três perfis fase final com 12 orifícios no espaçamento 25cm x 25cm. A solução nutritiva utilizada foi a Hidrogood Fert da Hidrogood®, utilizando-se água mineral para o preparo da mesma.

A condutividade elétrica (CE), o pH, a temperatura da solução nutritiva e a temperatura do ambiente da estufa foram monitorados diariamente, às 6h30, 13h e 19h, sendo os parâmetros da solução nutritiva medidos com o instrumento de mensuração modelo Combo da Hanna Instruments®, e a temperatura da estufa verificada com auxílio de termômetro analógico de máxima e mínima do tipo capela. A temperatura externa do ar registrada durante os experimentos foi fornecida pela Estação meteorológica do Instituto de Astronomia,

Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo, localizada no Parque de Ciência e Tecnologia da USP, São Paulo, a aproximadamente 1km da área experimental.

A condutividade elétrica ideal para o cultivo da alface em sistemas hidropônicos (1,5-1,9 mS/cm) foi mantida, atentando-se também para o pH, que deve estar entre 5,5 e 6,5, segundo Furlani (1994).

A solução nutritiva foi reposta diariamente, preenchendo-se o reservatório de acordo com a quantidade evaporada e utilizada pelas plantas.



Figura 1. Sistema de cultivo hidropônico do experimento de patogenicidade e controle biológico *in vivo*. a. Estufa hidropônica. b. Kit hidropônico residencial da Hidrogood®.

3.3.2. Obtenção das mudas e cultivo das variedades de alface

A semeadura das variedades de alface foi realizada em bandejas de isopor de 200 células contendo substrato composto de turfa de Sphagno, vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK. As sementes foram irrigadas com água mineral até a abertura dos cotilédones, quando passaram a receber solução nutritiva com condutividade elétrica de aproximadamente 1,2 mS/cm (Kuramoto, dados não publicados). Após cerca de 25 dias, as plântulas foram transferidas para o sistema hidropônico, correspondendo à fase de berçário e passaram a receber solução nutritiva com condutividade entre 1,5 e 1,9mS/cm. Em 13 dias foi realizado o transplante dessas mudas para o local definitivo de cultivo, correspondendo à fase final do desenvolvimento, onde permaneceram por cerca de 17 dias até a colheita.

3.3.3. Procedimento dos testes *in vivo*

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos durante a primavera (outubro a novembro de 2009) e verão (janeiro a fevereiro de 2010), considerando-se a alta incidência do aparecimento de *Pythium* sp. em culturas hidropônicas em meses do ano em que há a elevação da temperatura (Stanghellini & Rasmussen 1994, Stanghellini & Kim 1998, Stirling *et al.* 2004, Corrêa 2006).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se para cada variedade de alface esquema fatorial 2x3 (inoculação x produto), com e sem inoculação com *Pythium aphanidermatum* e, com e sem a aplicação dos produtos que apresentaram resultados significativos para o controle do patógeno nos testes realizados *in vitro*. Foram 12 tratamentos, cada qual realizado com seis repetições, sendo cada repetição representada por uma planta:

1 - Sem *Pythium*, sem produtos, variedade Elisa (Controle)

2 - Sem *Pythium*, sem produtos, variedade Vera (Controle)

3 - Com *Pythium*, sem produtos, variedade Elisa

4 - Com *Pythium*, sem produtos, variedade Vera

5 - Sem *Pythium*, com produto 1, variedade Elisa

6 - Sem *Pythium*, com produto 1, variedade Vera

7 - Com *Pythium*, com produto 1, variedade Elisa

8 - Com *Pythium*, com produto 1, variedade Vera

9 - Sem *Pythium*, com produto 2, variedade Elisa

10 - Sem *Pythium*, com produto 2, variedade Vera

11 - Com *Pythium*, com produto 2, variedade Elisa

12 - Com *Pythium*, com produto 2, variedade Vera

Para a realização dos experimentos foram utilizadas seis (06) bancadas de cultivo, cada uma contendo o seu próprio reservatório de solução nutritiva. Em cada bancada de cultivo

foram agrupados dois (02) tratamentos, referentes à variedade mais e menos suscetível, nas mesmas condições testadas.

3.3.4. Produção e inoculação dos zoósporos e aplicação dos biocontroles

A inoculação de *Pythium aphanidermatum* nos tratamentos contendo o patógeno foi realizada por meio da imersão das raízes de todas as plantas em 40mL de suspensão de zoósporos na concentração aproximada de 5×10^3 zoósporos/mL, durante 30 minutos, sendo esta concentração indicada para o aparecimento de sintomas (escurecimento das pontas das raízes, diminuição do comprimento do sistema radicular e quantidade de raízes laterais, extensa descoloração marrom ou amarelada, e mudanças arquiteturais) nas plantas e disseminação do patógeno (Owen-Going *et al.* 2003, Baptista 2007).

A suspensão de zoósporos de *P. aphanidermatum* foi produzida adaptando-se a técnica descrita em Baptista (2007). Discos de 6mm diâm. foram retirados de colônias do isolado após quatro dias de desenvolvimento em meio de pepino (MP) (200g de pepino, 15g de Agar, 1L de água destilada, com pH corrigido para 6,2 com CaCO_3), e transferidos para placas de Petri contendo o mesmo meio. As placas foram mantidas durante 4 dias em câmara de germinação na temperatura de 25°C, sem incidência de luz; e ao final deste período, faixas de aproximadamente 1cm de largura foram cortadas e retiradas com o auxílio de uma espátula. Nos espaços intercalados entre as faixas e sobre o meio de cultura, foi adicionada água destilada esterilizada, com troca diária de aproximadamente 4 vezes para estimular a produção de zoosporângios (figura 2a). Ao final de 4 a 6 dias de troca de água, tendo sido produzidos os zoosporângios, a água contida nas placas foi oxigenada sucessivamente durante cerca de 1min com auxílio de um compressor de ar para aquário, sendo este procedimento necessário para estimular a liberação dos zoósporos do isolado em estudo (figura 2b). Em seguida, os zoósporos foram visualizados, paralisados com Tween 80 e quantificados com o auxílio de lâmina Fucs Rosenthal.

Os produtos comerciais foram testados nas concentrações que apresentaram melhores resultados *in vitro*. A aplicação dos produtos, bem como a inoculação dos zoósporos de *P. aphanidermatum* no tratamento contendo apenas as plantas e o patógeno foram realizadas dois dias após o transplante das plantas de alface para o sistema hidropônico. Nos tratamentos em que os produtos foram avaliados para o controle de *P. aphanidermatum*, a inoculação das plantas com a suspensão de zoósporos foi realizada após sete dias da aplicação dos produtos,

considerando-se ser este o tempo ideal (sete dias) para a ação de biocontrole formulado com *Trichoderma* spp. (Utkhede *et al.* 2000).

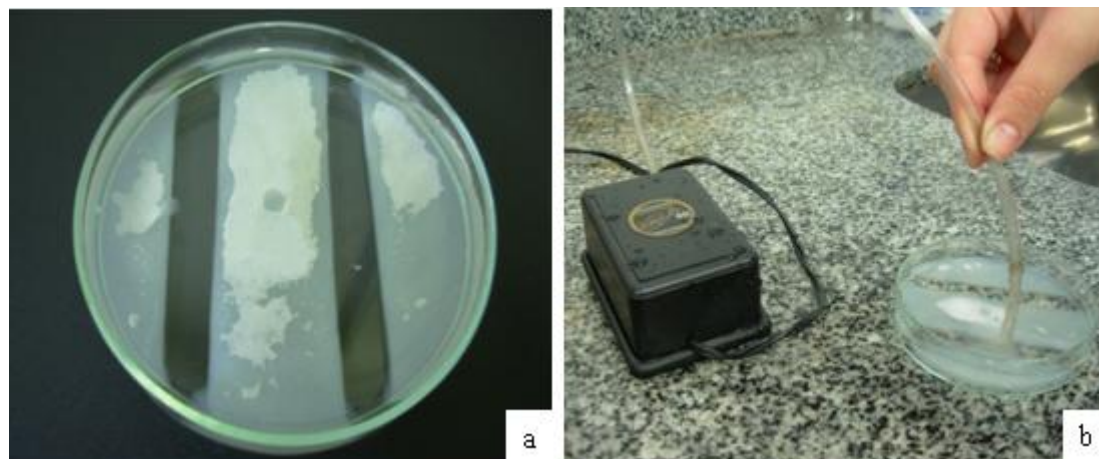


Figura 2. Produção de zoósporos de *Pythium aphanidermatum*. a. Placa com água destilada após retirada de faixas de meio de pepino. b. Oxigenação da água da placa para estimular a liberação de zoósporos.

3.3.5. Avaliação dos sintomas e da ação dos produtos biológicos comerciais

Os sintomas decorrentes da infecção por *Pythium* spp. foram avaliados nos dias subsequentes à inoculação de *Pythium aphanidermatum* no sistema.

Ao término do cultivo (aproximadamente 55 dias), as plantas foram colhidas e avaliou-se as massas fresca e seca (em gramas) da parte aérea e raízes das mesmas, utilizando balança digital da Toledo®, com o objetivo de analisar a influência do patógeno e dos produtos no desenvolvimento das plantas. Para obtenção da massa seca, as plantas foram colocadas em sacos de papel e acondicionadas em estufa com circulação de ar à 80°C até atingir peso constante, conforme método citado em Nakagawa (1994). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa SISVAR, utilizando-se análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para verificação da presença de *P. aphanidermatum* e dos isolados de *Trichoderma* dos produtos no sistema hidropônico, no momento da colheita, fragmentos de raiz dos tratamentos contendo o patógeno foram transferidos para placas de Petri com água destilada e metades de sementes de sorgo (*Sorghum* sp) previamente fervidas, e para placas com meio CMA + p.v.e.; sendo as raízes dos tratamentos com os produtos transferidas para placas com meio EM. Além

disso, fragmentos de raiz das plantas foram visualizados com auxílio de microscópio óptico da Leica®.

4. RESULTADOS

4.1. Testes *in vitro*

Nos testes de controle biológico *in vitro*, verificou-se que o isolado de *Pythium aphanidermatum* apresentou patogenicidade, sendo esta verificada por meio da análise do comprimento da radícula das variedades estudadas, em 20 e 31°C, onde redução significativa do comprimento foi obtida com a inoculação do patógeno nos tratamentos sem a aplicação dos produtos (tabelas 1-12). A patogenicidade também foi verificada por meio da porcentagem de plântulas sobreviventes de ambas as variedades na ausência dos produtos em 31°C, com menor porcentagem obtida nos tratamentos com o patógeno, podendo-se visualizar suas estruturas nas radículas necrosadas (tabelas 3-4, 7-8, 11-12) (figura 3).

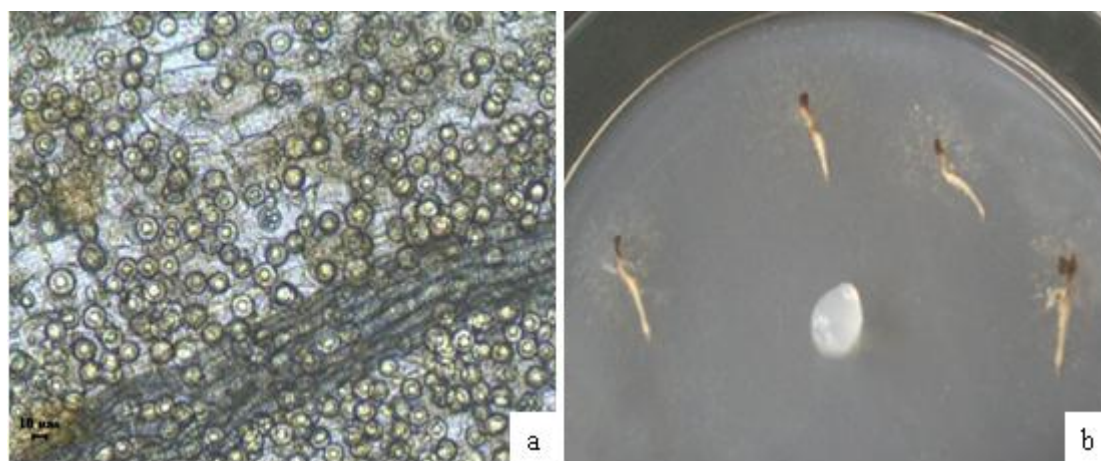


Figura 3. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vitro* em 31°C (Vera) referente ao tratamento sem os produtos. a. Oogônios de *Pythium aphanidermatum* na raiz. b. Plântulas mortas em uma das repetições.

O crescimento dos isolados de *Trichoderma* utilizados nas formulações dos produtos foi visualizado nas placas com extrato de malte e ágar-água em 20, 25 e 31°C, indicando a viabilidade dos conídios presentes nos lotes testados (Figura 4).

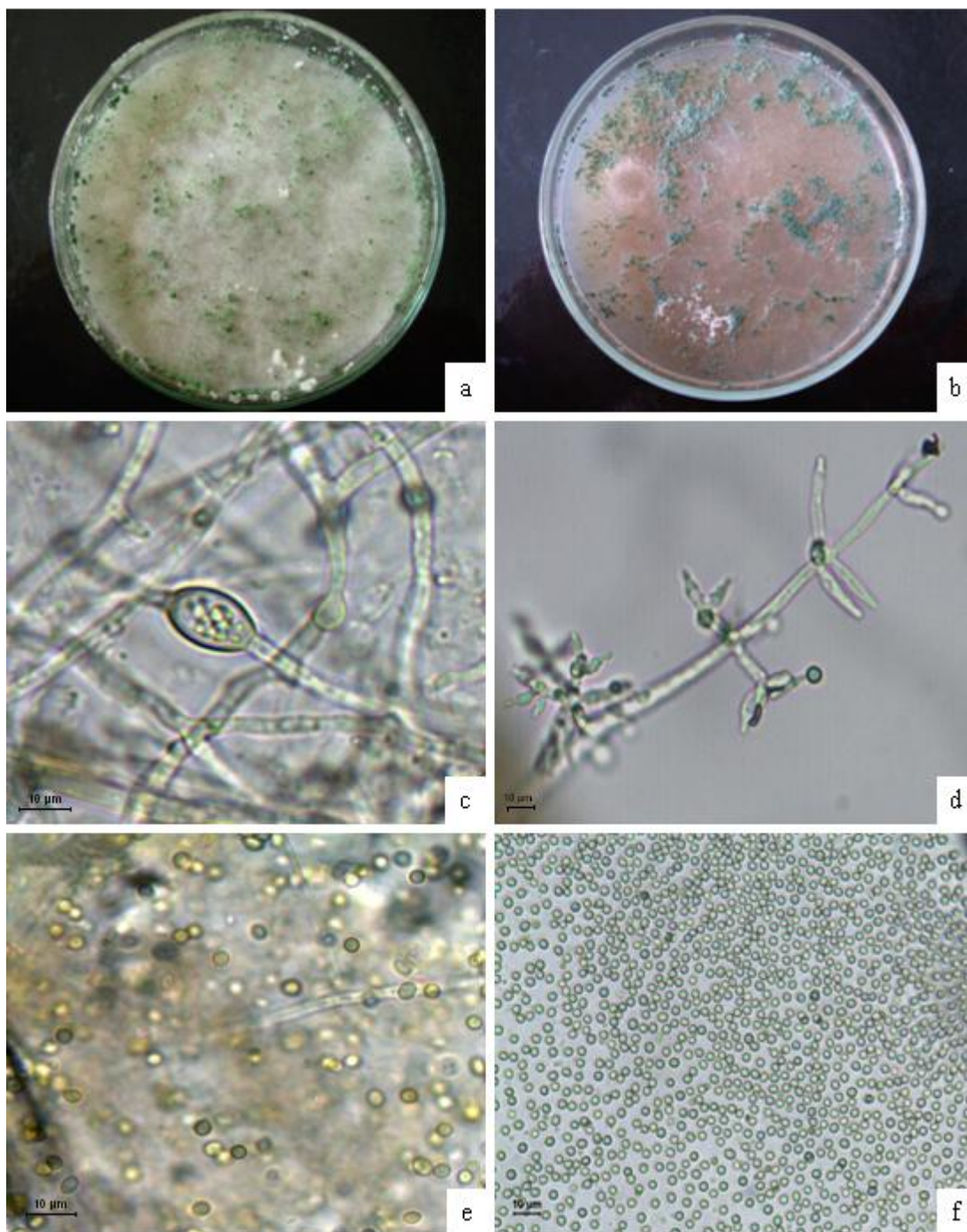


Figura 4. *Trichoderma* spp. dos produtos Biotrich®, Trichodermil® e Trichodel®. a. Crescimento de *Trichoderma* spp. (Trichodel®) em extrato de malte (25°C). b. Crescimento de *Trichoderma harzianum* (Trichodermil®) em extrato de malte (20°C). c. Clamidósporo de *Trichoderma harzianum* (Trichodermil®). d. Conidióforos, células conidiogênicas e conídios de *Trichoderma harzianum* (Trichodermil®). e. Conídios de *Trichoderma harzianum* (Trichodermil®). f. Conídios de *Trichoderma* sp. (Biotrich®) obtidos a partir de cultivo em ágar-água (20°C).

4.1.1. Teste com o produto biológico Biotrich®

Nos experimentos com o produto Biotrich® (0,2mL/L), avaliando-se o comprimento das radículas em 20 e 31°C na presença de *Pythium aphanidermatum*, verificou-se aumento significativo do comprimento com a aplicação do produto para ambas as variedades, o que indica a efetividade do produto no controle do patógeno (tabelas 1-4). Entretanto, em 31°C, a aplicação do produto nos tratamentos controle ocasionou redução significativa do comprimento das radículas das variedades (tabelas 3-4).

Quando avaliado o comprimento do hipocótilo, diferenças estatísticas não foram encontradas em 20°C. Em 31°C, houve aumento significativo do comprimento com a aplicação do produto nos tratamentos com e sem o patógeno para a variedade Vera, e na ausência do patógeno para a variedade Elisa (tabelas 3-4), demonstrando atuação do produto como promotor de crescimento desta estrutura.

Na porcentagem de plântulas sobreviventes, diferença estatística foi obtida com a aplicação do produto somente em 31°C, com aumento da porcentagem na presença do patógeno em Vera (tabelas 1-4).

Tabela 1. Teste de controle biológico *in vitro* em 20°C (Vera) com o produto Biotrich® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hipocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Concentração Biotrich (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Biotrich	7,36aB	2,99aA	0,46aA	0,45aA	100aA	100aA
0,2	8,88aA	10,48bA	0,44aA	0,34aA	100aA	100aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 2. Teste de controle biológico *in vitro* em 20°C (Elisa) com o produto Biotrich® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hypocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Concentração Biotrich (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Biotrich	8,64aB	1,25aA	0,48aA	0,54aA	100aA	100aA
0,2	7,44aA	7,70bA	0,56aA	0,48aA	100aA	97,14aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 3. Teste de controle biológico *in vitro* em 31°C (Vera) com o produto Biotrich® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hypocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Concentração Biotrich (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Biotrich	3,85bB	0,55aA	0,53aB	0,25aA	100aB	62,05aA
0,2	2,40aA	3,04bA	0,68bA	0,70bA	100aA	100bA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 4. Teste de controle biológico *in vitro* em 31°C (Elisa) com o produto Biotrich® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hypocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Concentração Biotrich (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Biotrich	4,54bB	0,74aA	0,67aA	0,58aA	100aB	88,57aA
0,2	2,98aA	2,76bA	0,94bB	0,66aA	100aA	97,14aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

4.1.2. Teste com o produto biológico Trichodermil®

Nos testes com o produto Trichodermil® em 20°C, ao avaliar o comprimento das radículas nos tratamentos com o patógeno, verificou-se aumento significativo do comprimento com a aplicação do produto na concentração de 0,05mL/L para a variedade Elisa (tabela 5). Entretanto, as concentrações testadas do produto diminuíram o comprimento das radículas de ambas as variedades na ausência do patógeno (tabelas 5-6). Para o hipocótilo, diferença estatística foi verificada somente em Elisa, com diminuição do comprimento com a concentração de 0,05mL/L na presença do patógeno (tabelas 5-6). Na porcentagem de plântulas sobreviventes, não foram encontradas diferenças estatísticas com a aplicação do produto nesta temperatura (tabelas 5-6).

Tabela 5. Teste de controle biológico *in vitro* em 20°C (Elisa) com o produto Trichodermil® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hipocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Trichodermil (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Trichodermil	8,64bB	1,25aA	0,48aA	0,54bA	100aA	100aA
0,05	2,00aA	2,44bA	0,44aA	0,38aA	100aA	100aA
0,1	1,72aA	1,44aA	0,42aA	0,44abA	100aA	100aA
0,2	1,68aA	1,34aA	0,46aA	0,42abA	100aA	100aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 6. Teste de controle biológico *in vitro* em 20°C (Vera) com o produto Trichodermil® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hipocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Trichodermil (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Trichodermil	7,36bB	2,99aA	0,46aA	0,45aA	100aA	100aA
0,05	3,04aA	2,18aA	0,40aA	0,40aA	97,14aA	100aA
0,1	2,42aA	2,16aA	0,40aA	0,40aA	100aA	100aA
0,2	3,42aA	2,50aA	0,38aA	0,38aA	100aA	100aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Em 31°C, houve aumento do comprimento das radículas e hipocótilos e porcentagem de plântulas sobreviventes em Vera nos tratamentos com *Pythium aphanidermatum*, com as três concentrações empregadas, indicando que o produto tem potencial para o controle do patógeno (tabela 7). O aumento da porcentagem de plântulas sobreviventes foi de aproximadamente 38% para as concentrações de 0,05 e 0,2mL/L, e de 35% para a concentração de 0,1mL/L (tabela 7). Entretanto, na ausência do patógeno, as concentrações testadas do produto diminuíram o comprimento das radículas de ambas as variedades (tabelas 7-8) (figura 5), com diminuição verificada também para o hipocótilo de Elisa, com a concentração de 0,2mL/L (tabela 8). Diferença estatística não foi obtida com a aplicação do produto para a porcentagem de plântulas sobreviventes de Elisa (tabela 8).

Tabela 7. Teste de controle biológico *in vitro* em 31°C (Vera) com o produto Trichodermil® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hipocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Trichodermil (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Trichodermil	3,85cB	0,55aA	0,53aB	0,25aA	100aB	62,05aA
0,05	2,02bB	1,60bA	0,56aA	0,56bA	100aA	100bA
0,1	1,44aA	1,40bA	0,44aA	0,48bA	100aA	97,14bA
0,2	1,82abA	1,48bA	0,50aA	0,52bA	100aA	100bA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 8. Teste de controle biológico *in vitro* em 31°C (Elisa) com o produto Trichodermil® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hipocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Trichodermil (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Trichodermil	4,54bB	0,74aA	0,67bA	0,58aA	100aB	88,57aA
0,05	1,76aA	1,30aA	0,56abA	0,52aA	97,14aA	94,29aA
0,1	1,26aA	1,02aA	0,62abA	0,58aA	97,14aA	100aA
0,2	1,14aA	1,04aA	0,50aA	0,52aA	97,14aA	97,14aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

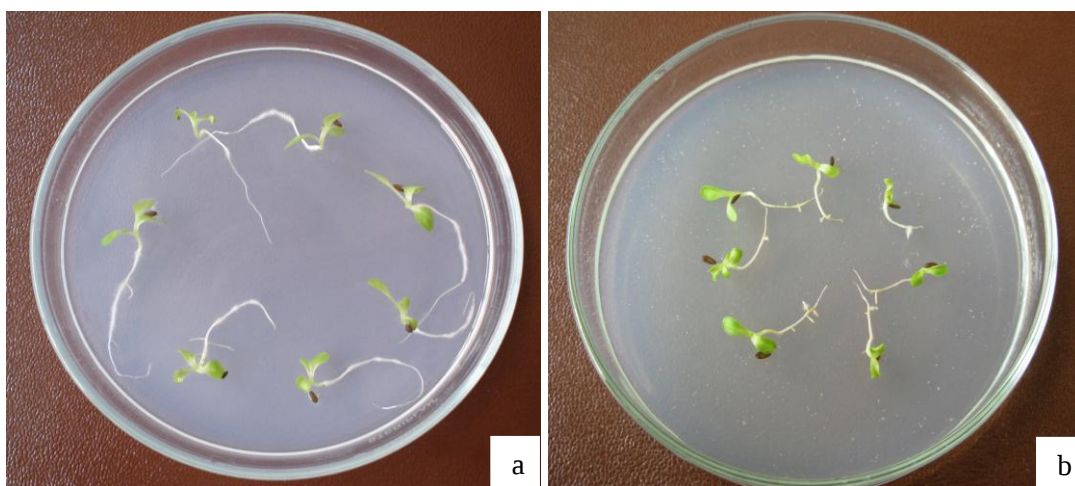


Figura 5. Teste de controle biológico *in vitro* em 31°C (Vera) referente ao experimento com o produto Trichodermil® na ausência do patógeno. a. Sem a aplicação do produto. b. Com a aplicação do produto na concentração de 0,1mL/L.

4.1.3. Teste com o produto biológico Trichodel®

Nos testes com o produto Trichodel®, verificou-se que o produto não atuou como promotor de crescimento das variedades de alface (tabelas 9-12). Avaliando-se o comprimento das radículas em 20 e 31°C, verificou-se que nos tratamentos com *Pythium aphanidermatum*, a aplicação do produto, nas três concentrações estudadas, promoveu aumento significativo do comprimento para as duas variedades, indicando a efetividade do produto no controle do patógeno (tabelas 9-12). Para a variedade Elisa, na presença do patógeno em 20°C, houve diferença significativa entre as concentrações empregadas, onde maior e menor comprimento das radículas foram obtidos com a aplicação do produto nas concentrações de 0,25 e 1mL/L respectivamente (tabela 10). Nos tratamentos controle, verificou-se que a aplicação do produto nas concentrações de 0,5 e 1mL/L ocasionou redução significativa do comprimento das radículas de Elisa em 31°C (tabela 12).

Quando avaliado o comprimento do hipocótilo, diferenças significativas foram obtidas somente em 31°C, onde o produto promoveu aumento do comprimento na presença do patógeno com as três concentrações empregadas para Vera, e com a concentração de 0,25mL/L para Elisa (tabelas 9-12).

As três concentrações testadas do produto aumentaram significativamente a porcentagem de plântulas sobreviventes das variedades na presença de *P. aphanidermatum* em 31°C, sem diferença estatística para este parâmetro em 20°C (tabelas 9-12).

Tabela 9. Teste de controle biológico *in vitro* em 20°C (Vera) com o produto Trichodel® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hipocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Trichodel (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Trichodel	7,36aB	2,99aA	0,46aA	0,45aA	100aA	100aA
0,25	7,82aA	9,36bA	0,50aA	0,40aA	100aA	100aA
0,5	8,56aA	8,58bA	0,38aA	0,42aA	100aA	100aA
1	6,92aA	8,30bA	0,42aA	0,34aA	97,14aA	100aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 10. Teste de controle biológico *in vitro* em 20°C (Elisa) com o produto Trichodel® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hipocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Trichodel (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Trichodel	8,64aB	1,25aA	0,48aA	0,54aA	100aA	100aA
0,25	7,70aA	8,32cA	0,52aA	0,52aA	100aA	100aA
0,5	7,66aA	7,54bcA	0,54aA	0,42aA	97,14aA	100aA
1	6,62aA	5,62bA	0,54aA	0,46aA	100aA	100aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 11. Teste de controle biológico *in vitro* em 31°C (Vera) com o produto Trichodel® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hipocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Trichodel (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Trichodel	3,85aB	0,55aA	0,53aB	0,25aA	100aB	62,05aA
0,25	2,82aA	3,30bA	0,60aA	0,64bA	100aA	100bA
0,5	2,78aA	3,68bB	0,58aA	0,60bA	97,14aA	100bA
1	2,82aA	3,88bB	0,60aA	0,58bA	97,14aA	97,14bA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 12. Teste de controle biológico *in vitro* em 31°C (Elisa) com o produto Trichodel® referente ao comprimento das radículas (CR), comprimento dos hipocótilos (CH) e porcentagem de plântulas sobreviventes (PPS)*

Trichodel (mL/L)	CR (cm)		CH (cm)		PPS (%)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Trichodel	4,54bB	0,74aA	0,67aA	0,58aA	100aB	88,57aA
0,25	3,45abA	3,12bA	0,70aA	0,80bA	97,14aA	100bA
0,5	2,48aA	3,86bB	0,82aA	0,74abA	97,14aA	100bA
1	2,52aA	3,00bA	0,82aA	0,76abA	100aA	100bA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Mediante os resultados obtidos nos testes de controle biológico *in vitro*, os produtos Biotrich® e Trichodel® foram selecionados para a condução dos experimentos *in vivo*, dada a atuação no controle do patógeno, além de serem menos prejudiciais ao desenvolvimento das plântulas de alface nos tratamentos controle. Para o Trichodel®, optou-se por utilizar a concentração de 0,25mL/L, com o intuito de verificar se esta concentração, indicada para a prevenção de infecção por *Pythium* spp. em hidroponia na primavera, outono e inverno, seria eficiente também no verão. Além disso, nos testes *in vitro*, maior comprimento da radícula foi obtido com esta concentração na presença do patógeno em Elisa (20°C) (tabela 10) e a mesma não ocasionou redução no desenvolvimento das plântulas (tabelas 9-12).

4.2. Testes *in vivo*

As temperaturas registradas durante os testes de patogenicidade e controle biológico *in vivo* foram semelhantes para os dois experimentos realizados, com alguns picos de temperatura elevada ao longo dos experimentos. Na primavera, a temperatura externa do ar variou de 16,9 (mínima) a 32°C (máxima) (média de 22,9°C), a do ambiente da estufa de 17 a 44°C (média de 24,6°C) e a da solução nutritiva de 19 a 36,6°C (média de 25,3°C) (figura 6). No verão, foram registradas para o ambiente externo temperaturas mínima e máxima de 18 e 32°C (média de 23,6°C), respectivamente; com a temperatura do ambiente da estufa variando de 18 a 43°C (média de 25,9°C) e da solução nutritiva de 21 a 38°C (média de 26,5°C) (figura 7).

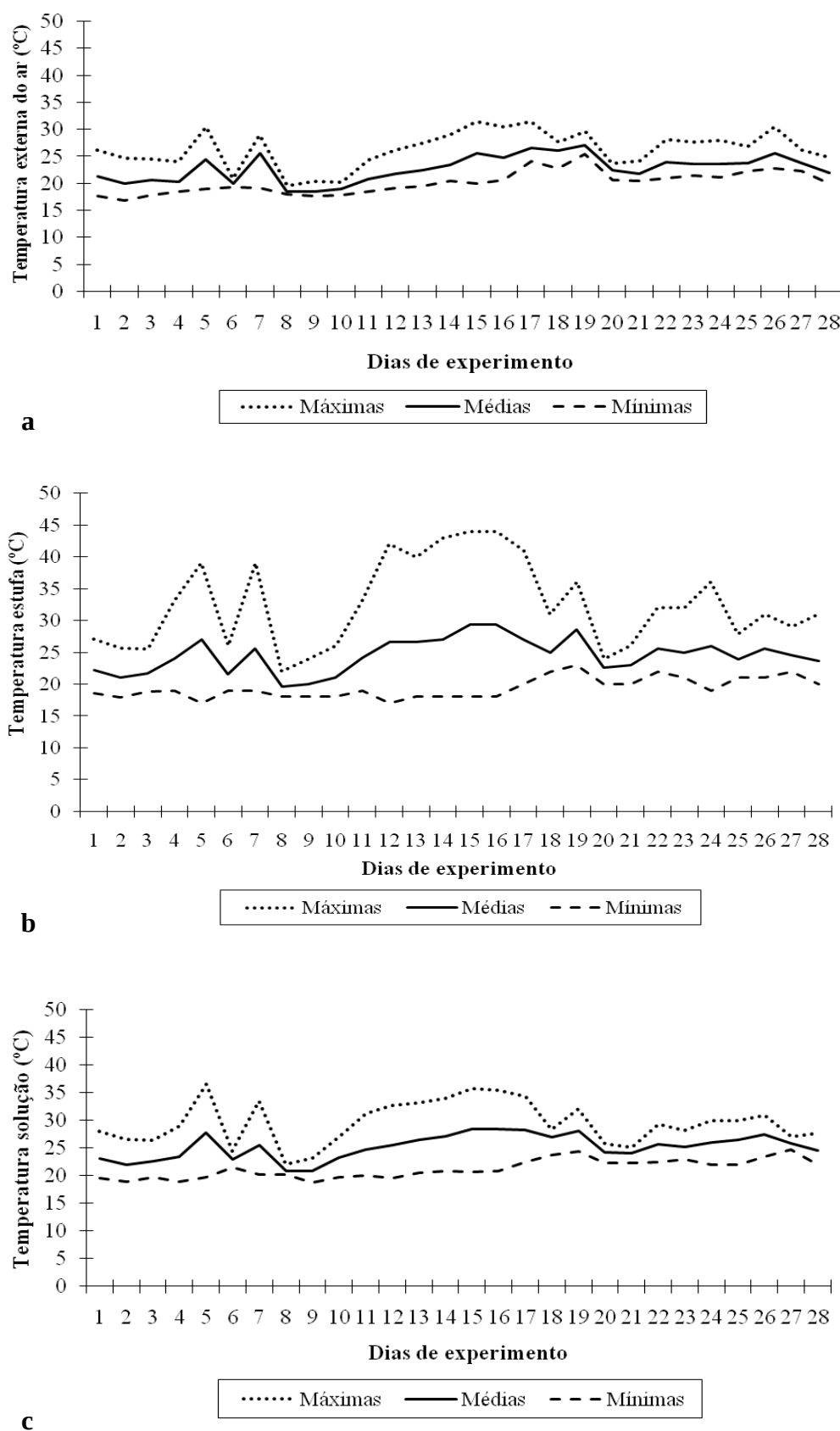


Figura 6. Temperaturas máximas, médias e mínimas registradas durante o período de desenvolvimento do experimento *in vivo* (primavera) no ambiente externo (a) na estufa (b) e na solução nutritiva (c).

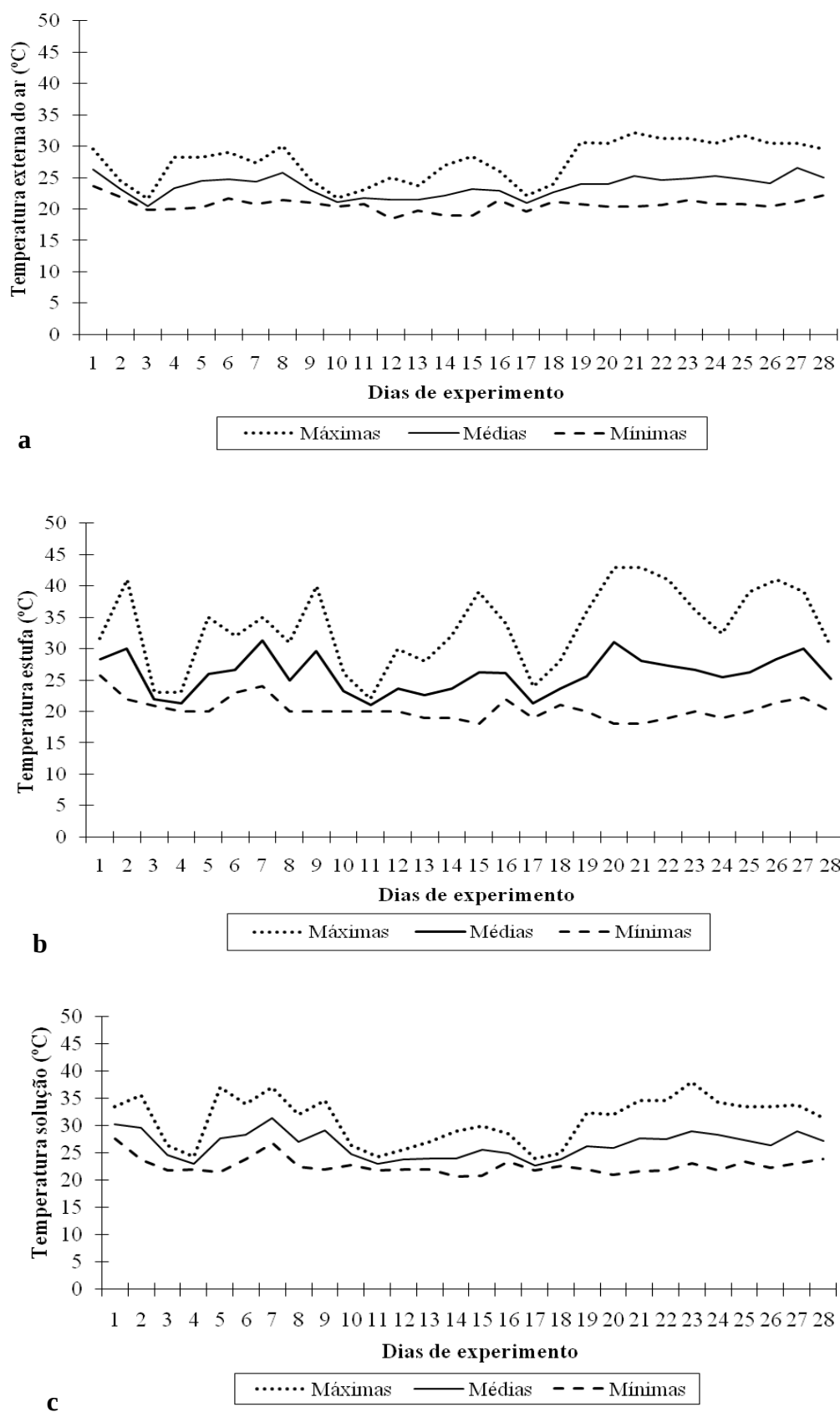


Figura 7. Temperaturas máximas, médias e mínimas registradas durante o período de desenvolvimento do experimento *in vivo* (verão) no ambiente externo (a) na estufa (b) e na solução nutritiva (c).

A presença de *Pythium aphanidermatum* foi detectada nos tratamentos contendo o patógeno e os produtos nos dois experimentos realizados, por meio da visualização de suas estruturas no meio de cultura CMA (*Corn Meal Agar*) e nos fragmentos de raiz dispostos nas placas com água destilada e sementes de sorgo (figura 8). Entretanto, sua presença não foi detectada nos tratamentos sem a aplicação dos produtos. O crescimento de *Trichoderma* spp. foi observado nas placas com extrato de malte e fragmentos de raiz, em todos os tratamentos em que os produtos foram aplicados. Deve ser ressaltado que ao analisar os fragmentos de raiz e as placas com meio de cultura, observou-se grande quantidade de nematóides, rotíferos e protozoários presentes nas amostras.

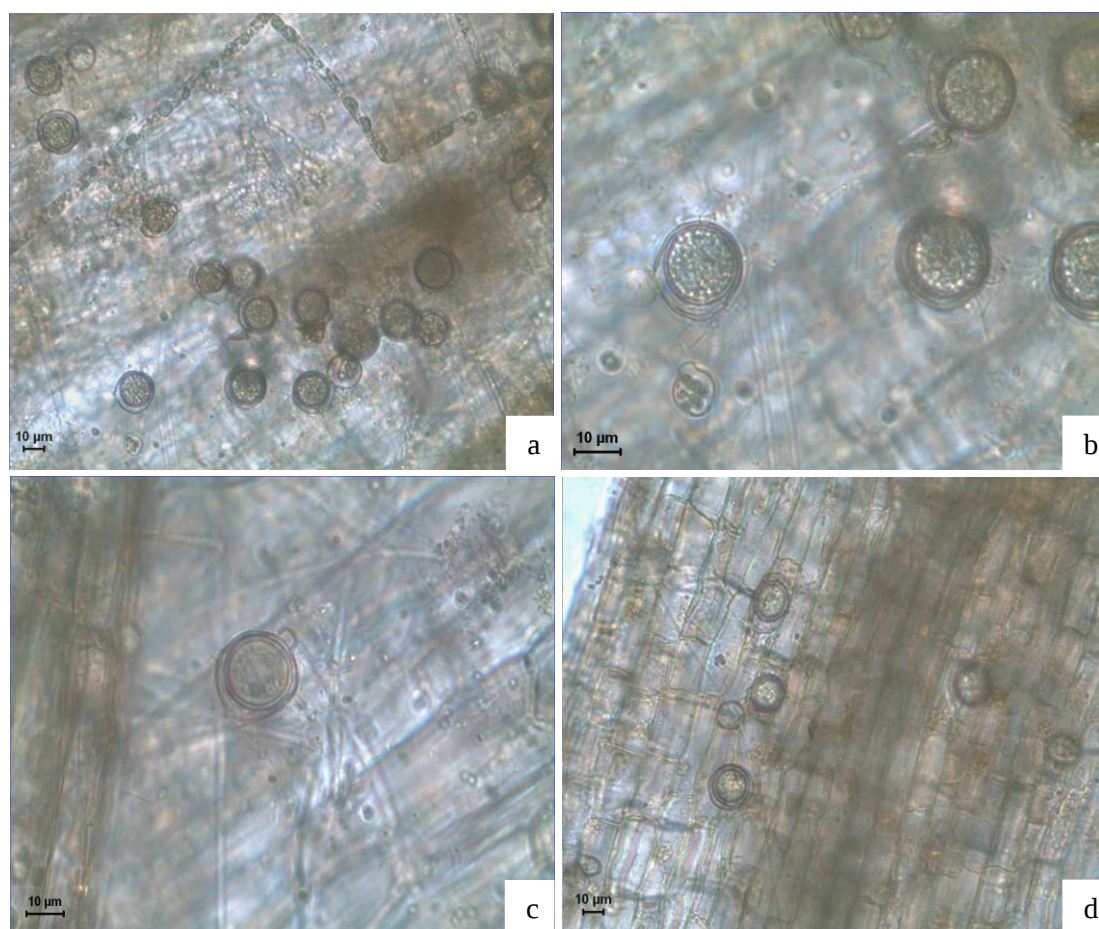


Figura 8. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo* (verão) referente ao tratamento com os produtos e *Pythium aphanidermatum*. a-b. Oogônios na raiz (Elisa) no tratamento com o Trichodel®. c-d. Oogônios na raiz (Elisa) no tratamento com o Biotrich®.

Verificou-se crescimento normal das plantas de alface nos tratamentos sem a aplicação dos produtos e inoculação do patógeno, em ambos os experimentos realizados (figura 9a). Embora não tenha sido mensurada a incidência de luminosidade durante a condução dos experimentos, observou-se baixa luminosidade, principalmente no experimento do verão, resultando em plantas um pouco estioladas.

Avaliando-se as massas fresca e seca da parte aérea e raízes das variedades nos tratamentos controle, verificou-se que em ambos os experimentos, os produtos Biotrich® e Trichodel® nas concentrações estudadas não promoveram o crescimento das variedades, uma vez que não foram obtidas diferenças estatísticas entre os tratamentos com e sem a aplicação dos produtos para estes parâmetros (tabelas 13-20).

Nos experimentos da primavera e verão, não foram observados nas plantas os sintomas característicos da infecção por *Pythium* spp., tais como o escurecimento das raízes resultante de podridão (figuras 9b-d) e o murchamento da parte aérea. Comparando-se os tratamentos contendo somente as plantas e os que foram inoculados com a suspensão de zoósporos na ausência dos produtos, nos dois experimentos conduzidos, diferenças estatísticas não foram obtidas para as massas fresca e seca da parte aérea e raízes das variedades, demonstrando que o isolado de *Pythium aphanidermatum* não interferiu no desenvolvimento das plantas (tabelas 13-20).

No experimento conduzido na primavera, houve redução significativa da massa fresca das raízes de Vera tratadas com o Biotrich® e a suspensão de zoósporos, comparando-se ao tratamento com o patógeno sem a aplicação do produto (tabela 14).

No verão, avaliando-se os tratamentos com o produto Biotrich®, verificou-se que a massa fresca da parte aérea e raízes de Vera no tratamento com o produto e o patógeno foram significativamente menores do que as encontradas no tratamento contendo apenas o patógeno (tabelas 17-18) (figuras 9b-c, 9e). Diferença significativa foi verificada também para a massa fresca das raízes de Elisa, com menor massa encontrada no tratamento com o Biotrich® em associação com *P. aphanidermatum*, quando comparado ao tratamento contendo apenas o produto (tabela 20). Nos tratamentos com o Trichodel®, aumento significativo da massa fresca das raízes de Vera foi obtido no tratamento com o produto e *P. aphanidermatum*, comparando-se com o tratamento em que foi aplicado apenas o produto (tabela 18).



Figura 9. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo*. a. Tratamento controle (primavera). b. Raiz de Vera (verão) do tratamento com *Pythium aphanidermatum*. c. Raiz de Vera (verão) do tratamento com *Pythium aphanidermatum* e Biotrich®. d. Raiz de Vera (verão) do tratamento com *Pythium aphanidermatum* e Trichodel®. e. Plantas de Vera dos tratamentos com *Pythium aphanidermatum* (esquerda) e *Pythium aphanidermatum* e Biotrich® (direita).

Tabela 13. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo* (primavera) com os produtos Biotrich® e Trichodel® referente à massa fresca da parte aérea (MFPA) e à massa seca da parte aérea (MSPA) de Vera*

Produtos (mL/L)	MFPA (g)		MSPA (g)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Produtos	158,84aA	146,84aA	14,22aA	14,12aA
Biotrich (0,2mL/L)	127,95aA	125,57aA	12,96aA	12,89aA
Trichodel (0,25mL/L)	138,54aA	140,56aA	13,57aA	13,59aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 14. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo* (primavera) com os produtos Biotrich® e Trichodel® referente à massa fresca das raízes (MFR) e à massa seca das raízes (MSR) de Vera*

Produtos (mL/L)	MFR (g)		MSR (g)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Produtos	24,96aA	23,50bA	8,33aA	8,07aA
Biotrich (0,2mL/L)	21,27aA	17,66aA	8,07aA	8,11aA
Trichodel (0,25mL/L)	20,97aA	19,77abA	8,15aA	8,11aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 15. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo* (primavera) com os produtos Biotrich® e Trichodel® referente à massa fresca da parte aérea (MFPA) e à massa seca da parte aérea (MSPA) de Elisa*

Produtos (mL/L)	MFPA (g)		MSPA (g)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Produtos	212,58aA	224,57aA	16,29aA	18,09aA
Biotrich (0,2mL/L)	224,06aA	195,43aA	18,15aA	17,33aA
Trichodel (0,25mL/L)	222,34aA	196,04aA	17,60aA	16,54aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 16. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo* (primavera) com os produtos Biotrich® e Trichodel® referente à massa fresca das raízes (MFR) e à massa seca das raízes (MSR) de Elisa*

Produtos (mL/L)	MFR (g)		MSR (g)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Produtos	29,52aA	27,77aA	8,59aA	8,55aA
Biotrich (0,2mL/L)	27,06aA	22,87aA	8,66aA	8,63aA
Trichodel (0,25mL/L)	27,74aA	22,71aA	8,70aA	8,48aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 17. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo* (verão) com os produtos Biotrich® e Trichodel® referente à massa fresca da parte aérea (MFPA) e à massa seca da parte aérea (MSPA) de Vera*

Produtos (mL/L)	MFPA (g)		MSPA (g)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Produtos	182,78aA	168,33bA	13,33aA	15,00aA
Biotrich (0,2mL/L)	145,83aA	126,67aA	15,00aA	13,33aA
Trichodel (0,25mL/L)	160,83aA	159,17abA	15,83aA	15,00aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 18. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo* (verão) com os produtos Biotrich® e Trichodel® referente à massa fresca das raízes (MFR) e à massa seca das raízes (MSR) de Vera*

Produtos (mL/L)	MFR (g)		MSR (g)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Produtos	18,33aA	21,67bA	5,00aA	5,00aA
Biotrich (0,2mL/L)	15,83aA	15,00aA	5,00aA	5,00aA
Trichodel (0,25mL/L)	15,83aA	22,50bB	5,00aA	5,00aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 19. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo* (verão) com os produtos Biotrich® e Trichodel® referente à massa fresca da parte aérea (MFPA) e à massa seca da parte aérea (MSPA) de Elisa*

Produtos (mL/L)	MFPA (g)		MSPA (g)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Produtos	186,91aA	200,00aA	15,91aA	15,83aA
Biotrich (0,2mL/L)	200,83aA	184,17aA	18,33aA	15,83aA
Trichodel (0,25mL/L)	191,67aA	163,33aA	16,67aA	15,00aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

Tabela 20. Teste de patogenicidade e controle biológico *in vivo* (verão) com os produtos Biotrich® e Trichodel® referente à massa fresca das raízes (MFR) e à massa seca das raízes (MSR) de Elisa*

Produtos (mL/L)	MFR (g)		MSR (g)	
	Controle	<i>Pythium</i>	Controle	<i>Pythium</i>
Sem Produtos	24,17aA	25,83aA	5,00aA	5,00aA
Biotrich (0,2mL/L)	30,00aB	20,00aA	5,00aA	5,00aA
Trichodel (0,25mL/L)	22,50aA	24,17aA	5,00aA	5,00aA

*Minúscula comparada na vertical e maiúscula comparada na horizontal para cada um dos parâmetros

Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste de Tukey

5. DISCUSSÃO

O isolado de *Pythium aphanidermatum* utilizado no presente estudo foi patogênico nas variedades de alface nos testes conduzidos *in vitro*, com maior patogenicidade verificada em 31°C, corroborando com os dados existentes em literatura sobre o alto potencial patogênico da espécie em temperaturas mais elevadas (Bates & Stanghellini 1984, Herrero *et al.* 2003, Cipriano *et al.* 2005). Entretanto, em ambos os experimentos conduzidos *in vivo*, *P. aphanidermatum* não causou podridão de raiz nas plantas, nem redução do seu desenvolvimento, podendo esta ausência de patogenicidade estar relacionada à densidade de inóculo empregada nos experimentos. A concentração de zoósporos utilizada no presente estudo (5×10^3 zoósporos/mL em suspensão de 40mL/planta) foi baseada nos trabalhos de

Owen-Going *et al.* (2003) e Baptista (2007). Owen-Going *et al.* (2003) verificaram em pimentão hidropônico (*Capsicum annuum* L.) sintomas como o escurecimento das pontas das raízes, diminuição do comprimento do sistema radicular e quantidade de raízes laterais, e extensa descoloração marrom ou amarelada, com a inoculação de isolados de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. e *Pythium dissotocum* Drechsler. Baptista (2007), em estudo com isolado de *Pythium dissotocum* Drechsler em alface hidropônica (variedades Mimosa e Vera), verificou que a densidade de inóculo de 5×10^3 zoósporos/mL foi mais baixa do que a densidade exigida para causar a morte nas plantas, mas suficiente para o aparecimento dos sintomas (podridão de raiz, redução no número de raízes, murchamento, diminuição da área foliar e redução das massas fresca e seca da parte aérea e raízes). Embora tenha sido utilizado no presente estudo a mesma concentração de zoósporos usada pelos autores citados acima, grande diferença em patogenicidade foi obtida, podendo esta estar relacionada à forte variação no potencial patogênico e virulência encontrada entre espécies e espécimes de *Pythium* (Plaats-Niterink 1981, Owen-Going *et al.* 2003, Baptista 2007, Patekoski & Zottarelli 2009) e à diferença em suscetibilidade observada entre culturas e variedades a estes patógenos (Utkhede *et al.* 2000, Pinto *et al.* 2005b), onde o emprego de diferentes isolados do gênero e culturas vegetais pode levar a resultados divergentes. Provavelmente danos às plantas de alface pudessem ser obtidos e visualizados com a inoculação de maior quantidade de zoósporos do isolado estudado. Menzies *et al.* (1996), em estudo sobre o efeito de diferentes densidades de inóculo de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. sobre o crescimento de pepino (*Cucumis sativus* L.) hidropônico, verificaram que o escurecimento das raízes ocorreu com a aplicação do patógeno em todas as densidades de inóculo estudadas (0,22 a 2×10^6 UFC/100L de solução), porém, em baixos níveis de inóculo (2.2×10^3 , 22, 2.2 e 0,22 UFC/100L de solução) o isolado causou redução no crescimento e produtividade, sem morte das plantas, enquanto que com a maior densidade de inóculo (2×10^6 UFC/100L de solução), todas as plantas morreram entre sete e 28 dias após a inoculação.

Fatores ambientais como a temperatura e a luminosidade também podem ter interferido no potencial patogênico de *Pythium aphanidermatum*. No presente estudo, as temperaturas máximas registradas foram elevadas, porém, as temperaturas mantiveram-se altas apenas em determinados períodos da realização dos experimentos, podendo este fato ter limitado a progressão da doença nas plantas de alface. Cipriano (2009) estudou o efeito de *Pseudomonas* spp. no controle de *Pythium* sp. (*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., dado não publicado) em alface Verônica (crespa) hidropônica, com a inoculação do patógeno feita com micélio e suspensão de zoósporos em concentração não informada. Em três dos quatro experimentos realizados, não foi observado podridão de raiz, nem redução do crescimento das

plantas, comparando-se os tratamentos com e sem a inoculação do patógeno para os parâmetros avaliados (massa seca da parte aérea e raízes). Segundo o autor, a ausência de patogenicidade provavelmente esteve relacionada às baixas temperaturas encontradas na casa de vegetação durante o desenvolvimento dos experimentos (médias de 24, 23, 16 e 24°C) e à inoculação tardia do patógeno, feita aos 44 dias de idade, quando as plantas já não estariam suscetíveis ao mesmo. Corrêa (2006) estudou o efeito dos fungos *Clonostachys rosea* (Preuss) Mussat, *Trichoderma* sp. e *Saccharomyces cerevisiae* Meyen; das bactérias *Bacillus subtilis* (autor) e *Paenibacillus lentimorbus* (autor); e dos produtos Fishfétil®, P.S.B. Solan® e Polyversum® no controle de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. em alface Vera produzida em sistema hidropônico NFT. As plantas inoculadas com suspensão de zoósporos do patógeno na concentração de 1×10^4 zoósporos/mL tiveram seu desenvolvimento comprometido apenas em parte dos experimentos realizados, com redução da massa fresca da parte aérea e massa total das plantas. Segundo a autora, a baixa temperatura da solução nutritiva obtida durante a realização dos experimentos (mínima de 20°C, e máxima de 31°C observada durante curto período de tempo) não favoreceu o progresso da doença. Com relação à luminosidade, como mencionado anteriormente, foi observada baixa luminosidade durante a condução dos dois experimentos, resultando em plantas um pouco estioladas. Owen-Going *et al.* (2003), em estudo sobre o potencial patogênico de isolados de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* em pimentão (*Capsicum annuum* L.) hidropônico, observaram que a intensidade luminosa, juntamente com a temperatura, pode ter influenciado a incidência de descoloração e outros sintomas nas raízes colonizadas com os patógenos, com alta intensidade luminosa favorecendo o progresso da doença e manifestação dos sintomas.

Além dos fatores mencionados, a resistência das plantas de alface provida pelo correto balanço nutricional da solução nutritiva pode ter contribuído para a ausência do estabelecimento e progresso da doença no presente estudo. Segundo Zambolim *et al.* (2001) dentro do triângulo que determina a doença (ambiente-patógeno-hospedeiro), os nutrientes podem afetar direta ou indiretamente o hospedeiro, o patógeno e o meio ambiente, predispondo as plantas ao ataque dos patógenos ou induzindo resistência ou tolerância a planta hospedeira. Durante a execução dos experimentos *in vivo*, atentou-se grandemente para o balanço nutricional da solução nutritiva, com reposição diária da solução evaporada e/ou utilizada pelas plantas e mensuração da condutividade elétrica da mesma três vezes ao dia.

Nos testes de patogenicidade e controle biológico *in vivo*, a presença de *Pythium aphanidermatum* foi detectada em parte dos tratamentos em que este foi inoculado. Baptista (2007), entretanto, em estudo sobre o efeito do produto Biotrich® no controle de *Pythium dissotocum* Drechsler em alface hidropônica (variedades Mimosa e Vera), detectou a presença

do patógeno em todos os tratamentos inoculados, observando-o nos tecidos radiculares das plantas logo após a colheita. Cipriano (2009) avaliou o efeito de *Pseudomonas* spp. no crescimento de alface Verônica e no controle de *Pythium* sp. (*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., dado não publicado) em sistema hidropônico CC (*Container Culture*), onde, de modo semelhante ao aqui observado, foi detectada a presença do patógeno somente em parte dos experimentos realizados. Menzies *et al.* (1996) relatam a dificuldade em detectar a presença de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. em solução hidropônica. Os autores estudaram a influência deste patógeno sobre o crescimento e produtividade de pepino (*Cucumis sativus* L.) hidropônico, observando que sua detecção na solução nutritiva circulante pode ser difícil, mesmo quando a infecção das plantas provê evidências de sua presença, sendo que baixas concentrações do patógeno requerem a amostragem de grande quantidade de solução nutritiva.

De maneira geral, os produtos biológicos estudados não promoveram o crescimento das variedades de alface nos testes *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, tal ação benéfica tem sido verificada por outros autores em estudos com cepas de *Trichoderma* (Lynch *et al.* 1991, Kleifeld & Chet 1992, Yedidia *et al.* 2001, Hoyos-Carvajal *et al.* 2009, Arriagada *et al.* 2009) e com produtos formulados com isolados do gênero. Baptista (2007) verificou que o produto Biotrich® (formulação líquida, suspensão em gel, lote não informado) nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,3mL/L, aumentou o comprimento das radículas das variedades de alface Vera e Mimosa em experimentos conduzidos em laboratório (em 20°C e 27°C), e que a aplicação do produto na concentração de 0,2mL/L resultou em aumento das massas fresca e seca das raízes das variedades em testes com kits hidropônicos caseiros. Junges *et al.* (2007) obteve com a aplicação do produto Trichodel (1mL/100mL de água incorporando 0,5mL no substrato) em formulação líquida, aumento significativo do comprimento da parte aérea de plantas de arroz cultivadas em gerbox com substrato. Assis (2008) verificou que o produto Biotrich® (formulação líquida) na concentração de 0,01mL/5g de sementes aumentou a porcentagem de germinação de plântulas de alface cultivadas em bandejas de isopor sob cultivo protegido.

Em se tratando do controle de *Pythium aphanidermatum*, os testes conduzidos em laboratório no presente estudo mostraram que os produtos Biotrich®, Trichodermil® e Trichodel® foram igualmente efetivos no controle, com maior ação verificada em 31°C, onde os danos ocasionados pelo patógeno foram mais significativos. A eficiência destes produtos no controle de fitopatógenos é também relatada em literatura, porém, os estudos são ainda escassos e em sua maioria foram realizados em campo, com cultivo em solo. Lobo Jr. *et al.* (2005), ao testar o efeito do Trichodermil® (formulação líquida, suspensão oleosa) no controle de *Rhizoctonia solani* Kühn e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc em plantas de feijoeiro

(cultivar pérola) em solo, obtiveram com a aplicação do produto nas dosagens de 800 e 100mL/ha, redução de inóculo de *R. solani* de até 85% e de *F. solani* de até 67%. Tatagiba *et al.* (2005) verificaram que o produto Trichodermil® (formulação pó) controlou em 73% a incidência de podridão ocasionada por *Phytophthora palmivora* Butler, em mudas de mamão produzidas em tubetes com substrato, aplicando-se quatro vezes o produto na concentração de 2g/L de substrato. Lobo Jr. *et al.* (2006) obtiveram com a aplicação do Trichodermil® (formulação líquida, suspensão oleosa), a redução de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (agente causal do mofo branco) em solo, passando de 12,78 escleródios/m² na área testemunha, para 4,56 escleródios/m² na área tratada com o produto. Baptista (2007) verificou que o produto Biotrich® (formulação líquida, suspensão em gel) nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,3mL/L foi eficiente no controle de *Pythium dissotocum* Drechsler nas variedades de alface Mimosa e Vera em testes conduzidos em laboratório (em 20 e 27°C), tendo o mesmo ocorrido em experimento com kits hidropônicos caseiros, com a concentração de 0,2mL/L. Durigon *et al.* (2007), em estudo sobre o efeito do Trichodel® (formulação líquida) na sanidade de sementes de soja crescidas em gerbox em 25°C, observaram que o produto inibiu a incidência de *Fusarium* spp. e *Cladosporium* spp.. Costa *et al.* (2009) estudaram durante dois anos consecutivos o efeito do produto Trichodermil® no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro, verificando que no primeiro ano o produto reduziu significativamente a emissão de apotécios do patógeno. Teixeira *et al.* (2009), em estudo sobre o efeito dos produtos Trichodermil® e Trichodel® no controle de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burkh.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, agente causal de podridão radicular do feijoeiro, verificaram que mesmo com a alta incidência da doença, os biofungicidas reduziram significativamente a severidade da doença em até 55% aos 15 dias após a emergência, e em até 57% aos 25 dias após a emergência.

Nos testes de controle biológico *in vitro*, os produtos nas concentrações testadas foram prejudiciais ao desenvolvimento das plantas em alguns tratamentos controle, com a diminuição do comprimento das radículas, e esta redução ocorreu principalmente com a aplicação do produto Trichodermil®. Igualmente, Lynch *et al.* (1991), ao estudar o efeito de *Trichoderma* spp. na germinação e desenvolvimento de alface cultivada em vasos, obtiveram com a inoculação de determinados isolados, menor taxa de germinação e redução das massas fresca e seca quando comparadas ao tratamento controle. Junges *et al.* (2007), ao estudar a influência de produtos formulados com *Trichoderma* spp. na germinação e vigor de sementes de arroz verificaram que o tratamento com o produto Trichodel® (formulação líquida) prejudicou a germinação das sementes, com diminuição de 44,38% de plântulas germinadas no tratamento controle para 17,31% com a aplicação do produto. Assis (2008), em

experimentos com plântulas de alface, obteve diminuição significativa do comprimento do hypocótilo e comprimento total das plântulas com a aplicação do produto Ecotrich® (produto à base de isolados de *Trichoderma harzianum* Rifai, em formulação líquida) em testes conduzidos em caixas acrílicas (gerbox); e menor massa seca das plântulas com a aplicação do produto Biotrich® (formulação pó), em experimentos realizados em estufa.

Nos experimentos *in vivo*, diferentemente do ocorrido *in vitro*, não foi verificada diminuição do desenvolvimento das plantas nos tratamentos contendo apenas os produtos, porém, verificou-se em alguns casos que a aplicação do Biotrich®, juntamente com *Pythium aphanidermatum* resultou em menor massa fresca da parte aérea e raízes das variedades. Cipriano (2009) verificou que a inoculação conjunta de isolados de *Pseudomonas* e *Pythium* sp. (*Pythium aphanidermatum*, dado não publicado) *in vitro* (28°C ± 2°C), resultou em diminuição significativa do comprimento do hypocótilo de alface Verônica. Em contrapartida, nos tratamentos com o produto Trichodel®, a inoculação do patógeno e do produto resultaram em maior desenvolvimento das raízes de Vera e Elisa, em alguns tratamentos *in vivo* e *in vitro*, comparando-se ao obtido apenas com o produto.

Observando-se os dados mencionados acima, verifica-se pequena relação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*. Em estudos de biocontrole, normalmente os testes *in vitro* são eficientes, pois permitem selecionar isolados com potencial para o controle de patógenos ou promoção de crescimento de plântulas, por meio da avaliação rápida de um grande número de isolados (Sottero 2003, Cipriano 2009), porém, nem sempre há correlação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, o que pode ser facilmente explicado pelo fato de os testes *in vitro* ocorrerem em condições muito diferentes das naturais (Sottero *et al.* 2006). Jackisch-Matsuura & Menezes (1999) verificaram, ao realizar experimentos *in vitro*, com placas de Petri e *in vivo*, em vasos contendo solo, que a ação de isolados de *Trichoderma* no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) variou entre as condições de experimento, com maior controle obtido em laboratório. Cipriano (2009), em estudo sobre a ação de isolados de *Pseudomonas* no controle de *Pythium* sp. (*Pythium aphanidermatum*, dado não publicado) em alface Verônica, verificou que um isolado de *Pseudomonas* foi prejudicial ao desenvolvimento das plântulas nos testes *in vitro* quando inoculado juntamente com o patógeno, sendo entretanto eficiente no controle do patógeno *in vivo*. Além dos fatores bióticos (organismos vivos presentes), fatores abióticos tais como pH, temperatura e umidade podem interferir no desempenho de isolados de *Trichoderma* e na ação de bioprodutos à base destes antagonistas (Melo 1996, Lucon 2009). Assim, ressalta-se que ao estudar o potencial destes agentes de biocontrole, é importante a condução de experimentos não só em laboratório, mas também em campo, como realizado no presente

estudo, obtendo-se desta forma amplo conhecimento sobre o seu espectro de ação. Sobre isto, Paulitz & Bélanger (2001) comentam que a grande dificuldade relacionada ao uso de controle biológico no controle de doenças de plantas é que a maioria dos resultados é obtida em condições de laboratório e pouco se tem estudado em condições de campo.

No presente estudo, o potencial de biocontrole dos produtos Biotrich® e Trichodel® não pôde ser efetivamente analisado nos experimentos *in vivo*, dada a ausência de patogenicidade do isolado de *Pythium aphanidermatum* nestas condições. Todavia, a análise da ação destes produtos no desenvolvimento das plantas *in vivo*, constitui-se de grande importância, uma vez que segundo Freitas *et al.* (2003), a promoção de crescimento é uma característica desejável, que pode resultar em encurtamento do ciclo de cultivo e aumento na produção. Além disso, embora tais produtos sejam indicados para utilização em cultivos hidropônicos, em literatura relata-se apenas o estudo de Baptista (2007), com o produto Biotrich®, o qual obteve, em condições similares às aqui estudadas, resultados diferentes para o crescimento de variedades de alface Vera e Mimosa, o que mostra a relevância deste e a necessidade de outros estudos na área.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os produtos Biotrich®, Trichodel® e Trichodermil® possuem potencial para o controle de *Pythium aphanidermatum* nas variedades de alface Vera e Elisa, mas não atuaram como promotores de crescimento destas variedades. Com relação à ação prejudicial do Trichodermil® no crescimento das plantas, uma vez que bons resultados no controle de patógenos têm sido alcançados com a aplicação do produto em solo e em experimentos em tubetes (Lobo Jr. *et al.* 2005, Tatagiba *et al.* 2005, Lobo Jr. *et al.* 2006, Costa *et al.* 2009, Teixeira *et al.* 2009), salienta-se a importância da realização de outros estudos, onde menores concentrações do produto sejam testadas, a fim de se encontrar as concentrações ideais do produto para os cultivos hidropônicos.

6. CONCLUSÕES

- *Pythium aphanidermatum* foi patogênico nas variedades de alface nos testes *in vitro*, mas não apresentou patogenicidade nos testes *in vivo* na concentração de 5×10^3 zoósporos/mL.
- Nos experimentos *in vitro*, os produtos Biotrich®, Trichodermil® e Trichodel® não promoveram o crescimento das plântulas, mas foram eficientes no controle de *Pythium aphanidermatum*.

- Biotrich® e Trichodel® não atuaram como promotores de crescimento nos testes conduzidos *in vivo*, e devido à ausência de patogenicidade do isolado estudado nesta condição, a atuação destes produtos no controle do patógeno não pôde ser eficientemente analisada.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação com doenças radiculares foi uma das forças motivadoras principais para o desenvolvimento da hidroponia (Stanghellini & Rasmussen 1994), entretanto, os prejuízos causados por espécies do gênero *Pythium* tem levado muitos hidroponicultores a abandonarem a atividade (Baptista 2007), mesmo tendo em vista os benefícios deste meio de produção.

No Brasil, diversos produtos biológicos estão disponíveis para utilização no biocontrole, mas a sua qualidade nem sempre é adequada, o que colabora com as dificuldades de sua adoção em maior escala (Morandi & Bettiol 2009). Neste contexto, o controle de qualidade destes produtos feito pela ABCBio – Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (Pomella & Ribeiro 2009) e os trabalhos técnico-científicos desenvolvidos com os mesmos, constituem-se de grande importância para a validação de sua eficiência e possível aplicação prática pelos agricultores. Em se tratando de produtos à base de *Trichoderma* spp., embora produtos como o Biotrich®, Trichodermil® e o Trichodel® sejam citados em literatura com bons resultados no controle de patógenos em solo e em experimentos em tubetes e gerbox (Lobo Jr. *et al.*, Tatagiba *et al.* 2005, Lobo Jr. *et al.* 2006, Durigon *et al.* 2007, Costa *et al.* 2009, Teixeira *et al.* 2009), sua indicação e aplicação em sistemas hidropônicos deve ser feita mediante estudos consistentes que indiquem sua validade também nestes sistemas, onde a forma de cultivo difere em muito das citadas em literatura.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os produtos testados possuem potencial para o controle de *Pythium aphanidermatum*, e podem nortear trabalhos futuros que tenham por objetivo verificar a eficiência dos mesmos no controle deste patógeno. Os resultados apontam também para a necessidade de estudos sobre doses dos produtos que sejam eficientes para o controle de *Pythium* spp., sem prejudicar o desenvolvimento das plantas. Corrêa (2006), em estudo com *Trichoderma* sp. para o controle de *Pythium aphanidermatum* em hidroponia, comenta que doses elevadas do antagonista podem

prejudicar o desenvolvimento da planta, podendo agravar ainda mais a situação de produtores que buscam por um controle para epidemias radiculares. A concentração de conídios de *Trichoderma* spp. presente nos produtos deve também ser monitorada por órgão competente (ABCBio), como tem sido feito, para que independente do lote utilizado, os resultados obtidos em projetos de pesquisa sejam encontrados também pelos hidroponicultores, evitando custos desnecessários e/ou prejuízos à produção. Para Silva & Melo (2007), as condições de transporte e armazenamento, bem como a existência de registro devem também ser controladas para que o produtor não se decepcione com o produto.

Segundo Sutton *et al.* (2006), o conhecimento da etiologia e epidemiologia de podridão radicular ocasionada por *Pythium*, e seus efeitos na fisiologia das plantas são essenciais para novas perspectivas das pesquisas e para o desenvolvimento de melhores práticas para o manejo da doença em cultivos hidropônicos. Os resultados obtidos no presente estudo com relação à patogenicidade de *Pythium aphanidermatum in vivo* contribuem para o conhecimento do comportamento desta espécie, onde provavelmente isolados distintos desta mesma espécie necessitam de diferentes densidades de inóculo para ocasionar danos às plantas, devendo isto ser considerado em outros estudos com a espécie. Desta forma, a condução de pré-experimentos para estabelecimento da concentração de zoósporos suficiente para ocasionar sintomas na planta estudada, pode ser uma alternativa a ser empregada para otimizar as análises referentes à sua patogenicidade e controle. Além do conhecimento do patógeno, Morandi & Bettiol (2009), ao falar sobre o controle biológico de doenças de plantas no Brasil, ressaltam que entre as ações de pesquisa necessárias estão o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos nas interações entre os agentes de biocontrole, os patógenos, as plantas e o ambiente.

Durante a etapa dos experimentos *in vitro*, observamos a perda do potencial patogênico do espécime de *Pythium aphanidermatum*, devido aos sucessivos repiques feitos para purificar e manter viável o isolado. Verificou-se entretanto, que o cultivo do espécime em meios de cultura que contém grande quantidade de nutrientes, como o meio de pepino (200g de pepino, 15g de Agar, 1L de água destilada, com pH corrigido para 6,2 com CaCO_3) e o meio V8 (100mL de V8 acrescido de 2g de CaCO_3 e 900mL de água destilada), foi eficiente para recuperação de sua patogenicidade, sendo estes meios recomendados para este propósito em outros estudos.

Gleason *et al.* (2009) citam alguns estudos que mostram que os zoósporos possuem grande quantidade de glicogênio e lipídios, os quais provém energia para o movimento dos flagelos durante o período móvel. A partir disso, os zoósporos estão provavelmente envolvidos em muitas cadeias alimentares, como valiosa fonte de alimento em ecossistemas

aquáticos, podendo ser consumidos por protozoários micófagos. A presença em grande quantidade de nematóides, rotíferos e protozoários nas amostras de raiz dos experimentos *in vivo* é um fato interessante, sendo que os mesmos podem ter contribuído para a redução de zoósporos de *Pythium aphanidermatum* presente na solução nutritiva.

Ao abordar o manejo de doenças de plantas em cultivo protegido, Vida *et al.* (2004) comentam que a estratégia principal do fitopatologista deve ser a combinação de princípios de controle visando reduzir ou eliminar o inóculo inicial e reduzir a taxa de progresso da doença. Assim, ressalta-se que a busca por controle de *Pythium* spp. em sistemas hidropônicos deve estar atrelada à prevenção da entrada do patógeno nestes sistemas, onde medidas como a limpeza do sistema entre os ciclos de cultivo, o controle da água utilizada no preparo da solução nutritiva e o descarte de plantas doentes logo após o surgimento da doença, devem ser adotados de maneira efetiva pelos hidroponicultores. Acredita-se que, em muitos casos, a contaminação do sistema hidropônico por *Pythium* spp. ocorra por meio de água proveniente de poços artesianos. Grande parte dos hidroponicultores faz uso de água desta fonte para a sua produção, e ao analisarmos amostras de água de produtores com problemas ocasionados por *Pythium* spp., temos verificado nestas amostras a presença não só de isolados de *Pythium*, mas também de outros gêneros de organismos zoospóricos, tais como *Achlya* C. G. Nees, *Saprolegnia* (C. G. Nees) e *Dictyuchus* Leitgeb, o que demonstra que maior atenção deve ser dada a este fator, para que a proteção das culturas hidropônicas seja assegurada.

8. LITERATURA CITADA

- Abrantes, J.** 2004. A interdisciplinaridade no Ensino Médio: A contextualização pela hidroponia. *Augustus* 9(18): 16–31.
- Ahmed, A.S., Sánchez, C.P. & Candela, M.E.** 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 106: 817–824.
- Andriolo, J.L., Luz, G.L., Giraldi, C., Godoi, R. S. & Barros, G.T.** 2004. Cultivo hidropônico da alface empregando substratos: uma alternativa a NFT? *Horticultura Brasileira* 22(4): 94–798.
- Arriagada, C., Sampedro, I., Garcia-Romera, I & Ocampo, J.** 2009. Improvement of growth of *Eucalyptus globulus* and soil biological parameters by amendment with

- sewage sludge and inoculation with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. *Science of The Total Environment* 407(17): 4799–4806.
- Assis, E.G.** 2008. Avaliação dos efeitos do tratamento de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) com *Trichoderma* spp. na germinação e no desenvolvimento das plântulas. Monografia de Graduação, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- Baptista, F.R.** 2007. *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em alface (*Lactuca sativa* L.): avaliação patogênica e controle biológico. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Bates, M.L. & Stanghellini, M.E.** 1984. Root rot of hydroponically grown spinach caused by *Pythium aphanidermatum* and *P. dissotocum*. *Plant Disease* 68: 989–991.
- Beninni, E.R.Y., Takahashi, H.W. & Neves, C.S.V.J.** 2005. Concentração e acúmulo de macronutrientes em alface cultivada em sistemas hidropônico e convencional. *Semina* 26(3): 273–282.
- Benítez, T., Rincón, A.M. & Limón, M.C.** 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7(4): 249–260.
- Bezerra Neto, F., Rocha, R.H.C., Rocha, R.C.C., Negreiros, M.Z., Leitão, M.M.V.B.R., Nunes, G.H.S., Sobrinho, J.E. & Queiroga, R.C.F.** 2005. Sombreamento para produção de mudas de alface em alta temperatura e ampla luminosidade. *Horticultura Brasileira* 23(1): 133–137.
- Biovale.** 2010. Biotrich. <http://www.biovale.com.br> (acesso em 25.03.2010).
- Bliska Jr., A.** 2008. Sistemas de cultivo hidropônico: muitas opções eficientes. *Plasticultura* 1(4): 8–11.
- Calvo-Bado, L.A, Petch, G., Parsons, N.R., Morgan, J.A. W., Pettit, T.R. & Whipps, J.M.** 2006. Microbial community responses associated with the development of oomycete plant pathogens on tomato roots in soilless growing systems. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1194–1207.
- Carvalho, Y. & Milanez, A.I.** 1989. Efeitos da temperatura e umidade do solo sobre *Pythium splendens*. *Revista de Microbiologia* 20: 477–482.
- Chellemi, D.O., Mitchell, D.J., Kannwischer-Mitchell, M.E., Rayside, P.A. & Roskopf, E.N.** 2000. *Pythium* spp. Associated with bell pepper production Florida. *Plant Disease* 84(12): 1271–1274.
- Cipriano, M.A.P.** 2009. Potencial de *Pseudomonas* spp. na promoção de crescimento e no controle de *Pythium* em alface cultivada em sistema hidropônico. Dissertação de Mestrado, Instituto Agronômico, Campinas.

- Cipriano, M.A.P., Santos, A.S., Patricio, 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. Arquivos do Instituto Biológico 72 (supl.): 1–63.
- 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 Instituto Biológico 69: 158–191.
- Corrêa, E. B.** 2006. Controle de podridão de raiz (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento em alface hidropônica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Costa, L.B., Morandi, M.A.B. & Santos, E.R.** 2009. Redução do inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma asperellum* e *Clonostachys rosea* em feijão de inverno nas safras 2007 e 2008. Tropical Plant Pathology 34 (supl.): 70.
- Douglas, J.S.** 1987. Hidroponia: Cultura sem terra. Nobel, São Paulo. <http://www.books.google.com> (acesso em 09.09.2009).
- Durigon, M.R., Manzoni, C.G., Junges, E., Brand, S.C., Oliveira, R.A., Milanesi, P., Blume, E., Muniz, M.F.B. & Deuner, C.** 2007. Sanidade de sementes de soja tratadas com bioprotetores e fungicida. Anais da 35ª Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul, Santa Maria, p. 179.
- Empresa Caxiense de Controle Biológico.** 2010. Trichodel hidroponia. <http://www.eccb.com.br> (acesso em 25.03.2010).
- Figueiredo, M.B.** 1967. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. O Biológico 33: 9-13.
- Fortnum, B.A., Rideout, J., Martin, S.B. & Gooden, D.** 2000. Nutrient solution temperature affects *Pythium* root rot of tobacco in greenhouse float systems. Plant Disease 84(3): 289–294.
- Freitas, S.S., Mello, A.M.T. & Donzeli, V.P.** 2003. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. Revista Brasileira de Ciência do Solo 27: 61–70.
- Furlani, P.R.** 1994. Cultivo de Alface pela Técnica de hidroponia NFT. Instituto Agrônomo, Campinas.
- Furlani, P.R.** 1996. Hidroponia. Boletim Técnico 100, Instituto Agrônomo, Campinas.
- Furlani, P.R.** 1999. Hydroponic vegetable production in Brazil. Acta Horticulturae 481: 777–778.
- Furlani, P.R. & Fernandes, F.** 2008. Produção de morango usando a técnica da hidroponia vertical. <http://www.infobibos.com> (acesso em 02.06.2009).

- Furlani, P.R., Silveira, L.C.P., Bolonhezi, D. & Faquin, V.** 1999. Cultivo hidropônico de plantas. Instituto Agronômico, Campinas.
- Furlani, P.R., Silveira, L.C.P., Bolonhezi, D. & Faquin, V.** 2009a. Cultivo hidropônico de plantas: Parte 1 - Conjunto hidráulico. <http://www.infobibos.com> (acesso em 09.09.2009).
- Furlani, P.R., Silveira, L.C.P., Bolonhezi, D. & Faquin, V.** 2009b. Cultivo hidropônico de plantas: Parte 2 – Solução nutritiva. <http://www.infobibos.com> (acesso em 23.12.2009).
- Gaag, D.J. & Wever, G.** 2005. Conduciveness of different soilless growing media to *Pythium* root and crown rot of cucumber under near-commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology* 112: 31–41.
- Gleason, F.H., Kagami, M., Marano, A.V. & Simi-Ngando, T.** 2009. Fungal zoospores are valuable food resources in aquatic ecosystems. *Mycologia* (supplement) 60(5): 1–3.
- Goldberg, N.P. & Stanghellini, M.E.** 1990. Ingestion-egestion and aerial transmission of *Pythium aphanidermatum* by shore flies (Ephydrinae: *Scatella stagnalis*). *Phytopathology* 80(11): 1244–1246.
- Gravel, V., Martinez, C., Antoun, H. & Tweddell, R.J.** 2005. Antagonist microorganisms with ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool. *Biocontrol* 50: 771–786.
- Grigoletti Jr, A., Santos, A. F. & Auer, C.G.** 2000. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Floresta* 30: 155–165.
- Gull, C., Labuschagne, N. & Botha, W.J.** 2004. *Pythium* species associated with wilt and root of hydroponically grown crops in South Africa. *African Plant Protection* 10(2): 109–116.
- Hadar, Y., Harman, G.E. & Taylor, A.G.** 1984. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. *Disease Control and Pest Management* 74(1): 106–110.
- 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.** 2010. Que é hidroponia. <http://www.hidrogood.com.br> (acesso em 19.03.2010).
- Hoitink, H.A.J., Madden, L.V. & Dorrance, A.E.** 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology* 96(2): 186–189.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. & Bisset, J.** 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control* 51(3): 409–416.

- Hydor.** 2010. Sistemas hidropônicos. <http://www.hydor.eng.br> (acesso em 19.03.2010).
- Itaforte BioProdutos.** 2010. Trichodermil. <http://www.itafortebioprodutos.com.br> (acesso em 25.03.2010).
- Jackisch-Matsuura, A.B & Menezes, M.** 1999. Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo. Summa Phytopathologica 25: 161–164.
- Jenkins, S.F. & Averre, C.W.** 1983. Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in North Carolina greenhouses. Plant Disease 67(9): 968–970.
- Jones Jr, J.B.** 2005. Hydroponics: a practical guide for the soilless grower. 2 ed., CR Press, Florida.
- Junges, E., Milanesi, P.M., Durigon, M.R., Brand, S.C., Manzoni, C.G., Blume, E. & Muniz, M.F.B.** 2007. Germinação e vigor de sementes de arroz semeadas em substrato tratado com o bioprotetor *Trichoderma* spp. em formulação líquida ou pó. Revista Brasileira de Agroecologia 1(1): 1131–1134.
- Khan, J., Ooka, J.J., Miller, S.A., Madden, L.V. & Hoitink, H.A.J.** 2004. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against Phytophthora crown rot and leaf blight. Plant Disease 88(3): 280–286.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A.** 2008. Dictionary of the Fungi. CABI Europe, Wallingford.
- Kleifeld, O. & Chet, I.** 1992. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. Plant and Soil 144: 267–272.
- Krugner, T.L. & Bacchi, L.M.A.** 1995. Fungos. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorim, L (eds.). Manual de fitopatologia. Ceres, São Paulo.
- Labhidro.** 2010. Hidroponia. <http://www.labhidro.cca.ufsc.br> (acesso em 19.03.2010).
- Lacerda, Q.C.Z.C.** 2009. Hidroponia, cultivo sem solo. <http://www.hannabrasil.com> (acesso em 22.12.2009).
- Lobo Jr., M., Pimenta, G. & Ballarotti, A.A.** 2005. Controle biológico de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* em campo, com *Trichoderma harzianum*. Fitopatologia Brasileira 30 (supl.): 91.
- Lobo Jr., M., Pimenta, G. & Gontijo, G.H.** 2006. Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma harzianum* em condições de campo. Fitopatologia Brasileira 31(supl.): 362.
- Lopes, C.A.** 2003. Manejo integrado de doenças em cultivos hidropônicos. Fitopatologia Brasileira 28(supl.): 195-197.

- Lopes, M.C., Freier, M., Matte, J.C., Gärtner, M., Franzener, G., Nogarolli, E.L. & Sevigani, A.** 2003. Acúmulo de nutrientes por cultivares de alface em cultivo hidropônico no inverno. *Horticultura Brasileira* 21(2): 211–215.
- Lopes, C.A., Carrijo, O.A. & Makishima, N.** 2005. Contaminação com patógenos em sistemas hidropônicos: como aparecem e como evitar. Comunicado Técnico 31. Embrapa Hortaliças, Brasília.
- Lopes, R.B.** 2009. A indústria no controle biológico: Produção e comercialização de microrganismos no Brasil. *In*: Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Lozano, M.G. & Caldevilla, E.M.** 2007. Cultivo sin suelo: hortalizas em clima mediterrâneo. <http://www.horticom.com> (acesso em 22.10.2007).
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. & Jansson, J.K.** 2004. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5): 3073–3081.
- Lucon, C.M.M.** 2009. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. <http://www.infobibos.com>. (acesso em 18.03.2010).
- Lynch, J.M., Wilson, K.L., Ousley, M.A. & Whipps, J.M.** 1991. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Letters in Applied Microbiology* 12: 59–61.
- Magalhães, M., Cipriano, M., Pinto, Z.V., Macedo, B.B.A., Santos, A.S. & Patrício, F.R.A.** 2005. Controle biológico de *Pythium aphanidermatum* com *Trichoderma* sp. em mudas de alface, repolho e pepino. *Summa Phytopathologica* 31(supl): 95.
- Martin, F.N. & Loper, J.E.** 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* sp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18(2): 111–181.
- Martins-Corder, M.P. & Melo, I.S.** 1998. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. *Scientia. Agricola* 55(1): 1–7.
- Mathias, M.C.** 2008. Plantar sem solo, uma opção cada vez mais viável. *Plasticultura* 1(4): 7.
- 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: 50–54.

- 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.
- Morandi, M.A.B. & Bettiol, W.** 2009. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Nascimento, W.M. & Cantliffe, D.J.** 2002. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. Horticultura Brasileira 20: 103–106.
- Nakagawa, J.** 1994. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: Vieira, R.D. & Carvalho, N.M. Testes de vigor em sementes. FUNEP, Jaboticabal.
- Ohse, S., Dourado-Neto, D., Manfron, P.A. & Santos, O.S.** 2001. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. Scientia Agrícola 58(1): 181–185.
- Ornelas, L.H.** 2007. Técnica Dietética: Seleção e preparo de alimentos. Atheneu Editora São Paulo, São Paulo.
- Owen-Going, N., Sutton, J.C. & Grodzinsk, B.** 2003. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. Canadian Journal of Plant Pathology 25: 155–167.
- Patekoski, K.S. & Zottarelli, C.L.A.P.** 2009. Patogenicidade *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.). Hoehnea 36(1): 161–172.
- Patricio, F.R.A.; Kimati, H. & Barros, B.C.** 2001. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. Grupo Paulista de Fitopatologia 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 and Soil 121: 243–250.
- Paulitz, T.C. & Bélanger, R.R.** 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 39: 103–133.
- Pinto, Z. V., Cipriano, M., Macedo, B. B. A., Patrício, F. R. A. & Santos, A. S.** 2005a. Controle de *Rhizoctonia solani* AG-1-I e *Pythium aphanidermatum* com isolados de *Trichoderma* spp. Summa Phytopathologica 31 (supl): 95.
- Pinto, Z.V.; Sousa, A.L.O.P.; Silva, C.P.; Duarte, D.G.; Patrício, F.R.A.; Santos, A.S. & Teixeira-Yañez, L.D.T.** 2005b. 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., Santos, A.S., Milanez, A.I. & Cipriano, M.A.P.** 2009. Ocorrência de *Pythiella vernalis* em *Pythium aphanidermatum* de cultura hidropônica de agrião no Brasil. *Summa Phytopathologica* 35 (4): 325–326.
- Plaats-Niterink, A.j. van der.** 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* 21: 1–242.
- Pomella, A.W.V. & Ribeiro, R.T.S.** 2009. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas: uma visão empresarial. In: Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (eds.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Portal Hidroponia.** 2010. Sobre Hidroponia. <http://www.portalhidroponia.com.br> (acesso em 19.03.2010).
- 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.
- Reino, J.L, Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R. & Collado, I.G.** 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7: 89–123.
- Resh, H.M.** 1998. *Hydroponics: Questions & Answers for successful growing*. Newconcept Press, New Jersey. <http://www.books.google.com> (acesso em 22.12.2009).
- Resh, H.M.** 2001. *Hydroponic food production*. 6th ed. Newconcept Press, New Jersey. <http://www.books.google.com> (acesso em 05.06.2009).
- Revista da Terra.** 2009. Hidroponia. <http://www.revistadaterra.com.br> (acesso em 10.09.2009).
- Rodrigues, L.R.F.** 2002. *Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em ambiente protegido*. FUNEP: Jaboticabal.
- Santos, A.N.F.** 2006. *A tecnologia hidropônica como prática pedagógica na construção de concepções de ambiente*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Schwarz, D & Grosch, R.** 2003. Influence of nutrient solution concentration and a root pathogen (*Pythium aphanidermatum*) on tomato root growth and morphology. *Scientia Horticulturae* 97(2): 95–192.
- Silva, E.T. & Schwonka, F.** 2001. Viabilidade econômica para a produção de alface no sistema hidropônico em Colombo, região metropolitana de Curitiba, PR. *Scientia Agrícola* 2: 111–116.
- Silva, M.S.C. & Lima Neto, V.C.** 2007. Doenças em cultivos hidropônicos de alface na região metropolitana de Curitiba/PR. *Scientia Agraria* 8(3): 275–283.

- Silva, J.B.T. & Melo, S.C.M.** 2007. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos. Documentos Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.
- Silva, J.O., Souza, P.A., Junior, J.G., Pereira, P.R.G. & Rocha, F.A.** 2005. Crescimento e composição mineral de da alface no sistema hidropônico por capilaridade. *Irriga* 10(2): 146–154.
- Sivan, A., Elad, Y. & Chet, I.** 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzanium* on *Pythium aphanidermatum*. *Disease Control and Pest Management* 74(4): 498–501.
- Slininger, P.J., Behle, R.W., Jackson, M.A. & Schiler, D.A.** 2003. Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotropical Entomology* 32(2): 183–195.
- Sottero, A.N.** 2003. Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias. Dissertação de Mestrado, Instituto Agronômico, Campinas.
- Sottero, A.N., Freitas, S.S., Melo, A.M.T. & Trani, P.E.** 2006. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30: 225–234.
- Souza, 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. & Kim, D.H.** 1998. First report of root rot of hydroponically grown lettuce caused by *Pythium myriotylum* in a commercial production facility. *Phytopathology* 74: 796.
- Stanghellini, M.E. & Kronland, W.C.** 1986. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinal infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. *Plant Disease* 70: 1053–1056.
- Stanghellini, M.E. & Rasmussen, S.L.** 1994. Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease* 78(12): 1129–1137.
- Stirling, G.R. Eden, L.M. & Ashley, M.G.** 2004. Sudden wilt of capsicum in tropical and subtropical Australia: a severe form of *Pythium* root rot exacerbated by high soil temperatures. *Australasian Plant Pathology* 33(3): 357–366.
- Sutton, J.C., Sopher, C.R., Owen-Going, T.N., Liu, W., Grodzinsk, 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.

- Tatagiba, J.S., Oliveira, K.V. & Aguilar, M.A.** 2005. Avaliação da eficiência do trichodermil PM no controle da podridão de *Phytophthora* na cultura do mamão. Fitopatologia Brasileira 30 (supl.): 79.
- Teixeira, H, Paula Júnior, T.J., Vieira, R.F., Prado, A.L., Lehner, M.S., Lima, R.C., Santos, J., Ferro, C.G. & Santos, P.H.** 2009. Eficiência de produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. no controle da podridão-radicular do feijoeiro. Tropical Plant Pathology 34 (supl.): 73.
- Teixeira, L.D.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. Summa Phytopathologica 32: 221–226.
- Teixeira-Yañez, L.D.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, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, Piracicaba.
- Triki, M.A., Sylvie Priou, Mahjoub, M. El. & Baudry, A.** 2001. Leak syndrome of potato in Tunisia caused by *Pythium aphanidermatum* e *Pythium ultimum*. Potato Research 44: 221–231.
- 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., Tessmann, D. J., Brandão Filho, J. U. T., Verzignassi, J. R. & Caixeta, M. P.** 2004. Manejo de Doenças de Plantas em Cultivo Protegido. Fitopatologia Brasileira 29(4): 355–372.
- Vital, W.M., Teixeira, N.T., Shigiara, R., Ferraro, A.E., Damaglio, E.L. & Alvero, P.** 2002. Comportamento de variedades de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivadas em hidroponia com diferentes soluções nutritivas. Revista Ecosistema 27(1): 59–62.
- Zambolim, L., Costa, H., Vale, F.X.R.** 2001. Efeito da nutrição mineral sobre doenças de plantas causadas por patógenos de solo. In: Zambolim, L. (ed.). Manejo integrado fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Watanabe, S. Kumakura, K., Izawa, N., Nagayama, K., Mitachi, T., Kanamori, M., Teraoka, T. & Arie, T.** 2007. Mode of action of *Trichoderma asperellum* SKT-1, a

biocontrol agent against *Gibberella fujikuroi*. Journal of Pesticide Science 32(3): 222–228.

Wolffhechel, H. & Jensen, D.F. 1992. Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* for the biological control of post-emergence damping-off and root rot of cucumbers caused by *Pythium ultimum*. Journal of Phytopathology 136: 221–230.

Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y. & Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil 235: 235–242.