

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Tratamento de Sementes de Tomate Associado à
Microbiolização com *Trichoderma* spp.**

Mariluci Sudo Martelleto

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATE ASSOCIADO À
MICROBIOLIZAÇÃO COM *Trichoderma* spp.**

MARILUCI SUDO-MARTELLETO

Sob a Orientação da Professora
Margarida Goréte Ferreira do Carmo
Co-orientação do Professor
Aldir de Oliveira de Carvalho

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências no Curso de Pós-Graduação
em Fitotecnia, Área de Concentração
em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Abril de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

MARILUCI SUDO MARTELLETO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal.

TESE APROVADA EM 28/04/2009

Margarida Goréte Ferreira do Carmo. Dr^a./UFRRJ
(Orientadora)

Maria do Carmo de Araújo Fernandes Dr^a / PESAGRO_RIO

Everaldo Zonta Dr./UFRRJ

Sivaldo Felipe da Silveira Dr. / UENF

Raul de Lucena Duarte Ribeiro PhD / UFRRJ

DEDICATÓRIA

À Deus.

Ao meu pai Shinobu Sudo.

A Luiz Aurélio Peres Martelleto, meu marido.

Às minhas queridas filhas, Bárbara Thie e Gabriela Kimi.

Com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Luiz Aurélio Peres Martelleto, querido esposo, e minhas queridas filhas, Bárbara e Gabriela, companheiras para toda hora.

À muito estimada professora Dr^a Margarida Goréte Ferreira do Carmo.

Ao Curso de Pós-graduação em Fitotecnia e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de aperfeiçoamento e troca de experiências.

A PESAGRO-RIO, na pessoa das pesquisadoras Dr^a Maria Luiza de Araújo e Dr^a Maria do Carmo de Araújo Fernandes, e do pesquisador Dr. Luiz Aurélio Peres Martelleto, que possibilitaram o uso das instalações da Estação Experimental de Seropédica, fornecimento de sementes orgânicas e troca de conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa concedida.

À minha mãe Judico Hamada Sudo, meus irmãos, irmãs, sobrinhos e cunhados.

Ao professor Dr. Aldir de Oliveira de Carvalho.

Ao professor Dr. Silvaldo Felipe da Silveira.

Ao professor Dr. Antônio Carlos de Souza Abboud.

À estagiárias Jéssica Christiny C. Martins, aluna do curso de graduação em Agronomia, de importante auxílio nas atividades.

À empresa de sementes Agristar, na pessoa da eng^a agrônoma Maria Carolina, pelo fornecimento de sementes de tomate utilizadas nos experimentos.

Aos funcionários do setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia.

Ao Departamento de Solos, na pessoa dos professores Eduardo Lima e Everaldo Zonta, que possibilitaram algumas análises de solo e de material de pesquisa em seus laboratórios.

Às funcionárias da secretaria de Pós-graduação do CPGF.

Ao Dr. Tetsuo Inada, pela acupuntura.

Para condução dos experimentos, uma grande quantidade de sementes foi necessária, foi importante uma boa programação para que não faltassem. Não tive dificuldades maiores para obtê-las graças à boa vontade de profissionais que doaram as sementes em grandes quantidades. As sementes não poderiam ter sido submetidas a qualquer tratamento fungicida, justificando porque não foram utilizadas sementes de híbridos de tomateiro, que são caras, ou de outras culturas mais propensas ao tombamento, como a beterraba ou alface. A disponibilidade de sementes foi fator principal para determinar a cultura escolhida e as cultivares que foram usadas nos experimentos. As sementes tinham de ser doadas, pois sem receber nenhum tratamento de proteção não podiam ser vendidas ou compradas, em função de legislação a respeito.

Milhares de avaliações foram feitas do início até os resultados finais desta tese, e apesar do sofrimento físico de tantas avaliações, principalmente nos dois últimos anos, foi uma grande satisfação tê-lo feito, a realização de um sonho que era distante e que consegui terminar. Penso que meu pai está muito feliz com o que fiz, porque foi a superação de muitas limitações. Obrigada a todos que participaram deste meu momento de vida, e principalmente, agradeço àqueles que me deram esta oportunidade.

BIOGRAFIA

Mariluci Sudo Martelleto, nascida no Rio de Janeiro, filha de Shinobu Sudo, engenheiro agrônomo formado pela antiga Escola Nacional de Agronomia, hoje UFRuralRJ, e de Judico Hamada Sudo, mãe dedicada. Neta de agricultores da região metropolitana de Santa Cruz, RJ, por parte de pai e de agricultores de Paraná, por parte de mãe, que emigraram do Japão para o Brasil, na década de 30.

Graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em setembro de 1993. Cas-se com Luiz A. P. Martelleto, com quem teve duas filhas, Bárbara Thie e Gabriela Kimi.

Após a graduação, trabalhou na produção de crisântemo e gipsofila em estufas, auxiliando também na comercialização no CEAGESP e Campinas; trabalhou como bolsista da FAPERJ na Estação Experimental de Macaé da PESAGRO_RIO, com as culturas de abacaxi e posteriormente, com fruta-de-conde e atemóia, acompanhando também as culturas que havia na Estação, como manga, coco, graviola, silvestres e exóticas, banana, mamão, maracujá, entre outras. Auxiliou e participou com a família, de atividades de produção de agentes de biocontrole, em laboratório montado por seu pai.

Em 2003, iniciou o Mestrado no Curso de Pós-Graduação da Fitotecnia, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como bolsista da CAPES, sob orientação da professora doutora Margarida Goréte Ferreira do Carmo, defendendo em 2005. Na linha de pesquisa, trabalhou com tratamento de sementes e mudas de tomateiro, com controle biológico de fitopatógenos utilizando *Trichoderma* e *Gliocladium*.

Em 2005, iniciou o doutorado, como bolsista CNPq, continuando na mesma linha de pesquisa e orientação.

RESUMO GERAL

SUDO-MARTELLETO, Mariluci. **Tratamento de sementes de tomate associado à microbiolização com *Trichoderma* spp.** 2009. 121p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório e Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ e na PESAGRO-RIO/ Estação Experimental de Seropédica com o objetivo de selecionar isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *Rhizoctonia in vitro*; quantificar o efeito da aplicação de *Trichoderma* spp. na proteção de sementes e plântulas de tomate contra o ataque de *Rhizoctonia* spp; .avaliar o efeito da aplicação de *Trichoderma* spp. na emergência e qualidade das mudas de tomate desenvolvidas na presença do patógeno; determinar os teores de macronutrientes das mudas formadas em substrato inoculados com isolados de *Trichoderma* spp. e *Rhizoctonia*; estudar o efeito da associação de tratamentos térmicos e químico com a microbiolização das sementes com isolados previamente selecionados de *Trichoderma* spp. e avaliar a sobrevivência de isolados de *Trichoderma* spp. na espermosfera e rizosfera das mudas. Utilizaram-se isolados de *Trichoderma* spp. previamente selecionados e sementes das cultivares Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho sem tratamento prévio com fungicida. Três dos isolados testados apresentaram antagonismo *in vitro* e supressão do crescimento das colônias de *Rhizoctonia* spp. Nos ensaios de controle biológico sob condições de casa-de-vegetação, foram observados efeitos dos tratamentos na emergência, comprimento e massa seca de parte aérea e raízes, área radicular das mudas, nos teores e conteúdos de N, P e K e fácil recuperação dos isolados de *Trichoderma* spp. a partir das sementes e raízes das mudas. Na associação de tratamentos térmico e químico das sementes com isolados de *Trichoderma* spp. houve efeito significativo dos tratamentos sobre a emergência e desenvolvimento das mudas. O tratamento das sementes via calor seco a 70°C/ 96 hs resultou em baixa germinação de sementes tanto, em gerbox quanto em substrato, enquanto os tratamentos com água aquecida a 50° C por 30 min e com HCl a 5% por 10 min foram os que menos danos causaram às sementes. O tratamento de sementes com água quente associado aos isolados TENA7 ou TENA16 como protetores biológicos resultaram em boa emergência e desenvolvimento das plântulas e mudas, assim como a associação entre tratamento com HCl a 5% por 10 min seguido da aplicação do isolado TENA7 de *Trichoderma*.

Palavras-chave: proteção de sementes, patologia de sementes, fungos de solo

GENERAL ABSTRACTS

SUDO-MARTELLETO, Mariluci. **Treatment of tomato seeds associated to microbiolization with *Trichoderma* spp.** 2009. 121p. Thesis (Ph.D. in Crop Science) Agronomy Institute, Department of Plant Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

This study was conducted at the Laboratory of Pathology and Epidemiology, Department of Plant Science of UFRRJ and at PESAGRO-RIO / Seropédica Experimental Station with the objective of selecting *Trichoderma* spp. antagonistic to *Rhizoctonia* in vitro; to quantify the effect of *Trichoderma* spp. in protecting seeds and seedlings of tomato against the attack of *Rhizoctonia* spp.; evaluate the effect of *Trichoderma* spp. in the emergence and quality of tomato seedlings developed in the presence of the pathogen and determine the macronutrient seedlings grown in a substrate inoculated with *Trichoderma* spp. and *Rhizoctonia*; study the effect of the combination of thermal and chemical treatments with microbiolization seeds with previously selected isolates of *Trichoderma* spp. and evaluate the survival of *Trichoderma* spp. in spermosphere and in the rhizosphere of seedlings. Were used isolates of *Trichoderma* spp, pre-selected from seeds of ‘Santa Clara Miss Brazil’, ‘Garrafinha Vermelho’ and ‘Perinha Água Branca’, untreated with fungicide. Three of the isolates showed antagonistic activity in vitro and suppression of colony growth of *Rhizoctonia* spp. In tests of biological control under greenhouse conditions, effects of treatments were seen in the emergence, length and dry weight of shoot and root, root area of plants, teor and content of nitrogen, phosphorus and potassium, and easy recovery of *Trichoderma* spp. from seeds and roots of seedlings. For combination of thermal and chemical treatments of the seeds with *Trichoderma* spp. there went significant effects of treatments on emergence and seedling development. The seed treatment via dry heat at 70 ° C / 96 hours resulted in low germination both in Gerbox® and in the substrate, while treatments with water heated to 50 ° C for 30 minutes and with HCl 5% per 10 minutes were the least damage caused to the seeds. Seed treatment with hot water associated with isolated or TENA7 TENA16 as biological protectors resulted in good emergence and development of seedlings and saplings, as well as the association between treatment with 5% HCl for 10 minutes followed by application of *Trichoderma* isolate TENA7.

Key-words: seed protection, seed pathology, soil fungi.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do ambiente sobre a porcentagem de emergência de plântulas de tomateiro cultivar Santa Clara Miss Brasil aos 5 e 14 dias após sementeira (DAS), em bandejas de alumínio, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	18
Tabela 2: Efeito dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> e do ambiente sobre a porcentagem de tombamento de mudas de tomateiro cultivar Santa Clara Miss Brasil até os 14 dias, em bandejas de alumínio, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	18
Tabela 3: Efeito da concentração de inóculo de isolado de <i>Rhizoctonia</i> RhB sobre a porcentagem de emergência aos cinco dias, emergência final e tombamento de mudas de tomateiro cultivar Santa Clara Miss Brasil aos 28 dias, em bandejas de polipropileno, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	19
Tabela 4: Efeito dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. sobre a emergência aos quatro dias após sementeira (DAS), em cultivares de tomateiro Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, semeados em bandejas de alumínio, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	21
Tabela 5: Efeito dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. sobre a emergência aos 5, 6, 7 e 8 dias após sementeira (DAS), em cultivares de tomate Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, semeados em bandejas de alumínio dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	23
Tabela 6: Efeito dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. sobre o tombamento até os 14 dias, em cultivares de tomate Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, semeados em bandejas de alumínio dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	24
Tabela 7: Efeito dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp. sobre a emergência e o tombamento até os 20 dias após sementeira de cultivar de tomate Santa Clara Miss Brasil em bandejas de alumínio dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	25
Tabela 8: Raio de crescimento (mm.disco ⁻¹) de colônia de isolados de <i>Trichoderma</i> spp., pareados com isolados de <i>Rhizoctonia</i> , avaliado aos quatro dias após a montagem do teste em placas de Petri contendo meio BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.....	35
Tabela 9: Raio de crescimento (mm.disco ⁻¹) de colônias de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp., pareados com isolados de <i>Trichoderma</i> spp., avaliado aos quatro dias após disposição de disco de micélio em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.....	36
Tabela 10: Raio de crescimento (mm.disco ⁻¹) de colônia de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp., em pareamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp., avaliado aos oito dias após disposição de discos de micélio em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.....	36
Tabela 11: Raio de crescimento (mm.disco ⁻¹) de colônia de isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp., pareados com isolados de <i>Trichoderma</i> spp., avaliado aos oito dias após disposição de discos de micélio em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.....	37
Tabela 12: Raio de crescimento (mm.disco ⁻¹) de colônia de isolados de <i>Trichoderma</i> spp., pareados com isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp., avaliados aos oito dias após a montagem do teste em placas de Petri contendo meio BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.....	38
Tabela 13: Teste de antagonismo <i>in vitro</i> pelo método de confrontação direta para efeito de meios de cultura BDA e BDA ácido, sobre o raio de crescimento das colônias dos isolados de <i>Trichoderma</i> e de <i>Rhizoctonia</i> , avaliado por meio de escalas de notas de 1 a 5, aos oito dias após o pareamento dos discos fúngicos em placas de Petri. Seropédica, 2009.*	40

Tabela 14: Efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e de cultivar sobre a emergência de mudas aos 4, 5, 6, 7 e 21 dias após semeadura (DAS) e da presença de <i>Rhizoctonia</i> sp. sobre a porcentagem de tombamento aos 21 DAS em ensaio realizado em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008.	52
Tabela 15: Efeito de cultivar e da presença ou ausência de <i>Rhizoctonia</i> sp. sobre o comprimento de raízes e altura de mudas de tomates (mm.plantula ⁻¹) avaliados aos seis dias após o semeio em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.	55
Tabela 16: Efeito do tratamento de sementes com <i>Trichoderma</i> spp. e da ausência ou presença de inóculo de <i>Rhizoctonia</i> sp. sobre o comprimento de raízes e altura de mudas de tomate (mm.planta ⁻¹), cultivar Santa Clara e Garrafinha Vermelho, aos 14 dias após o semeio, em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.	56
Tabela 17: Efeito de tratamento de sementes de tomate cultivares Santa Clara e Garrafinha Vermelho com isolados de <i>Trichoderma</i> spp., sobre a área radicular de mudas (cm ² .planta ⁻¹), semeadas em bandejas de polipropileno contendo substrato inoculado com <i>Rhizoctonia</i> , conduzidos dentro de casa-de-vegetação, e avaliadas aos 21 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.....	57
Tabela 18: Efeito da interação entre isolados de <i>Trichoderma</i> spp e cultivar sobre a emergência de mudas (%), em substrato inoculado ou não com <i>Rhizoctonia</i> , avaliada aos cinco dias após semeadura (DAS) em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008.	58
Tabela 19: Efeito do tratamento de sementes de tomate e da interação entre cultivar e presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> , sobre a emergência das plântulas aos seis dias após o semeio, em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008.	59
Tabela 20: Efeito da interação entre tratamento das sementes com isolados de <i>Trichoderma</i> spp e de cultivar sobre a emergência de mudas avaliada aos oito dias após a semeadura, em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008.Seropédica, 2008.....	59
Tabela 21: Efeito de cultivar sobre a porcentagem de emergência, da presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> e da interação entre tratamento das sementes com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e cultivar sobre a porcentagem de tombamento em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 24 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.....	60
Tabela 22: Efeito de tratamento das sementes com isolados de <i>Trichoderma</i> spp e de cultivar sobre a altura mudas (mm.planta ⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliado aos 10, 17 e 24 dias após a semeadura. Seropédica, 2008.....	61
Tabela 23: Efeito de cultivar sobre o comprimento de raízes de mudas (mm.planta ⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliado aos 10 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.	61
Tabela 24: Efeito de cultivar sobre a massa seca de plântulas de tomates avaliados aos seis, 14 e 21 dias após o semeio (DAS) em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.75	75
Tabela 25: Efeito do tratamento de sementes de tomate com isolados de <i>Trichoderma</i> spp, na ausência ou presença de inóculo de <i>Rhizoctonia</i> sp., sobre a massa seca das plântulas (mg.plânta ⁻¹), cultivares Santa Clara e Garrafinha Vermelho, aos seis, 14 e 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.	76
Tabela 26: Efeito do tratamento de sementes com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e de cultivar sobre o teor (%) e conteúdo (mg. g muda ⁻¹) de N em mudas de tomateiro aos 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	78
Tabela 27: Efeito da presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> sobre o teor (mg.g massa seca ⁻¹) de P e K em mudas de tomates aos 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.	79
Tabela 28: Efeito da interação entre tratamento de sementes com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e ausência ou presença de inóculo de <i>Rhizoctonia</i> sp. e de cultivar sobre o conteúdo	

de P (mg.planta ⁻¹) em mudas de tomate, aos 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.	80
Tabela 29: Efeito de tratamento de sementes de variedades de tomate Santa Clara ‘Miss Brasil’ e Garrafinha Vermelho com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o tombamento total de mudas (%), semeadas em bandejas de polipropileno contendo substrato inoculado com <i>Rhizoctonia</i> , sendo conduzidos dentro de casa-de-vegetação, e avaliadas aos 24 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.	81
Tabela 30: Efeito da interação entre tratamento das sementes com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e cultivar e presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> spp. sobre a massa seca de mudas de tomate (mg.planta ⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 10 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.	83
Tabela 31: Efeito da interação entre cultivar e presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> sobre a massa seca de mudas de tomate (g.planta ⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 17 e 24 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.	84
Tabela 32: Efeito de cultivar sobre o conteúdo de N e de P (mg.planta ⁻¹), da presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> sobre o conteúdo de P (mg.planta ⁻¹), da interação entre cultivar e presença ou não <i>Rhizoctonia</i> sp. sobre o teor de K (%) e de cultivar e presença ou não <i>Rhizoctonia</i> sp sobre o conteúdo de K, em mudas de tomate, em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 24 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.	84
Tabela 33: Efeito do tratamento de sementes e microbiolização com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a germinação de tomate cultivar ‘Perinha Água Branca’, semeadas em caixas plásticas tipo gerbox com papel germitest. Seropédica, 2009.	97
Tabela 34: Efeito do tratamento de sementes e microbiolização com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a emergência de tomate cultivar Perinha Água Branca, semeadas em bandejas contendo substrato. Seropédica, 2009.	99
Tabela 35: Efeito do tratamento de sementes e microbiolização com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a massa seca aos 30 dias após semeadura de tomate cultivar Perinha Água Branca, em bandejas contendo substrato. Seropédica, 2009.	101

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Resumo contendo a identificação dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> spp., material vegetativo de origem e número de núcleos observados na célula micelial.....	17
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Percentual de plântulas tombadas em relação à concentração de inóculo de *Rhizoctonia* RhB, em mg de micélio.L⁻¹ de substrato. Seropédica, 2006.20
- Figura 2: Pareamento de isolado de *Trichoderma* TENA33 (disco de micélio situado na porção direita) com *Rhizoctonia* RhB (disco de micélio situado na porção esquerda), no 8º dia. As marcações acompanham o raio de crescimento dos isolados aos 1, 2, 3 e 4 dias após incubação, quando então os micélios se encontraram. Seropédica, 2009.34
- Figura 3 : Pareamento de isolados de *Trichoderma* (disco de micélio situado na porção superior) TENA7, TENA16 e TENA33, com *Rhizoctonia* RhB (disco de micélio situado na porção inferior), no 8º dia, demonstrando diferentes respostas de crescimento. Seropédica, 2009.37
- Figura 4: Reações de antagonismo *in vitro* de cinco isolados de *Trichoderma* spp. com seis isolados de *Rhizoctonia solani*, apresentando médias percentuais de raio de crescimento (mm.disco⁻¹) dos respectivos isolados, medido aos 8 dias, em placas de Petri. Seropédica, 2009.39
- Figura 5: Efeito de isolados de *Trichoderma* spp. sobre emergência de plântulas de tomate aos quatro dias após semeadura em substrato comercial. Seropédica, 2007.53
- Figura 6: Efeito de isolados de *Trichoderma* spp. sobre emergência de sementes de tomate semeados em substrato comercial para hortaliças. Seropédica, 2007.54

LISTA DE ANEXOS

- Anexo I: Análise de variância para efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp.(tratamento), de substrato e ambiente sobre a emergência aos cinco e aos 14 dias, e tombamento em mudas de tomate até os 14 dias, em bandejas de alumínio, dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007. 109
- Anexo II: Análise de variância para efeito de concentração de inóculo de isolado de *Rhizoctonia* spp., sobre a porcentagem de emergência aos cinco e 28 dias, e tombamento em mudas de tomate até 28 dias, em bandejas de polipropileno com substrato comercial, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007. 109
- Anexo III: Análise de variância para efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp. (tratamento), em cultivares de tomate Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, sobre a emergência aos 4, 5, 6, 7 e 8 dias após semeadura (DAS), e tombamento em mudas de tomate até os 14 DAS, semeados em bandejas de alumínio, dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007. 110
- Anexo IV: Análise de variância para efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp., em cultivar de tomate Santa Clara Miss Brasil, sobre a emergência total aos 20 dias, e tombamento em mudas de tomate até os 20 dias, semeados em bandejas de alumínio dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007. 110
- Anexo V: Análise de variância para efeito de isolado de *Trichoderma*, de *Rhizoctonia* e de meio de cultura sobre o crescimento das colônias de *Trichoderma* spp., expresso em mm, avaliados aos quatro e oito dias após o pareamento das colônias em placas de Petri. Seropédica, 2008. 111
- Anexo VI: Análise de variância para efeito de isolado de *Trichoderma*, de *Rhizoctonia* e de meio de cultura sobre o raio de crescimento das colônias de *Rhizoctonia* spp., expresso em mm, avaliados aos quatro e oito dias após o pareamento das colônias em placas de Petri. Seropédica, 2008. 111
- Anexo VII: Análise de variância para efeito de isolados de *Trichoderma* spp., cultivar e presença de *Rhizoctonia* sobre a porcentagem de emergência de mudas de tomate em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 4, 5, 6, 7 e 21 dias após semeadura (DAS) e de tombamento, avaliado aos 21 DAS. Seropédica, 2008. 112
- Anexo VIII: Análise de variância para efeito de isolados de *Trichoderma* spp., cultivar e presença de *Rhizoctonia* sobre o comprimento da raiz e altura de mudas (mm.plântula⁻¹) avaliados aos seis dias após a semeadura. Seropédica, 2007. 113
- Anexo IX: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma* spp., presença ou não de inóculo de *Rhizoctonia* e de cultivar sobre o comprimento de raiz (mm.planta⁻¹) e altura de mudas de tomate(mm.planta⁻¹), avaliado aos 14 dias após semeadura, sob condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.. 113
- Anexo X: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma* spp., de cultivar e presença ou não de inóculo de *Rhizoctonia*, sobre o comprimento da raiz (cm.planta⁻¹) e a área radicular (cm².planta⁻¹) aos 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007. 114
- Anexo XI: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp, da presença ou não de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre a emergência das plântulas em bandejas em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 5, 6, 7 e 8 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008. 114
- Anexo XII: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp, da presença ou não de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre a

emergência das plântulas em bandejas em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 24 dias após sementeira. (Seropédica, 2008).....	115
Anexo XIII: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de <i>Trichoderma</i> spp, da presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> sp. e de cultivar sobre a altura de mudas (mm.planta ⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 10, 17 e 24 dias após a sementeira. Seropédica, 2008.....	115
Anexo XIV: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de <i>Trichoderma</i> sp., da presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> sp. e de cultivar sobre a área radicular (cm ² .planta ⁻¹) avaliada aos 17 dias após sementeira e o comprimento radicular (cm.planta ⁻¹) de mudas de tomate em condições de casa-de-vegetação avaliado aos 10 e 17 dias após sementeira (DAS). Seropédica, 2008.....	116
Anexo XV: Análise de variância para efeito de isolados de <i>Trichoderma</i> spp., cultivar e presença de <i>Rhizoctonia</i> sobre a massa seca das plântulas (g.plântula ⁻¹) avaliada aos seis dias após a sementeira. Seropédica, 2007.....	116
Anexo XVI: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de <i>Trichoderma</i> spp., presença ou não de inóculo de <i>Rhizoctonia</i> e de cultivar sobre a massa seca (g.planta ⁻¹) de mudas de tomate cultivares Santa Clara e Garrafinha Vermelho, avaliada aos 14 dias após sementeira, sob condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	117
Anexo XVII: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de <i>Trichoderma</i> spp., de cultivar e presença ou não de inóculo de <i>Rhizoctonia</i> , sobre a massa seca de raiz e de parte aérea (mm) aos 21 dias após sementeira em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.....	117
Anexo XVIII: Análise de variância para o efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e testemunhas, de cultivar e da presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> sobre o teor (mg.g massa seca ⁻¹) e conteúdo (mg.planta ⁻¹) de nitrogênio, fósforo e potássio das mudas, avaliadas aos 21 dias após sementeira, em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008.....	118
Anexo XIX: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de <i>Trichoderma</i> spp, da presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> sp. e de cultivar sobre a massa seca de parte aérea das mudas (g.planta ⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 10 e 17 dias após sementeira. Seropédica, 2008.....	118
Anexo XX: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de <i>Trichoderma</i> spp, da presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> sp. e de cultivar sobre a massa seca de parte aérea das mudas (g.planta ⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 10, 17 e 24 dias após sementeira (DAS). Seropédica, 2008.....	119
Anexo XXI: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de <i>Trichoderma</i> spp, da presença ou não de <i>Rhizoctonia</i> sp. e de cultivar sobre o teor (mg.g massa seca ⁻¹) e conteúdo (mg.muda ⁻¹) de macronutrientes N, P e K de parte aérea das mudas, sementeiras em bandejas de polipropileno contendo substrato inoculado com <i>Rhizoctonia</i> , conduzidos dentro de casa-de-vegetação, avaliadas aos 24 dias após sementeira (DAS). Seropédica, 2008.....	120
Anexo XXII: Resumo da análise de variância para efeito de tratamento de sementes e microbiolização com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a emergência de tomate cultivar Perinha Água Branca, sementeiras em bandejas contendo substrato. Seropédica, 2009.....	121
Anexo XXIII: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes e microbiolização com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre a massa seca aos 30 dias após sementeira de tomate cultivar Perinha Água Branca aos 30 dias, em bandejas contendo substrato. Seropédica, 2009.....	121

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO GERAL.....	3
CAPÍTULO I.....	9
AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Rhizoctonia</i> sp. PATOGÊNICOS AO TOMATEIRO (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.).....	9
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1 Coleta e Caracterização de Isolados de <i>Rhizoctonia</i> sp.....	14
2.2 Teste Inicial de Patogenicidade de <i>Rhizoctonia</i> spp. em Mudras de Tomateiro	14
2.3 Determinação da Concentração Mínima de Inóculo de <i>Rhizoctonia</i> sp. para Indução de Tombamento em Mudras de Tomateiro.....	15
2.4 Avaliação Comparativa da Virulência dos Isolados de <i>Rhizoctonia</i> sp. ao Tomateiro	16
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 Coleta de Isolados de <i>Rhizoctonia</i> sp.....	17
3.2 Teste Inicial de Patogenicidade de <i>Rhizoctonia</i> em Mudras de Tomateiro	17
3.3 Determinação da Concentração Mínima de Inóculo de <i>Rhizoctonia</i> sp. para Indução de Tombamento em Mudras de Tomateiro.....	19
3.4 Avaliação Comparativa da Virulência de Isolados <i>Rhizoctonia</i> spp. ao Tomateiro ...	21
4 CONCLUSÕES	26
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO II.....	29
PAREAMENTO ENTRE CULTURAS DE ISOLADOS DE <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Trichoderma</i> spp. <i>IN VITRO</i>	29
1 INTRODUÇÃO.....	32
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 Pareamento Entre Culturas de Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Rhizoctonia solani</i> <i>in</i> <i>vitro</i>	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Pareamento Entre Culturas de Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Rhizoctonia solani</i> <i>in</i> <i>vitro</i>	35
4 CONCLUSÕES	41
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
CAPÍTULO III	44
EFEITO DA APLICAÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp. EM SEMENTES SOBRE A QUALIDADE DE MUDRAS DE TOMATE (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) E PROTEÇÃO CONTRA <i>Rhizoctonia solani</i>	44
1 INTRODUÇÃO.....	47
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
2.1 Ensaio de Controle Biológico I	49
2.2 Ensaio de Controle Biológico II.....	50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Ensaio de Controle Biológico I	52
3.2 Ensaio de Controle Biológico II.....	57
4 CONCLUSÕES	63

5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CAPÍTULO IV		
	MACRONUTRIENTES EM MUDAS DE TOMATEIRO (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) PRODUZIDAS A PARTIR DE SEMENTES TRATADAS COM <i>Trichoderma</i> spp. E SEMEADAS EM SUBSTRATO INFESTADO OU NÃO COM <i>Rhizoctonia</i> sp.....	68
1	INTRODUÇÃO.....	71
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
2.1	Ensaio de Controle Biológico I	73
2.2	Ensaio de Controle Biológico II	74
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1	Ensaio de Controle Biológico I	75
3.2	Ensaio de Controle Biológico II	83
4	CONCLUSÕES	87
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CAPÍTULO V		
	TRATAMENTOS TÉRMICOS E QUÍMICO DE SEMENTES DE TOMATEIRO (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) ASSOCIADOS À MICROBIOLIZAÇÃO COM <i>Trichoderma</i> spp.....	91
1	INTRODUÇÃO.....	94
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	96
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4	CONCLUSÕES	102
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

INTRODUÇÃO GERAL

Controle biológico, ou sua forma abreviada, biocontrole, envolve a utilização de microrganismos capazes de suprimir ou reduzir o desenvolvimento de uma determinada doença. Este efeito deve-se às interações entre o agente de biocontrole e a planta e entre este mesmo agente e o patógeno sobre e ao redor da planta (HANDELSMAN & STABB, 1996). Para tornar o uso dos agentes de biocontrole mais efetivo no manejo de doenças de plantas, é preciso entender como estes atuam e quais são as suas limitações (HOWELL, 2003). Os mecanismos envolvidos são muitos, variados e complexos e o resultado final decorrente da eficiência e combinação dos mesmos (HOWELL, 2003).

Entre as doenças de plantas potencialmente controláveis por agentes de biocontrole estão aquelas causadas por *Rhizoctonia* como o tombamento em tomate e em outras culturas importantes economicamente. O tombamento, também conhecido como *damping-off*, é provavelmente o sintoma mais comum causado por *Rhizoctonia* na maioria das plantas que coloniza, podendo matar as sementes antes da germinação ou as plântulas logo após sua emergência do solo, colonizando não somente as raízes como também o caule (AGRIOS, 2005).

Microrganismos que são antagonistas a fungos fitopatogênicos têm sido usados para controle de doenças, e 90% de tais aplicações é realizado com diferentes cepas do fungo *Trichoderma* (BENITEZ *et al.*, 2004). O relativo sucesso do uso de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico pode ser atribuído à capacidade metabólica diversa destas espécies e à sua natureza agressivamente competitiva (KUBICEK & HARMAN, 1998). O entendimento da diversidade genética de *Trichoderma* spp. e de seus mecanismos de biocontrole podem vir a ajudar a aperfeiçoar a sua aplicação como agente de controle biológico (HOWELL, 2003).

O tratamento biológico pode ser feito através da inoculação direta nas sementes ou através da adição ao substrato utilizado na produção de mudas, com a vantagem de uma ação residual de proteção mais prolongada que os tratamentos químico e térmico, principalmente se o microrganismo protetor encontra condições favoráveis para seu desenvolvimento e estabelecimento no solo ou substrato (MACHADO, 2000).

A complexidade da interação agente de biocontrole x patógeno x planta tem dificultado a adoção do biocontrole no manejo de doenças de plantas por dois motivos principais: resultados práticos com biocontrole variam muito e progresso no entendimento do sistema inteiro tem sido lento (HANDELSMAN & STABB, 1996).

A microbiolização de sementes constitui um método alternativo, viável economicamente e que pode trazer benefícios à cultura por favorecer o equilíbrio microbiano do solo cultivado. É um sistema ideal de introdução de bioprotetores para o controle das doenças das sementes, formando a primeira barreira de defesa das plantas contra o ataque de microrganismos fitopatogênicos (LUZ, 1993). A utilização de uma associação de tratamentos térmicos e químicos com a inoculação de microrganismos antagonistas de controle biológico, como *Trichoderma* spp., sobre as sementes é uma alternativa que deve ser melhor estudada. Isolados de *Trichoderma* spp. aplicados às sementes podem proteger a plântula por serem os primeiros colonizadores da rizosfera (SIVAN & CHET, 1989; LUZ, 1993; MELO, 1996), proporcionando proteção contra diversos patógenos de solo.

Com este trabalho, pretende-se testar as hipóteses de que isolados de *Trichoderma* possam ter efeito no controle do tombamento de mudas de tomate causada por *Rhizoctonia* sp. e estimular a emergência de plântulas e/ou promover o crescimento das mudas de tomateiro, pois são citados ainda como promotores de crescimento (ALTOMARE *et al.*, 1999; INBAR *et al.*, 1994; KLEIFELD & CHET, 1992; WINDHAM & ELAD, 1986;

YEDIDIA, 2001). Acredita-se, ainda que possam ser utilizados como protetores de sementes de tomateiro após serem submetidas a tratamentos para erradicação de fitopatógenos.

Assim, os objetivos a serem alcançados com este trabalho são: selecionar isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *Rhizoctonia* sp. *in vitro*; quantificar o efeito da aplicação *Trichoderma* spp. na proteção de sementes e plântulas de tomate contra o ataque de *Rhizoctonia* spp; avaliar o efeito da aplicação de *Trichoderma* spp. na emergência e qualidade das mudas de tomate desenvolvidas na presença do patógeno; determinar os teores de macronutrientes das mudas formadas em substrato inoculados com isolados de *Trichoderma* spp. e *Rhizoctonia*; estudar o efeito da associação de tratamentos térmicos e químico com a microbiolização das sementes com isolados previamente selecionados de *Trichoderma* spp. e avaliar a sobrevivência de isolados de *Trichoderma* spp. na espermosfera e rizosfera das mudas.

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados foram pré-selecionados em ensaios anteriores, em condições de laboratório e de casa-de-vegetação (SUDO-MARTELLETO, 2005), onde observaram-se diferentes respostas no desenvolvimento das mudas conforme o isolado utilizado. Feita a seleção dos isolados de *Trichoderma* spp. com potencial para uso em controle biológico, o trabalho foi iniciado com a seleção de isolados virulentos de *Rhizoctonia* sp. patogênicos ao tomateiro e causadores de tombamento de mudas, e com a definição da densidade de inóculo ideal do patógeno para os trabalhos em condições de casa-de-vegetação. No capítulo II, são apresentados ensaios *in vitro* envolvendo isolados de *Trichoderma* e de *Rhizoctonia*, em culturas puras, sem a presença do hospedeiro. No capítulo III, avaliaram-se o efeito da aplicação *Trichoderma* spp. sobre a emergência de sementes de tomate, na proteção das sementes e plântulas contra o ataque de *Rhizoctonia* sp. e sobre o desenvolvimento e qualidade das mudas formadas. No capítulo IV serão apresentados os estudos para avaliar o efeito do tratamento de sementes sobre a massa seca de raízes e parte aérea e sobre os teores e conteúdos de nitrogênio, fósforo e potássio em mudas de tomateiro desenvolvidos sob substrato infestado com inóculo de *Rhizoctonia* sp.. E, finalmente, no capítulo V, serão apresentados os trabalhos envolvendo a associação entre a aplicação de tratamentos de erradicação de patógenos das sementes, como o tratamento térmico, via calor seco a 70 °C por 96 h sob ventilação forçada (SILVA *et al*, 2002; CARMO *et al.*, 2004), via úmida com água mantida a 50 °C por 30 min (REIFSCHNEIDER *et al.*, 1985; CARMO *et al.*, 2004); químico com HCl a 5% por 10 min (MARINGONI & KUROZAWA, 1994; CARMO *et al.*, 2004) e a aplicação de tratamentos de proteção por meio de microbiolização com isolados de *Trichoderma* sp.

REVISÃO GERAL

O tombamento das mudas é doença muito comum em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Pode ser causado por vários fungos que sobrevivem no solo, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp, *Sclerotium rolfsii* entre outros, podendo ser confundido com má germinação das sementes ou associado à má qualidade das sementes (KUROZAWA & PAVAN, 1997). Estes patógenos também podem não ser letais para a planta madura, mas causar reduções no crescimento da planta e vigor, reduzindo sua produtividade (MARTIN, 2003).

Rhizoctonia solani é muito representativo entre os fungos que causam tombamento em tomate e em outras culturas importantes economicamente. O tombamento, também conhecido como *damping-off*, é, provavelmente, o sintoma mais comum causado por *Rhizoctonia* na maioria das plantas que coloniza, podendo matar plântulas antes da germinação ou logo após sua emergência do solo, colonizando não somente as raízes como também o caule (AGRIOS, 2005). Em hospedeiras como feijão, vagem, pimentão e tomate, o fungo invade e pode ser carregado nas sementes, e quando se estabelece no campo permanece indefinidamente, se espalhando com chuva, irrigação, ferramentas ou material propagativo contaminado. Para a maioria das raças deste patógeno, a temperatura ótima para a ocorrência de infecções situa-se entre 15 e 18 °C. Existem, porém, algumas raças que causam danos mais severos quando as temperaturas são superiores a 35° C, especialmente em solos moderadamente úmidos (AGRIOS, 2005).

Muitos estudos têm sido realizados demonstrando efetividade de *Trichoderma* spp. no controle de tombamentos, não só em tomateiro como também em outras culturas como pimentão, pepino, cenoura, trigo, milho e várias outras. Trabalhos também demonstram efeitos de *Trichoderma* spp. na qualidade das mudas, principalmente, no aumento da massa fresca, massa seca, comprimento de raízes e parte aérea.

Sementes contaminadas podem representar a principal fonte de inóculo primário para início das epidemias de várias doenças (SHEKHAWAT & CHACKRAVARTI, 1979; BASHAN *et al*; 1982.; SCHAAD, 1982; SHARON *et al.*, 1982; , KIMURA, 1984; SCHAAD,1988) e a sua utilização, mesmo com baixos níveis de sementes contaminadas, pode resultar em perdas no viveiro e no campo (RICHARDSON, 1979; HARMAN, 1983; CARMO *et al.*,1996). Para a sua erradicação podem ser usados tratamentos químicos ou físicos. Entre os métodos físicos para tratamento de sementes está o térmico com o uso de calor. Entre os métodos químicos, além do uso de fungicidas pode ser citado o uso de ácidos, como o ácido clorídrico (KIMURA, 1991; MARINGONI & KUROZAWA, 1994; MACHADO, 2000; CARMO, 2001; SILVA *et al.*, 2002; CARMO *et al.*, 2004).

A ação do calor através dos tecidos das sementes pode atingir o inóculo infectivo dos patógenos localizados mais profundamente nos tecidos. Para a cultura do tomateiro, a termoterapia pode ser aplicada no controle de diversos fitopatógenos como *Colletotrichum* sp., *Alternaria solani*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (MACHADO, 2000), que ocasionam doenças comumente conhecidas como antracnose, pinta preta, mancha bacteriana e cancro bacteriano, respectivamente.

O tratamento térmico e o tratamento com ácido clorídrico, porém, não oferecem uma proteção residual às sementes, anulando uma ação preventiva contra patógenos presentes no solo. O tratamento de sementes via microbiolização é interessante para manter em certos níveis a diversidade da microflora da espermosfera (semente) e ainda constituir um veículo eficiente para introdução de agentes microbiológicos de interesse no campo de cultivo (CHAO *et al.*, 1986).

Entende-se por microbiolização a aplicação de microorganismos vivos às sementes ou partes vegetativas propagativas como ramos e raízes, para o controle das doenças e/ou para promover o crescimento das plantas (LUZ, 1993). É um procedimento prático e simples de introdução de bioprotetores para o controle de patógenos transmitidos pelas sementes, bem como daqueles presentes no solo ou no substrato, por permitir que o agente de controle biológico forme a primeira barreira de defesa das plantas contra o ataque de microorganismos fitopatogênicos (LUZ, 1993).

Trichoderma é fungo ativo como micoparásita de fitopatógenos, que produz esporos e clamidósporos que podem ser formulados e utilizados para tratamento de solos, de sementes, de estolões e de bulbos e, ainda, pulverizados por via aérea (MELO, 1996). *Trichoderma* spp. têm sido usado para controlar o tombamento de plântulas e podridões radiculares de várias espécies vegetais (LUZ, 1993; MAO, 1998; PRASAD, 2002; AHMED, 2003).

PORFÍRIO-SILVA & HOMECHIN (1992) utilizando *Trichoderma* spp. em sementes de tomateiro observaram aumentos no percentual de emergência e redução no número de plântulas colonizadas por *R. solani*. LARANJEIRA & MENEZES (1993) observaram parasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *R. solani* em condições de laboratório. HADAR *et al.* (1979), aplicaram *T. harzianum* através de farelo de trigo em solo infestado com *R. solani*, e obtiveram controle efetivo de tombamento de mudas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e tomate (*L. esculentum*). HARMAN (2000) mostrou que sementes de milho (*Zea mays* L.) semeadas em solo com *T. harzianum* (T-22) e baixo teor de N resultaram em plantas que cresceram bem verdes e maiores na maior parte da fase de crescimento. Na maturidade, as plantas tiveram maior diâmetro de caule e maior rendimento de grãos e silagem no campo. RAJU *et al.* (1999) em teste com sementes de sorgo infectadas por *Fusarium moniliforme* e tratadas com *Pseudomonas fluorescens*, *T. harzianum* e *Chaetomium globosum*, observaram redução significativa na incidência da doença, assim como verificaram aumentos na porcentagem de germinação das sementes, no vigor das mudas e na emergência no campo. Neste trabalho, feito com cinco cultivares diferentes de sorgo, todos os antagonistas reduziram a incidência de *Fusarium moniliforme*, indicando que os agentes de controle biológico foram mais efetivos do que o tratamento químico recomendado. LUZ (2001), trabalhando com sementes de milho microbiolizadas com *T. harzianum*, obteve aumento significativo na porcentagem de emergência de plântulas e no rendimento de grãos (*Zea mays* L.). Evidências têm mostrado que *Trichoderma* pode favorecer a germinação de sementes, o crescimento de plantas e a qualidade das mudas (MELO, 1996; MISHRA & SINHA, 2000; LUZ, 2001; YEDIDIA, 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th edition. New York: Academic Press. 2005. 922p.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. American Society for Microbiology: **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n° 7, p. 2926-2933. 1999.
- AHMED, A.S.; EZZIYYANI, M.; PÉREZ SANCHEZ, C. & CANDELA, M.E. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. **European Journal of Plant Pathology**, Holanda, v.109, p.633-637. 2003.
- BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas vesicatoria* in tomato and pepper seeds. **Phytopathology**, Minnesota, v. 72, p. 1143-1144. 1982.
- BENITEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v.7, n° 4, p. 249-260. 2004.
- CARMO, M.G.F.; MAFFIA, L.A.; KIMURA, O.; CARVALHO, A.O.C. Disseminação da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em condições de viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p.85-93. 1996.
- CARMO, M.G.F. Epidemiologia e controle de doenças do tomate e do pimentão no Estado do Rio de Janeiro: fitobacterioses da parte aérea. Rio de Janeiro: UFRRJ. 2001.
- CARMO, M.G.F.; CORREA, F.M.; CORDEIRO, E.S.; CARVALHO, A.O.; ROSSETTO, C.A.V. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.579-584, jul-set 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/hb/v22n3/a15v22n3.pdf>
- CHAO, W.I.; NELSON, E.B.; HARMAN, G.E. & HOCH, H.C. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. **Phytopathology**, Minnesota, p. 76, p.60-65. 1986.
- HADAR, Y.; CHET, I. & HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Minnesota, v.69, p. 64-68. 1979.
- HANDELSMAN, J.; STABB, E.V. Biocontrol do soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, Maryland, v.8, p. 1855-1869, out. 1996.
- HARMAN, G.E. Mechanisms of seed infection and pathogenesis. **Phytopathology**, Minnesota, v. 73, p. 326-329. 1983.
- _____ Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Minnesota, v.84, n° 4, p. 377-393, abril. 2000.

HOWELL, C. R. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Minnesota, v.87, nº 1, p. 4-10. 2003.

INBAR, J.; ABRAMSKY, M.; CHET, I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 337-346. 1994.

KIMURA, O. Enfermidades bacterianas do pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, p. 39-41. 1984.

KIMURA, O. Controle de fitobactérias em hortaliças através do tratamento térmico de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, suplemento, p.8. 1991 (Palestra).

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

KUBICEK, C.P.; HARMAN, G.E. **Trichoderma and Gliocladium**: basic biology, taxonomy and genetics. USA, v.1, 1998. 278 p.

KUROZAWA, C. & PAVAN, M.A. Doenças do Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia - Doenças de Plantas Cultivadas**. 3ª ed. São Paulo: Agrônômica Ceres. v.2, p.690-719. 1997.

LARANJEIRA, D.; MENEZES, M. Parasitismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani* em condições de laboratório. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, nº 18 (suplemento): 446, agosto. 1993.

LUZ, W.C. da. Microbiolização de Sementes para o Controle de Doenças. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, v.1, p.33-79. 1993.

_____. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, nº 1, p.16-20. 2001.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA, 2000. 138p.

MAO, W.; LEWIS, J.A.; LUMSDEN, R.D. & HEBBAR, K.P. Biocontrol of selected soilborne of tomato and pepper plants. **Crop Protection**, v.17, nº 6. 1998.

MARINGONI, A.C.; KUROZAWA, C. Erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria em sementes de tomateiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n.2, p. 191-194. 1994.

MARTIN, F.N. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.41, p. 325-350. 2003.

MELO, I. S. de. *Trichoderma* e *Gliocladium* com bioprotetores de plantas. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, v. 4, p. 261-295. 1996. 415 p.

MISHRA, D.S. & SINHA, A.P. Plant growth-promoting activity of some fungal and bacterial agents on rice seed germination and seedling growth. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.77, nº 3, p.188-191, julho. 2000.

PORFÍRIO-SILVA, Z. & HOMECHIN, M. Microbiolização de Sementes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tipo rasteiro com *Trichoderma* spp. e sua influência sobre o tombamento de plântulas por *Rhizoctonia solani* Khun. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.2, nº 17, p. 064, agosto. 1992.

PRASAD, R.D.; RANGESHWARAN, R.; HEDGE, S.V.; ANUROOP, C.P. Effect of soil and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum* under field conditions. **Crop Protection**, v.21, p.293-297. 2002.

RAJU, N.S.; NIRANJANA, S.R.; JANARDHANA, G.R.; PRAKASH, H.S.; SHEKAR SHETY, H. & MATHUR, S.B. Improvement of seed quality and field emergence of *Fusarium moniliforme* infected sorghum seeds using biological agents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Índia, v. 79, p.206-212. 1999.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CUNHA, M.M.; GUEDES, A;C. Diagnóstico da patologia de sementes de hortaliças no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 125-132. 1985.

RICHARDSON, M.J. An annotated list of seed-borne disease. 3.ed. **Commonwealth Mycollogical Institute**, 320p. 1979.

SCHAAD, N.W. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. **Plant Disease**, Minnesota, v. 66, p. 885-890. 1982.

_____. Bacteria: Inoculum thresholds of seedborne pathogens. **Phytopathology**, Minnesota, v. 78, p. 872-875. 1988.

SHARON, E.; BASHAN, Y.; DENIS, Y. Detached leaf enrichment: a method for detecting small numbers of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in seed and symptom less leaves of tomato and pepper. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 53, p. 371-377. 1982.

SHEKHAWAT, P.S.; CHACKRAVARTI, B.P. Comparison of agar-plate and cotyledon method for the detection of *Xanthomonas vesicatoria* in chili seeds. **Phytopathology**, Minnesota, v. 94, p. 80-83. 1979.

SILVA, A.M.S.; CARMO, M.G.F.; OLIVARES, F.L.; PEREIRA, A.J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 586-593. 2002.

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

SUDO-MARTELLETO, M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o tratamento de sementes de tomate visando a proteção contra patógenos de solo e de armazenamento e promoção de crescimento.** Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Dissertação de Mestrado, 2005. 112p.

WINDHAM, M.T.; ELAD, Y. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Minnesota, v. 76, nº 5, p. 518-521. 1986.

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

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia* sp. PATOGÊNICOS AO TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

RESUMO

Foram conduzidos ensaios no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia, da UFRRJ com os objetivos de: (i) determinar a condição de ambiente propícia para testes de patogenicidade de *Rhizoctonia*; (ii) selecionar isolado de *Rhizoctonia* patogênico a mudas de tomateiro, para estudos envolvendo controle biológico de patógenos de solo com *Trichoderma* spp.. (iii) determinar a quantidade mínima de inóculo necessária para o estabelecimento de tombamento de mudas para ensaios em condições de casa-de-vegetação. Compararam-se seis isolados de *Rhizoctonia* spp., obtidos de mudas de alface (RhB) e de feijão (RhC), e de tubérculos de batata (RhD, RhE, RhF e RhG), que foram preservados em tubos de ensaio contendo meio BDA com pentabiótico e recoberto com óleo mineral. Os seis isolados foram testados quanto a patogenicidade e virulência em sementes e plântulas do tomateiro sob ambiente em câmara úmida e sem câmara úmida, em três cultivares de tomate, Santa Clara Miss Brasil, Garrafinha Vermelho e Perinha Água Branca. Em seguida compararam-se diferentes concentrações de inóculo do patógeno para determinar a quantidade mínima necessária para indução de tombamento pós-emergência. O ambiente sem câmara úmida foi o mais adequado para os testes de patogenicidade e o isolado que ocasionou maior porcentagem de tombamento na fase de pós-emergência foi o RhB obtido de plantas de alface. Na fase de pré-emergência maiores danos foram causados pelo isolado RhG obtidos de tubérculos de batata. A concentração de inóculo de *Rhizoctonia* que resultou em maior porcentagem de tombamento de mudas variou entre 173,0 a 347,0 mg de micélio.L⁻¹ de substrato para produção de mudas.

Palavras-chave: tombamento de mudas, tomate, patogenicidade.

ABSTRACT

Bioassays were conducted at the Seed Pathology Laboratory, Department of Plant Science, of UFRRJ with the objectives of: (i) determine the condition of environment for testing pathogenicity of *Rhizoctonia*, (ii) select pathogenic *Rhizoctonia* isolate to tomato seedlings, for studies involving biological control of soil borne pathogens with *Trichoderma* spp .. (iii) determine the minimum amount of inoculum needed for the establishment of damping-off for testing under green-house conditions. Were compared six isolates of *Rhizoctonia* spp. obtained from lettuce (RhB) and beans (RHC) seedlings and potato tubers (RhD, RHE, RHF and RHG), which were preserved in test tubes containing half inclined BDA with pentabiotic under mineral oil immersion to storage at room temperature. The six isolates were tested for pathogenicity and virulence on tomato seeds and seedlings under ambient in a moist chamber and no moist chamber, in three tomato cultivars, 'Santa Clara Miss Brasil', 'Garrafinha Vermelho' and 'Perinha Água Branca'. Then, were compared different concentrations of pathogen inoculum to determine the minimum amount necessary to induce post-emergence damping off. The environment without a moist chamber was suitable for testing the pathogenicity and the isolate that caused the highest percentage of damping-off in the post-emergence was RhB obtained in lettuce. In the pre-emergence greatest damage was caused by RhG isolate obtained from potato tubers. The concentration of inoculum of *Rhizoctonia* that resulted in the highest percentage of damping off ranged from 173.0 to 347.0 mg micelia.L⁻¹ substrate for seedling production.

Keywords: damping off, tomato, pathogenicity.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rhizoctonia* tem sua fase teleomórfica dentro do *phylum* Basidiomycota como *Thanatephorus cucumeris* ou *Ceratobasidium* (SILVEIRA & ALFENAS, 2002; AGRIOS, 2005). Fungos do gênero *Rhizoctonia* apresentam micélio estéril com células longas, e ramificações em ângulo reto e próximas ao septo distal com constricção na base das mesmas (OGOSHI, 1987; FERREIRA, 1989; AGRIOS, 2005).

Espécies do gênero *Rhizoctonia*, de modo geral, são habitantes do solo sendo algumas patogênicas e causando doenças em muitas espécies vegetais como podridões em raízes, colo e tubérculos e, em alguns casos, lesões foliares e em frutos (NECHET & HALFELD-VIEIRA, 2006; OGOSHI, 1987). São disseminadas por meio de ferramentas bem como material vegetal contaminado como sementes, mudas, tubérculos dentre outros (FERREIRA, 1989; SILVEIRA *et al.*, 2003; AGRIOS, 2005). Sobrevivem em tecidos mortos dos hospedeiros e em material orgânico no solo na forma de hifas e escleródios, que são suas estruturas de resistência, que germinam em condições de ambiente favoráveis, produzindo hifas para colonizar substratos orgânicos vegetais mortos ou vivos (FERREIRA, 1989). Existe, porém, variabilidade dentro das espécies quanto à gama de hospedeiros, patogenicidade, morfologia, características culturais, fisiológicas e resposta às condições de ambiente (BELL, 1982; OGOSHI, 1987; KUROZAWA & PAVAN, 1997; MUSLIM *et al.*, 2003; AGRIOS, 2005).

Para caracterização dos isolados de *Rhizoctonia* podem ser usados diversos parâmetros como morfologia da colônia, taxa de crescimento micelial, formação e tamanho de microescleródios, número de núcleos, grupos de anastomose e teste de patogenicidade (NECHET & HALFELD-VIEIRA, 2006). Os grupos de anastomose de *Rhizoctonia* spp. podem ser associados a diferentes características culturais, tipo de hospedeiros, havendo ampla variabilidade dentro de cada grupo, existindo a possibilidade de subdivisão dos grupos de acordo com os hospedeiros, morfologia, requerimentos para tiamina e homologia de DNA (OGOSHI, 1987; CARLING, 1996).

A identificação de *Rhizoctonia* a nível de gênero pode ser feita por meio de observações em microscópio óptico tendo como a base a descrição de Ogoshi (1987) e caracterização dos isolados por meio de teste de coloração de núcleos (BANDONI, 1979; YAMAMOTO & UCHIDA, 1982; KRONLAND & STANGHELLINI, 1988). Com base no número de núcleos, as espécies do gênero *Rhizoctonia* podem ser divididas em três grupos, formados por micélio uni, bi ou multinucleado (CARLING, 1996).

Uma das doenças mais comuns causadas por espécies fitopatogênicas de *Rhizoctonia* é o tombamento ou *damping off* de mudas em viveiros de diferentes espécies como tomate, alface, feijão, quiabo, eucalipto, beterraba, cenoura e várias outras. O tombamento é uma das principais doenças que atacam mudas de tomateiro, podendo ser ocasionado por outros fungos como *Fusarium* sp. e *Pythium* sp., sendo *Rhizoctonia* sp. um dos mais freqüentemente associados aos sintomas da doença. Além de tombamento, *Rhizoctonia* sp. pode colonizar as sementes em fase de embebição ocasionando a sua morte na fase de pré-emergência (GOULART, 2002) resultando em redução do stand devido às falhas na germinação. A infecção de plantas jovens é mais severa quando o crescimento da planta é lento, devido a condições adversas para a planta, ou, o vigor das sementes é baixo (AGRIOS, 2005; MARCOS FILHO, 2005).

A severidade ou a intensidade dos danos dependem da suscetibilidade do hospedeiro, virulência do patógeno e das condições de ambiente. Em relação ao ambiente, condições de temperatura elevada e alta umidade de casa-de-vegetação aliadas à condição fisiológica de estacas de eucalipto, ou das sementes de diversas culturas, podem ocasionar perdas severas de

mudas durante o enraizamento (SILVEIRA *et al.*, 2003), sendo este tipo de ambiente, muito comum em estufas de produção de mudas de tomate, favorecendo o processo de infecção e colonização por *Rhizoctonia* sp..

A densidade de inóculo é outro fator que pode influenciar nos resultados de severidade do tombamento, sendo um dos aspectos importantes a serem delineados antes da realização de testes e avaliações de métodos de controle (ANDRADE *et al.*, 2005; GOULART, 2007), pois há grande variabilidade de respostas, variações estas dependentes da cultivar e do isolado de *Rhizoctonia* a ser testado. Goulart (2007) relata para algodão, redução na percentagem de emergência e aumento na percentagem de tombamento com o aumento da densidade de inóculo do patógeno e variações quanto à resposta de cultivares. Estudos também demonstram variações quanto à severidade da doença em função do isolado de *Rhizoctonia* utilizado, decorrente, provavelmente, da grande variabilidade existente entre isolados (CASSIOLATO & MELO, 1994; NORONHA *et al.*, 1996; CASSIOLATO & SOUZA, 2000; ANDRADE *et al.*, 2005). Em geral, observa-se uma correlação positiva entre aumento da densidade de inóculo e o aumento da incidência de tombamento. No entanto, de acordo com o objetivo e situação, deve-se previamente testar e observar os resultados de diferentes densidades de inóculo.

Em testes que envolvam inoculação de solo ou substrato, o aumento na densidade de inóculo pode ocorrer devido à adição de nutrientes do próprio meio utilizado para crescimento do fungo como palha de arroz, arroz triturado, farelo de trigo, farelo de milho e farelo de mamona. Estes substratos podem suportar altos níveis de colonização por *Rhizoctonia* (SANFUENTES *et al.*, 2002). Este comportamento deve-se ao fato de *Rhizoctonia* spp. ser habitante do solo, colonizador primário de matéria orgânica, com capacidade de sobrevivência em restos de cultura. Ou seja, dependendo do material adicionado ao inóculo, o solo pode se tornar mais conducente à *Rhizoctonia*, aumentando a sua população e a taxa de colonização do hospedeiro, e conseqüentemente a intensidade da doença (SANNAZARO *et al.*, 2001).

O presente trabalho teve como objetivos selecionar e caracterizar isolados patogênicos de *Rhizoctonia* sp. e virulentos a sementes e plântulas do tomateiro, causadores de tombamento de mudas, e definir a melhor densidade de inóculo para testes de controle biológico em condições de casa-de-vegetação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no campo experimental do Setor de Horticultura e no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia, no Laboratório de Análise de Solos do Departamento de Solos, pertencentes ao Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e no Laboratório de Olericultura e casa-de-vegetação da PESAGRO-RIO, Estação Experimental de Seropédica.

2.1 Coleta e Caracterização de Isolados de *Rhizoctonia* sp.

Isolados de *Rhizoctonia* sp. foram coletados de terra aderida a tubérculos de batata, de mudas de alface e plantas de feijão apresentando mela ou tombamento, e de solo cultivado com olerícolas localizado no Setor de Horticultura do Instituto de Agronomia (UFRRJ). Fragmentos do tecido apresentando os sintomas foram submetidos à assepsia superficial com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 1% e em seguida depositados em placas de Petri contendo meio agar-água (15,0g de agar agar em 1,0L de água destilada) e incubados por dois dias. Após este período, amostras do micélio desenvolvidos foram repicados para placas de Petri contendo o meio BDA (200mL de calda de batata, 20,0g de dextrose, 15,0g de agar agar e adição de água destilada até completar 1,0L) acrescido de pentabiótico em pó (uma pitada). Em seguida, as culturas foram incubadas a 25° C por três dias, seguido de repicagem para tubos de ensaio contendo meio inclinado BDA com pentabiótico para armazenamento em temperatura ambiente sob imersão em óleo mineral.

Os isolados foram conservados em placas com meio BDA em geladeira e em tubos de ensaio com meio inclinado BDA e pentabiótico mantido em temperatura ambiente.

A identificação de *Rhizoctonia* a nível de gênero foi feita por meio de observações em microscópio óptico tendo como a base a descrição de Ogoshi (1987) e caracterização dos isolados por meio de teste de coloração de núcleos (BANDONI, 1979; YAMAMOTO & UCHIDA, 1982; KRONLAND & STANGHELLINI, 1988).

2.2 Teste Inicial de Patogenicidade de *Rhizoctonia* spp. em Mudanças de Tomateiro

Seis isolados de *Rhizoctonia* spp., RhB (isolado de alface), RhC (isolado de feijão), RhD, RhE, RhF e RhG (isolados de batata), foram testados quanto a sua patogenicidade ao tomateiro. Para isto foram reavivados, verificados quanto a pureza e cultivados em meio BDA para posterior infestação do substrato, conforme DHINGRA & SINCLAIR (2000).

O teste foi realizado em duas condições distintas de ambiente, sob condições de câmara úmida e sem câmara úmida, utilizando-se dois tipos de substratos comerciais (Plantmax[®] e Tropstrato[®]) para produção de mudas de hortaliças. A testemunha consistiu de infestação do substrato somente com água destilada.

Adotou-se o delineamento de blocos ao acaso em esquema fatorial 7 x 2 x 2, com quatro repetições. Cada parcela foi constituída por uma bandeja de alumínio de 22x15x5 cm, com 100 sementes cada.

A infestação do substrato foi feita pela adição de suspensão de micélio dos isolados de *Rhizoctonia* sp. a serem testados por meio de rega. O inóculo de cada um dos isolados foi produzido em placas de Petri (80 x 100 mm) contendo meio de cultura BDA, e incubado em câmara B.O.D., regulada para 25° C, sob regime escuro. Após cinco dias de crescimento, foram triturados em água destilada com auxílio de triturador manual (esterilizado em água em ponto de fervura por 10 min.), na proporção de 2 placas/ 2 L de água destilada. Volume de 250mL do material triturado foi distribuído em cada bandeja, obtendo-se completo molhamento do substrato com as suspensões de micélios. O tratamento testemunha consistiu de rega somente com água destilada.

Após a adição do inóculo às bandejas de alumínio contendo substrato, efetuou-se o semeio de 100 sementes de tomate por bandeja, cultivar Santa Clara Miss Brasil lote 13424, sem tratamento prévio com fungicida e poder germinativo igual a 50%, em cinco fileiras de 20 sementes. Para formação de ambiente com câmara úmida, as bandejas foram cobertas com saco plástico transparente com pequenas perfurações para permitir a troca de gases.

Foi feito acompanhamento diário das temperaturas máxima e mínima, e informações sobre a umidade relativa do ar foram obtidas por meio da Estação Experimental de Seropédica da PESAGRO_RIO.

A partir do semeio, realizaram-se observações diárias visando identificar o início da emergência e do aparecimento de mudas com sintomas de podridão e/ou tombamento.

Para confirmação da presença dos isolados de *Rhizoctonia*, as mudas lesionadas foram coletadas e transferidas para placas de Petri esterilizadas, e analisadas individualmente por meio de observações em microscópio estereoscópico e óptico. Inicialmente, as amostras de plântulas e mudas foram submetidas a procedimento de limpeza superficial em água corrente para retirada de restos de substrato, desinfestação com hipoclorito de sódio a 0,5% seguido de lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Após o processo de limpeza as mudas foram depositadas em placas de Petri contendo ágar-água. A partir do crescimento micelial no meio ágar-água, foi feito reisolamento em meio BDA seguido de incubação em B.O.D., a 25°C, no escuro. Após três dias de incubação foram montadas lâminas com amostras de micélios e hifas para observação em microscópio estereoscópico e óptico para confirmação da presença do patógeno.

A virulência dos isolados foi avaliada tendo como base o efeito dos mesmos sobre (i) a velocidade de emergência, medida de acordo com a porcentagem de plântulas emergidas aos cinco dias, (ii) sobre a porcentagem de emergência avaliada aos 14 dias e (iii) sobre a porcentagem de mudas com tombamento, contagem acumulada até os 14 dias. Os dados, expressos em porcentagem de emergência e tombamento, foram transformados em $(x+1)^{1/2}$, submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5%.

2.3 Determinação da Concentração Mínima de Inóculo de *Rhizoctonia* sp. para Indução de Tombamento em Mudas de Tomateiro

A quantidade mínima de inóculo necessária para indução de tombamento pós-emergência de mudas do tomateiro foi determinada conforme metodologia descrita por SCHIPERS & GAMS (1979) e DHINGRA & SINCLAIR (2000). Utilizou-se como inóculo micélio de *Rhizoctonia* sem veículo de crescimento ou base alimentar, excluindo esta variável, uma vez que a incorporação de *Rhizoctonia* por um destes meios poderia favorecer o patógeno (BAILEY & GILLIGAN, 1997).

Foram testadas quatro concentrações de inóculo de *Rhizoctonia*, mais um tratamento testemunha, ou seja, 0,0; 0,5; 1,0; 2,5; e 5,0 g de micélio.L⁻¹ de água destilada. O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. Utilizou-se o isolado RhB de *Rhizoctonia*, obtido de mudas de alface, e sementes da cultivar Santa Clara Miss Brasil, procedente de lote com 90% de germinação e sem qualquer tratamento com fungicida, doado pela empresa Agristar.

O fungo foi crescido em meio BDA com pentabiótico, por três dias, a 25 °C. Em seguida, retiraram-se discos de micélio da borda das colônias que foram adicionados a frascos de erlenmeyer contendo 200 mL de meio líquido batata-dextrose (200 mL de calda do cozimento de 200 g de batata e 20 g de dextrose para 1000 mL de água destilada). Os frascos foram acondicionados em BOD e o meio contendo os discos de micélio ficou incubado por 10 dias a 27 °C, no escuro. O micélio formado na superfície do meio líquido foi retirado por filtração em funil de Büchner, com auxílio de bomba de vácuo e papel filtro, e posto para secar em papel toalha por cerca de dez minutos. Após a secagem, o micélio foi pesado e

triturado com auxílio de triturador manual esterilizado, nas concentrações de 5,0, 2,5, 1,0 e 0,5g por L de água destilada. Para o tratamento testemunha utilizou-se apenas água destilada.

A inoculação de *Rhizoctonia* foi feita pela adição de 250 mL da suspensão micelial sobre o substrato contido em bandejas plásticas de polipropileno preto de 200 células, nas dimensões 30,8 x 30,8 x 43,0 mm e conteúdo de 18mL de substrato Plantmax[®].célula⁻¹. As concentrações 5,0, 2,5, 1,0 e 0,5 g.L⁻¹ apresentaram respectivamente as concentrações de 347,0, 173,0, 69,0 e 34,0 mg de micélio.L⁻¹ de substrato. A semeadura foi feita logo após a inoculação utilizando-se uma semente por célula e as bandejas mantidas em condições de casa-de-vegetação.

A avaliação foi feita pela determinação da porcentagem de plântulas emergidas aos cinco dias, e da porcentagem de emergência e de tombamento de mudas ao final de 28 dias após semeadura. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5%.

2.4 Avaliação Comparativa da Virulência dos Isolados de *Rhizoctonia* sp. ao Tomateiro

Seis isolados de *Rhizoctonia* sp., preservados em tubos contendo meio BDA imerso em óleo mineral, foram postos para crescer e inoculados no substrato e, posteriormente, reisolados das mudas de tomateiro com sintomas de tombamento.

No primeiro ensaio, compararam-se seis isolados de *Rhizoctonia* spp., quanto à virulência a duas cultivares de tomate, ‘Santa Clara Miss Brasil’ (90% de germinação), e ‘Garrafinha Vermelho’ (90% de germinação). As sementes da primeira cultivar foram doadas por empresa de sementes, sem qualquer tratamento com fungicida, e as sementes da segunda cultivar foram doadas pela Estação Experimental de Seropédica da PESAGRO-RIO, obtidas de sistema orgânico de produção. Utilizou-se o substrato comercial Plantmax[®], o mesmo procedimento de infestação do substrato descrito no item 2.2 e bandejas de alumínio de 22x15x5 cm. O semeio foi feito logo em seguida distribuindo-se 100 sementes de cada cultivar por bandeja (em cinco fileiras de 20 sementes cada). As avaliações de emergência foram feitas aos 4, 5, 6, 7 e 8 dias após o semeio (DAS), e de tombamento pós-emergência diariamente até 14 DAS. A confirmação da presença e identificação do patógeno sobre as mudas tombadas foram feitas conforme descrito no item 2.2. Adotou-se o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições em esquema fatorial 7 x 2, sete tratamentos (seis isolados de *Rhizoctonia* e uma testemunha) e duas cultivares de tomate.

Para o segundo ensaio os mesmos seis isolados foram testados quanto à virulência à cultivar Santa Clara Miss Brasil, com sementes apresentando poder germinativo em torno de 50% (lote 13424), sob as mesmas condições de bandeja, substrato e de infestação do substrato descritos para o primeiro ensaio, porém distribuindo-se 200 sementes por bandeja.

Foram feitas avaliações para a porcentagem de emergência aos 20 dias e de tombamento pós-emergência até os 20 dias após o semeio e a confirmação da presença e identificação do patógeno conforme descrito no item 2.2 deste capítulo. O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições e sete tratamentos (seis isolados de *Rhizoctonia* e uma testemunha). Os dados, expressos em porcentagem de emergência e tombamento, foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Coleta de Isolados de *Rhizoctonia* sp.

Seis isolados de *Rhizoctonia* sp., foram coletados e classificados conforme o material de origem: isolado de alface (RhB), isolado de feijão (RhC) e isolados de batata (RhD, RhE, RhF e RhG).

De acordo com o teste de coloração de núcleos, todos os isolados de *Rhizoctonia* sp. apresentaram micélio com células vegetativas multinucleadas, sendo o número de núcleos quantificado, apresentando o seguinte resultado: RhB = 3 núcleos, RhC = 7 núcleos, RhD = 3 a 5 núcleos, RhE = 7 núcleos, RhF = 7 núcleos, e RhG = 5 a 7 núcleos. Com base neste resultados e na descrição de Ogoshi (1987), os isolados foram classificados com sendo de *Rhizoctonia solani*.

Quadro 1: Resumo contendo a identificação dos isolados de *Rhizoctonia* spp., material vegetativo de origem e número de núcleos observados na célula micelial.

Identificação do isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Material vegetativo de origem	Nº de núcleos observados *
RhB	Alface	3
RhC	Feijão	7
RhD	Batata	3 a 5
RhE	Batata	7
RhF	Batata	7
RhG	Batata	5 a 7

* Observações realizadas em microscópio ótico após coloração de núcleos conforme Yamamoto & Uchida (1982) e Bandoni (1979).

3.2 Teste Inicial de Patogenicidade de *Rhizoctonia* em Mudanças de Tomateiro

Neste estudo, testou-se a patogenicidade dos isolados de *Rhizoctonia solani* ao tomateiro visando estudos posteriores de controle biológico.

As mudas começaram a emergir ao quinto dia após a semeadura, e os primeiros sintomas de tombamento, ou mela, observados aos nove dias. Ainda assim, esta característica visual é também comum a doenças ocasionadas por outros patógenos de solo como *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., e *Pythium* spp., ocasionando também tombamento na pré e pós-emergência. Nos isolamentos e observações em microscópio a presença de *Rhizoctonia* foi confirmada em todas as amostras sintomáticas.

Sobre a porcentagem de emergência das mudas aos cinco e 14 dias após o semeio observou-se efeito de ambiente. Observou-se, ainda, efeito de isolado de *Rhizoctonia* e de ambiente sobre a porcentagem de tombamento em pós-emergência das mudas, além de efeito da interação isolado x ambiente. Neste ensaio, os isolados de *Rhizoctonia* não interferiram na porcentagem de emergência das mudas, apenas de tombamento.

O tratamento com câmara úmida afetou negativamente a emergência (Tabela 1), e no tratamento sem câmara úmida, a emergência foi próxima à porcentagem de germinação da semente utilizada, 50% (Tabela 1). No período que vai da semeadura até a emergência da plântula, os fatores ambientais mais importantes envolvidos são a temperatura, umidade e aeração ao redor da semente, considerados essenciais para o desempenho destas, exercendo influência direta sobre a germinação (MARCOS FILHO, 2005). Na condição de ambiente com câmara úmida, observou-se excesso de umidade acumulada no substrato e, conseqüentemente, redução dos níveis de oxigênio, que associada às altas temperaturas registradas no período de realização do ensaio, com mínimas de 22° C e máximas de 40 °C,

afetaram negativamente o processo de germinação das sementes. Para a germinação de sementes de tomate, a temperatura ótima varia entre 16 e 29° C (GIORDANO & SILVA, 2000; MARCOS FILHO, 2005).

Tabela 1: Efeito do ambiente sobre a porcentagem de emergência de plântulas de tomateiro cultivar Santa Clara Miss Brasil aos 5 e 14 dias após semeadura (DAS), em bandejas de alumínio, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Ambiente	Emergência (%)	
	5 DAS	14 DAS
Com câmara úmida	4,46 b	29,35 b
Sem câmara úmida	8,48 a	43,37 a
CV (%)	55,10	31,01

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Médias provenientes de 56 repetições.

Para uma adequada avaliação do efeito dos isolados de *Rhizoctonia*, as condições não devem ser restritivas à germinação e à emergência. Em sementes com baixo poder germinativo, como as utilizadas neste ensaio, ocorre uma maior liberação de exsudados (MARCOS FILHO, 2005) que podem favorecer o estabelecimento de patógenos como *Rhizoctonia*. A ação deste fitopatógeno também poderia ser medida pela porcentagem de sementes mortas ou que não germinaram ou, de plântulas que não emergiram devido aos efeitos do patógeno na fase de pré-emergência (AGRIOS, 2005; SCHIPPERS & GAMS, 1979). Porém, no presente caso, nas condições de câmara úmida, a baixa porcentagem de emergência deveram-se mais às condições do ambiente ao redor das sementes, associado à sua baixa qualidade fisiológica do que à ação do patógeno.

O efeito da interação isolado de *Rhizoctonia* x ambiente sobre a ocorrência de tombamento pode ser melhor discriminado no tratamento sem câmara úmida, onde detectaram-se diferenças entre os isolados de *Rhizoctonia*, com destaque para o isolado RhB que promoveu significativamente maior porcentagem de tombamento comparado aos demais (Tabela 2). No ambiente com câmara úmida não ocorreu tombamento pós-emergência das mudas em função da maior dispersão espacial das mudas ocasionado pela baixa germinação das sementes, e provável efeito negativo de alta umidade sobre o próprio patógeno.

Tabela 2: Efeito dos isolados de *Rhizoctonia* e do ambiente sobre a porcentagem de tombamento de mudas de tomateiro cultivar Santa Clara Miss Brasil até os 14 dias, em bandejas de alumínio, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Mudas tombadas (%)	
	Ambiente	
	Com câmara úmida	Sem câmara úmida
RhB	0,00 aB	8,83 aA
RhC	0,00 aA	0,43 bA
RhD	0,00 aA	1,56 bA
RhE	0,00 aA	1,29 bA
RhF	0,00 aA	0,25 bA
RhG	0,00 aA	0,37 bA
Testemunha	0,00 aA	0,00 bA
C.V%	38,10	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Médias provenientes de 4 repetições.

Pelos resultados observados, para as variáveis de emergência e tombamento, o ambiente sem câmara úmida foi o mais adequado para condução do ensaio, sendo que o isolado que ocasionou maior tombamento de mudas foi o isolado RhB, obtido de mudas de alface.

3.3 Determinação da Concentração Mínima de Inóculo de *Rhizoctonia* sp. para Indução de Tombamento em Mudanças de Tomateiro

A determinação da concentração de inóculo foi feita com base na avaliação da emergência de plântulas aos cinco e 28 dias e na porcentagem de mudas com tombamento aos 28 dias.

Observou-se efeito significativo da concentração de inóculo de *Rhizoctonia* sobre a porcentagem de emergência das plântulas aos cinco dias e de mudas tombadas aos 28 dias, e nenhum efeito da concentração de inóculo sobre a emergência final das mudas aos 28 dias (Tabela 3).

Os resultados desta avaliação indicam que a partir de 34,0 mg de micélio.L⁻¹ de substrato ocorrem interferências negativas sobre a emergência aos cinco dias e tombamento de mudas até os 28 dias, com efeito mais acentuado a partir de 173,0 mg de micélio.L⁻¹ de substrato (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito da concentração de inóculo de isolado de *Rhizoctonia* RhB sobre a porcentagem de emergência aos cinco dias, emergência final e tombamento de mudas de tomateiro cultivar Santa Clara Miss Brasil aos 28 dias, em bandejas de polipropileno, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Concentração de <i>Rhizoctonia</i> (mg de micélio.L ⁻¹ de substrato)	Emergência (%)		Tombamento (%)
	5 dias	28 dias	28 dias
347,0	0,81 b	82,6 a	12,0 a
173,0	0,06 b	87,5 a	13,0 a
69,0	0,00 b	82,3 a	7,0 a
34,0	1,13 b	80,6 a	4,0 a
0,0 (Testemunha)	17,25 a	83,3 a	0,0 b
C.V.%	29,56	4,57	32,62

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 4 repetições.

Ainda, observou-se como tendência o aumento da porcentagem de tombamento com o aumento da concentração de inóculo do isolado RhB, com o ponto de máximo tombamento, próximo a 15%, a 277,6 mg de micélio.L⁻¹ de substrato, entre os valores de 173,0 e 347,0 mg de micélio testados (Figura 1).

Ressalva seja feita que esta concentração de inóculo foi determinada especificamente para este isolado e em tomateiro. Sabe-se que a densidade adequada de inóculo pode variar muito em função do isolado, da cultura em teste e das condições de realização do ensaio.

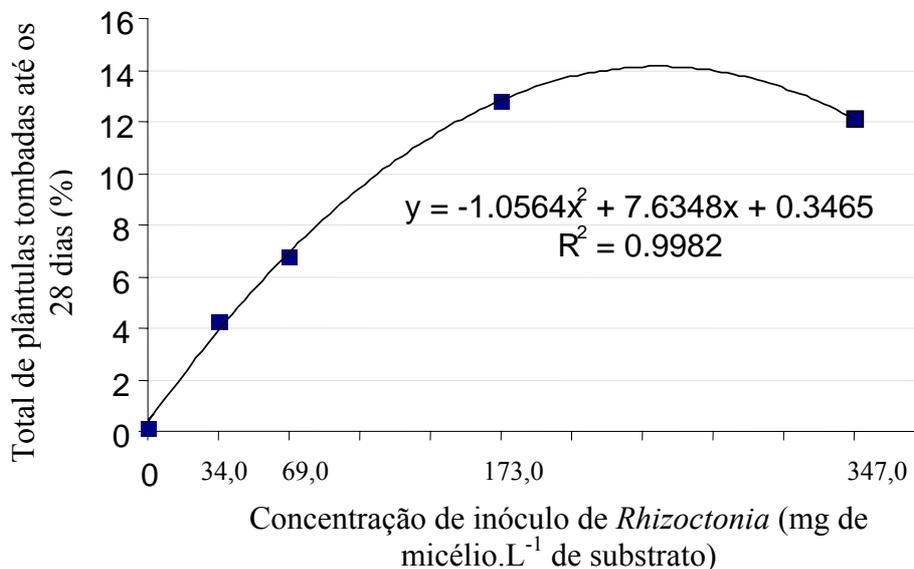


Figura 1: Percentual de plântulas tombadas em relação à concentração de inóculo de *Rhizoctonia* RhB, em mg de micélio.L⁻¹ de substrato. Seropédica, 2006.

O aumento da densidade de inóculo de *Rhizoctonia* RhB influenciou significativamente a incidência do tombamento. Este resultado coincide com os obtidos por outras pesquisas com este agente patogênico, utilizando diferentes quantidades de inóculo e culturas hospedeiras (ANDRADE *et al.*, 2005; CASSIOLATO & MELO, 1994; NORONHA *et al.*, 1996; SANFUENTES *et al.*, 2002). Andrade *et al.* (2005), utilizando arroz descascado autoclavado como substrato veículo de *R. solani*, adicionaram inóculo do patógeno em solo previamente esterilizado, nas densidades de 5, 10, 25, 50, 100, 150 e 200 mg de substrato colonizado/kg de solo, e observaram que, com o aumento da densidade de inóculo de *R. solani* houve aumento significativo na severidade da rizoctoniose do meloeiro, e concluíram que a densidade de 50 mg de substrato colonizado/kg de solo foi a mais adequada, permitindo nível de 58% de severidade da doença. Noronha *et al.* (1995), em sementes de caupi, trabalhando com quatro isolados de *R. solani* obtidos de feijão, caupi e algodão, em concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg de substrato colonizado/kg de solo, observaram também que a intensidade da doença aumentou proporcionalmente com o incremento das concentrações do inóculo do fitopatógeno no solo, e utilizaram 50 mg de substrato colonizado/kg de solo que apresentou em torno de 50% de intensidade de doença. Noronha *et al.* (1996) trabalhando com sementes de feijão semeadas em solo previamente infestado com arroz descascado autoclavado colonizado com *R. solani* nas densidades de 50, 150 e 300 mg/kg de solo, obtiveram aumento da severidade da doença proporcional ao incremento do inóculo de *R. solani*. Observa-se com os resultados obtidos por estes autores, que a escolha de densidade foi baseado principalmente pela intensidade de ocorrência da doença, em torno de 50%. No presente ensaio, ocorreu máximo de 15% de tombamento de mudas.

Optou-se por utilizar a concentração de 277,6 mg de micélio de *Rhizoctonia*.L⁻¹ de substrato, por questões de ordem prática, considerando que o valor está bem próximo do ponto ótimo de concentração para ocasionar tombamento.

3.4 Avaliação Comparativa da Virulência de Isolados *Rhizoctonia* spp. ao Tomateiro

No primeiro ensaio, quando foram testadas duas cultivares de tomateiro, Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, observou-se efeito altamente significativo dos isolados de *Rhizoctonia* sobre a emergência das plântulas no 4º dia após semeadura, e efeito de interação cultivar x isolado de *Rhizoctonia*, do quinto aos oitavo dia após o semeio. Quanto ao tombamento pós-emergência, observou-se efeito significativo de isolados de *Rhizoctonia* e de cultivar até os 14 dias após o semeio e ausência de efeito de interação.

Como o semeio foi realizado logo após a infestação do substrato com suspensão de micélio de *Rhizoctonia*, o processo de embebição das sementes iniciou-se logo após o semeio assim como o possível contato do patógeno com as sementes e a região das espermosfera devido a liberação de exsudados (BAILEY & GILLIGAN, 1997; MARCOS FILHO, 2005).

Na avaliação de emergência, feita aos quatro dias após semeadura, quando as primeiras plântulas de tomateiro emergiram na superfície do substrato, pode-se observar efeito benéfico de todos os isolados de *Rhizoctonia* sobre o processo de germinação das sementes, e nenhum efeito de tombamento pré-emergência dos isolados (Tabela 4), indicando que não houve efeito deletério dos isolados nesta fase inicial das plântulas, o que não permitiu separação do isolado mais virulento por esta variável.

Tabela 4: Efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp. sobre a emergência aos quatro dias após semeadura (DAS), em cultivares de tomateiro Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, semeados em bandejas de alumínio, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Emergência (%)
	4 DAS
RhB	2,93 a
RhC	2,55 a
RhD	2,55 a
RhE	2,34 a
RhF	1,70 ab
RhG	1,60 ab
Testemunha	0,12 b
C.V.(%)	27,74

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 8 repetições.

Nas avaliações realizadas aos cinco e seis dias após semeadura, observou-se, em geral, efeito positivo dos isolados de *Rhizoctonia* sobre o tempo de emergência das plântulas em relação à testemunha, principalmente RhB, RhC, RhD e RhF nas duas cultivares (Tabela 5). Este resultado deve-se, provavelmente, à liberação de enzimas pelo patógeno durante o seu desenvolvimento no substrato que podem ter favorecido o processo de embebição e, conseqüentemente, acelerado o processo de germinação e emergência. Cassiolato e Souza (2000) relatam que isolados de *Rhizoctonia* spp. podem liberar produtos da degradação da pectina da parede celular das plantas e enzimas pectinolíticas, evento que poderia favorecer o processo de germinação das sementes de tomate. MUSLIM *et al.* (2003) ao avaliar quatro isolados hipovirulentos de *Rhizoctonia* binucleada em condições de casa-de-vegetação, constaram que três deles promoviam o crescimento da mudas de tomate por aumentar a massa fresca de folhas e caule. O estímulo à germinação também pode ter sido ocasionado pela adição da suspensão de micélio no substrato, que foi feita junto com o meio de cultura

utilizado para o crescimento do fungo no laboratório, tendo cofatores como micronutrientes e compostos orgânicos influenciando a emergência das plântulas.

O isolado de *Rhizoctonia* RhE dentro da cultivar Santa Clara foi, em geral, o que apresentou os menores percentuais de emergência ao longo dos oito primeiros dias, menor que o da própria testemunha (Tabela 5). O isolado RhG por sua vez, apresentou comportamento semelhante ao RhE, porém, dentro da cultivar Garrafinha Vermelho, indicando efeito de interação entre os isolados e as cultivares.

Tabela 5: Efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp. sobre a emergência aos 5, 6, 7 e 8 dias após semeadura (DAS), em cultivares de tomate Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, semeados em bandejas de alumínio dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Emergência aos 5 DAS (%)	
	Santa Clara	Garrafinha Vermelho
RhB	80,82 aA	86,24 aA
RhC	71,31 abA	78,41 aA
RhD	70,84 abA	83,54 aA
RhE	52,50 abB	87,72 aA
RhF	71,07 abA	70,60 abA
RhG	56,00 abA	45,80 bA
Testemunha	40,31 bB	68,18 abA
Cultivar de tomate		
Santa Clara	63,26 b	
Garrafinha Vermelho	74,36 a	
C.V.(%)	11,54	
Isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Emergência aos 6 DAS (%)	
	Santa Clara	Garrafinha Vermelho
RhB	93,25 abA	96,41 aA
RhC	92,39 abA	90,58 aA
RhD	97,40 aA	93,91 aA
RhE	74,50 bcB	95,78 aA
RhF	89,45 abcA	82,73 abA
RhG	78,50 abcA	68,57 bA
Testemunha	67,80 cB	88,75 abA
C.V.(%)	5,91	
Isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Emergência aos 7 DAS (%)	
	Santa Clara	Garrafinha Vermelho
RhB	96,01 aA	98,60 aA
RhC	96,79 aA	96,50 aA
RhD	98,82 aA	98,59 aA
RhE	82,00 a B	97,25 aA
RhF	96,60 aA	88,63 abA
RhG	87,50 aA	76,25 bB
Testemunha	86,52 aA	94,05 aA
C.V.(%)	4,74	
Isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Emergência aos 8 DAS (%)	
	Santa Clara	Garrafinha Vermelho
RhB	98,75 abA	99,50 aA
RhC	99,25 abA	100,00 aA
RhD	100,00 aA	100,00 aA
RhE	84,00 bB	97,75 aA
RhF	99,75 abA	91,00 abA
RhG	93,25 abA	79,00 bB
Testemunha	93,25 abA	95,25 aA
C.V.(%)	4,08	

Letras maiúsculas iguais na mesma linha e minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 4 repetições.

Na avaliação para a incidência de tombamento nas mudas, realizada aos 14 dias após o semeio, observou-se efeito significativo de isolado de *Rhizoctonia* e de cultivar. Os isolados RhB, RhE e RhC foram os que se mostraram mais virulentos, apresentando respectivamente 13,49%, 11,05% e 8,27% de mudas tombadas. Comparando as duas cultivares, observou-se que Santa Clara foi mais suscetível, tendo apresentado maior percentual de mudas tombadas que ‘Garrafinha Vermelho’ (Tabela 6). Cassiolo e Melo (1994) avaliando diferentes isolados de *Rhizoctonia*, obtidos de tomate, berinjela e pimentão e cultivares comerciais de tomate, constataram diferenças quanto à agressividade dos isolados e nenhuma diferença entre as cultivares quanto à resistência. Observaram, porém, diferenças entre diferentes linhagens e genótipos silvestres quanto à resistência ao patógeno, mas nenhuma interação significativa entre isolado de *Rhizoctonia* e os genótipos de tomate testados. O genótipo ‘Garrafinha Vermelho’ utilizado no presente ensaio, é uma variedade pouco trabalhada, cultivada por produtores orgânicos, podendo posteriormente ser melhor avaliada quanto à sua resistência ao patógeno. Andrade *et al.* (2005) testando dez isolados de *Rhizoctonia solani* obtidos de diferentes patossistemas, observaram que todos foram capazes de causar doença em meloeiro, independente do hospedeiro de origem, demonstrando a grande flexibilidade deste patógeno, ocasionando além disso, diferentes níveis de severidade.

Tabela 6: Efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp. sobre o tombamento até os 14 dias, em cultivares de tomate Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, semeados em bandejas de alumínio dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Isolado de <i>Rhizoctonia</i> ^{*1}	Tombamento (%)
RhB	13,49 a
RhC	8,27 ab
RhD	0,83 c
RhE	11,05 a
RhF	0,75 c
RhG	3,34 bc
Testemunha	0,00 c
Cultivar de tomate ^{*2}	
Santa Clara	7,71 a
Garrafinha Vermelho	3,07 b
C.V.(%)	34,67

Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ^{*1} Média de 8 repetições. ^{*2} Média de 28 repetições.

No segundo ensaio, na avaliação da virulência dos isolados de *Rhizoctonia*, utilizou-se o mesmo lote de sementes do teste de patogenicidade (item 2.2 deste capítulo), sementes da cultivar Santa Clara Miss Brasil com baixo vigor e germinação, cerca de 50%, tendo sido observado efeito significativo de tratamento, composto pelos isolados mais a testemunha, sobre a porcentagem de emergência e de tombamento, avaliados aos 20 dias.

Maior porcentagem de emergência foi observado nos tratamentos testemunha e com os isolados RhF, RhD e RhC, com 37,25, 37,12, e 36,00% de emergência, seguido de RhB, e RhE, e menor porcentagem no tratamento RhG, com 18,50% de emergência de plântulas (Tabela 7). Ou seja, o tratamento testemunha, sem a presença de *Rhizoctonia*, apresentou maior taxa de emergência, próxima ao potencial germinativo das sementes, porém sem diferir significativamente dos tratamentos RhF, RhD e RhC, sugerindo que estes isolados não causaram danos às sementes na fase de pré-emergência. O tratamento com isolado RhG foi o

que apresentou o menor percentual de emergência, conseqüentemente, ocorreram maiores danos às sementes na fase de pré-emergência (Tabela 7).

Tabela 7: Efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp. sobre a emergência e o tombamento até os 20 dias após semeadura de cultivar de tomate Santa Clara Miss Brasil em bandejas de alumínio dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Emergência total (%)	Tombamento total (%)
RhB	29,37 ab	21,00 ab
RhC	36,00 a	22,00 a
RhD	37,12 a	9,00 bc
RhE	34,50 ab	23,00 a
RhF	37,25 a	0,00 c
RhG	18,50 b	7,00 c
Testemunha	43,12 a	0,00 c
C.V.(%)	11,36	21,63

Letras minúsculas seguidas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 4 repetições.

Quanto ao tombamento pós-emergência, maiores percentuais foram observados nos tratamentos com os isolados RhB, RhC e RhE, que apresentaram 21,0, 22,0 e 23,0% de tombamento de mudas, respectivamente, enquanto que os tratamentos com os isolados RhD, RhF e RhG, apesar de terem causado tombamento não diferiram estatisticamente da testemunha, que apresentou taxa igual a 0% (Tabela 7).

O isolado RhF, obtido de tubérculos de batata, não ocasionou tombamento nem alterou significativamente o percentual de emergência em relação à testemunha, apresentando comportamento semelhante ao do primeiro ensaio, indicando ser um isolado não patogênico ao tomate (Tabela 7).

Apesar dos isolados de *Rhizoctonia* terem sido preservados em tubos contendo meio BDA inclinado imerso em óleo, antes de cada ensaio, estes foram repicados e cultivados, e utilizados para infestação no substrato, seguido da semeadura, e posteriormente reisolados das mudas tombadas. É interessante observar que, ao longo dos ensaios, após sucessivas inoculações e reisolamentos a partir de mudas tombadas de tomateiro, houve um aumento gradual no percentual de tombamento pré ou pós emergência.

Além disso deve-se considerar que no segundo ensaio, as sementes apresentavam baixa qualidade fisiológica e os períodos de avaliação foram diferentes dos do primeiro ensaio.

Pela sequencia de testes de patogenicidade efetuados com os isolados de *Rhizoctonia* com sementes de tomateiro (Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6), pode-se concluir que o isolado RhG tem maior ação na fase de pré-emergência, os isolados RhB e RhE na fase de pós-emergência e isolado RhF baixa patogenicidade sobre as sementes e plântulas de tomateiro. O isolado RhB de *Rhizoctonia* foi o que apresentou resultados mais consistentes e constantes em relação ao tombamento pós-emergência, nos diferentes testes de patogenicidade e de virulência.

4 CONCLUSÕES

Ambiente caracterizado com solo com alta umidade, acima da capacidade de campo e temperatura acima de 35° C não foram adequados para testes com *Rhizoctonia* em condições de viveiro para sementes e mudas de tomate.

O isolado de *Rhizoctonia* RhB, obtido a partir de alface, ocasionou porcentagem de tombamento de plântulas e mudas de tomate, e resultados mais consistentes e constantes nos diferentes testes de patogenicidade.

Entre as concentrações testadas, aquela que resultou maiores taxas de tombamento, ocasionando danos na fase de pós-emergência foi de 277,6 mg de micélio.L⁻¹ de substrato.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5ª edição. USA: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- ANDRADE, D.E.G.T.; SILVA, C.F.B. da; SILVA, L.G.C. da; MICHEREFF, S.J.; SALES JÚNIOR, R.; ASSIS, T.C. de. Influência da densidade do inóculo e de isolados de *Rhizoctonia solani* na severidade da rizoctoniose do meloeiro. **Caatinga**, Mossoró, v.18, n. 3, jul/set, p. 164-168. 2005.
- BANDONI, R.J. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. **Mycologia**, v. 71, n. 4, p. 873-874. 1979.
- BAILEY, D.J.; GILLIGAN, C.A. Biological control of pathozone behaviour and disease dynamics of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma viride*. **New Phytologist**, Sheffield, UK, v. 136, p. 359-367. 1997.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Minnesota, v. 72, p. 379-382. 1982.
- CARLING, D.E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: SNEH, G.; JABAHI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control**. Kluwer Academic Publishers. 1996. p 37-47.
- CASSIOLATO, A.M.R.; MELO, I.S. de. Reação de resistência de genótipos de tomateiro (*Lycopersicum* spp.) à infecção por *Rhizoctonia solani* Kühn. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.51, n. 3, set/dez, p. 446-452. 1994.
- CASSIOLATO, A.M.R.; SOUZA, N.L. Controle biológico de *Rhizoctonia solani* por isolados de *Rhizoctonia* spp. não patogênicos ou hipovirulentos. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de. **Controle Biológico**. Jaquariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 388 p.
- DINGHRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Long-Term storage of plant pathogens. In: **Basic Plant Pathology Methods**. 2nd.edition. USA: Lewis Publishers. p.61-66. 2000.
- FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal – principais doenças florestais no Brasil**. 1ª edição. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.
- GIORDANO, L.B.; SILVA, J.B.C. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa/Hortaliças, 2000. 168 p.
- GOULART, A.C.P. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n. 4, jul-ago, p. 399-402. 2002.
- GOULART, A.C.P. Suscetibilidade de cultivares de algodoeiro a *Rhizoctonia solani* e benefícios do tratamento de sementes com fungicidas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 222-228. 2007.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE,

J.A.M. **Manual de Fitopatologia** – Doenças das plantas cultivadas. 3ª edição. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 776p.

KRONLAND, W.C.; STANGHELLINI, M.E. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Minnesota, v. 78, p. 820-822. 1988.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**, 1ª edição. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MUSLIM, A.; HORINOUCI, H.; HYAKUMACHI, M. Biological control of Fusarium wilt of tomato with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia* in greenhouse conditions. **Mycoscience** n.44, p.77–84. 2003.

NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n. 5, set/out, p. 505-508. 2006.

NORONHA, M.A.; ANTUNES SOBRINHO, S.; SILVEIRA, N.S.S.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R. de; MARANHÃO, E. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 22, p. 156-162. 1996.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 125-143. 1987.

SANFENTES, E.A.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; SILVEIRA, S.V.; PENCHEL, R.; SARTORIO, R. Supressão de atividade saprofítica de *Rhizoctonia* spp. em solos de jardim clonal de *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 27, p. 461-467. 2002.

SANNAZARO, A.M.; FENILLE, R.C.; SOUZA, N.L. Saprofitismo e patogenicidade de *Rhizoctonia solani* Kühn AG-4 em solo incorporado com farelo de mamona. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n. 5, p. 1211-1214. 2001.

SCHIPERS, B.; GAMS, W. **Soil Borne Plant Pathogens**. 4ª edição. Londres: Academic Press, 1979. 686p.

SILVEIRA, S.F.; ALFENAS, A.C. Análise de proteínas e isoenzimas de isolados de *Rhizoctonia* spp. patogênicos a *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n. 1, p. 33-41, 2002.

SILVEIRA, S.F.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; SUZUKI, M.S. Controle químico da mela de estacas de eucalipto, causadas por *Rhizoctonia* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 26, nov/dez. 2003.

YAMAMOTO, D.T.; UCHIDA, J.Y. Rapid nuclear staining of *Rhizoctonia solani* and related fungi with acridine orange and with safranin O. **Mycologia**, v. 74, n. 1, p. 145-149. 1982.

CAPÍTULO II

PAREAMENTO ENTRE CULTURAS DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani* e *Trichoderma* spp. *in vitro*

RESUMO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), com o objetivo de avaliar a ação antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp., previamente selecionados em condições de casa-de-vegetação, sobre isolados de *Rhizoctonia* spp. Os isolados de *Rhizoctonia* identificados como RhB, RhC, RhD, RhE, RhF e RhG, foram submetidos a testes de pareamento de cultura *in vitro* com cinco isolados de *Trichoderma* TENA1, TENA7, TENA16, TENA31 e TENA33. Discos de culturas das bordas de colônias em crescimento dos respectivos fungos foram colocados em placas de Petri contendo os meios de cultura a serem testados. Utilizaram-se dois meios de cultura BDA (pH 6,0) e BDA ácido (pH 4,0) ajustado pela adição de HCl 1M, culturas de *Trichoderma* com três dias de crescimento em BDA a 25 °C e de *Rhizoctonia* com três dias em BDA a 25° C. Em cada placa de Petri, foram colocados dois discos de micélio em posições opostas, um de isolado de *Rhizoctonia* e outro de *Trichoderma*, a uma distância de 70 mm um do outro e 10 mm da borda da placa. As placas foram incubadas em B.O.D. à temperatura de 25° C, em regime escuro, por período de 8 dias. Observou-se efeito dos isolados de *Trichoderme* sp. sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia* sp. assim como dos isolados de *Rhizoctonia* sobre os de *Trichoderma*. Os isolados TENA7, TENA31 e TENA33 de *Trichoderma*, em geral, reduziram o crescimento micelial da maioria dos isolados de *Rhizoctonia*, tanto em meio ácido quanto em meio neutro. O pH do meio de cultura não afetou o desempenho dos antagonistas testados.

Palavras-chave: antagonismo, controle biológico, fungos de solo.

ABSTRACT

The work was conducted at the Seed Pathology Laboratory, Department of Plant Science, Institute of Agronomy, Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ). This study aimed to evaluate the antagonistic action of *Trichoderma* spp., previously selected in greenhouse conditions, on *Rhizoctonia* spp. Isolates identified as *Rhizoctonia* RhB, RHC, RHD, RHE, RHF and RHG, were tested for pairing in vitro culture with five isolates of *Trichoderma* sp. TENA1, TENA7, TENA16, TENA31 and TENA33. Drives crop the edges of colonies growing from their molds were placed in Petri dishes containing culture media to be tested. Were used two culture media PDA (pH 6.0) and PDA acid (pH 4.0) adjusted by adding HCl 1M, cultures of *Trichoderma* and of *Rhizoctonia* with three days growth on PDA at 25 ° C. In each Petri dish were placed on two discs of mycelium in opposing positions, an isolate of *Rhizoctonia* and other *Trichoderma*, a distance of 70 mm apart and 10 mm from the edge of the dish. The plates were incubated in B.O.D. a temperature of 25 ° C, under dark for a period of 8 days. Observed an effect of *Trichoderma* sp. on mycelial growth of *Rhizoctonia* sp. as of *Rhizoctonia* on *Trichoderma*. The *Trichoderma* isolates TENA7, TENA31 and TENA33, in general, reduced the mycelial growth of most isolates of *Rhizoctonia*, as in acidic as in neutral culture. The pH of the culture did not affect the performance of the antagonists tested.

Keywords: antagonism, biological control, soil fungi.

1 INTRODUÇÃO

Testes de antagonismo *in vitro* são ferramentas importantes no processo de seleção de isolados de antagonistas pois fornecem informações úteis sobre a eficiência e a variabilidade de isolados de agentes de controle biológico e a suscetibilidade de patógenos aos respectivos agentes em condições controladas, minimizando o efeito de variáveis como temperatura, umidade e luz, e a microflora do solo e suprimento com uma base alimentar uniforme (BELL *et al.*, 1982). Estes testes também facilitam a observação das interações antagonista-fitopatógeno, a nível ultra-estrutural, com o auxílio da microscopia ótica ou eletrônica (MARIANO, 1993).

Os principais mecanismos de ação que podem ser avaliados *in vitro* são: competição por nutrientes, antibiose, produção de bacteriocinas e parasitismo. O biocontrole com uso de cepas de *Trichoderma* spp., através de mecanismos diretos de ação, resulta tanto da competição, na qual a demanda por nutrientes ou espaço excede o suprimento imediato (LUCON, 2000; BENITEZ *et al.*, 2004), como da habilidade de *Trichoderma* em produzir e/ou resistir a metabólitos que impedem germinação de esporos (fungistase), mata a célula (antibiose) ou modifica a rizosfera, por exemplo, pela acidificação do solo (BENITEZ *et al.*, 2004). O biocontrole pode também resultar de uma interação direta entre o próprio patógeno e o agente de biocontrole, mecanismo conhecido como micoparasitismo, no qual os nutrientes do patógeno são utilizados pelo agente de biocontrole (LUCON, 2000), e que envolve contato físico, e síntese de enzimas hidrolíticas, compostos tóxicos e/ou antibiose atuando sinergisticamente com as enzimas (BENITEZ *et al.*, 2004).

A grande maioria dos trabalhos publicados até o momento, em controle biológico de doenças de plantas, abrange uma seleção inicial realizada em laboratório, com fitopatógeno e antagonista em culturas puras, sem a presença do hospedeiro (MARIANO, 1993). Os testes *in vitro* podem ser avaliados por métodos qualitativos, geralmente realizados simultaneamente ao isolamento dos antagonistas com a finalidade de abreviar o processo de seleção, e quantitativos, onde após o isolamento de grande quantidade de microrganismos, estes são testados por pareamento em meio de ágar em placas (MARIANO, 1993). Dentre os métodos quantitativos utilizados em estudos de antagonismo *in vitro* tem-se os métodos do ágar em lâmina, do meio líquido e de ágar em placa, este último incluindo os métodos da cultura pareada, do papel celofane, da placa sobreposta, da camada dupla e do líquido metabólico (MARIANO, 1993; ALFENAS *et al.*, 2007). Estes métodos permitem avaliar a produção de metabólitos voláteis (MARTINS, 1988; MARIANO, 1993) e não voláteis de potenciais antagonistas, as respostas destes a diferentes pH e temperatura (LOBO JÚNIOR & SOBRAL, 2000), ocorrência de hiperparasitismo (LUCON, 2000; HOWELL, 2003), entre outros, sendo cada método mais adequado a cada objetivo inicialmente proposto.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp. previamente selecionados em condições de casa-de-vegetação sobre isolados de *Rhizoctonia* spp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

2.1 Pareamento Entre Culturas de Isolados de *Trichoderma* spp. e *Rhizoctonia solani* *in vitro*

Seis isolados de *Rhizoctonia*, RhB (obtido de muda de alface), RhC (obtido de muda de feijão), RhD, RhE, RhF e RhG (obtidos de tubérculos de batata), foram submetidos a testes de confrontação direta *in vitro* com cinco isolados pré-selecionados de *Trichoderma* sp. TENA1, TENA7 (obtidos de raiz de tomateiro), TENA16 (de madeira de pinho), TENA31 e TENA33 (de sementes de tomate), conforme metodologia usual (GEYPENS, 1977; BELL *et al.*, 1982; MICHEREFF *et al.*, 1993; MARTINS-CORDER & MELO, 1998; ETHUR *et al.*, 2005).

Utilizaram-se dois meios de cultura BDA (pH 6,0) e BDA ácido (pH 4,0) ajustado pela adição de HCl 1M, culturas de *Trichoderma* sp. e de *Rhizoctonia* com três dias de crescimento em BDA a 25 °C.

Para montagem dos testes, tomaram-se discos das bordas das colônias dos respectivos isolados, que foram colocados em placas de Petri contendo os meios de cultura a serem testados. Em cada placa de Petri, foram colocados dois discos de micélio em posições opostas e a uma distância de 70 mm um do outro e 10 mm da borda da placa, sendo sempre um de isolado patogênico de *Rhizoctonia* e outro de um dos isolados dos antagonistas a serem testados. As placas foram incubadas em B.O.D. à temperatura de 25° C, em regime escuro, por período de oito dias.

As medições de acompanhamento foram feitas aos 1, 2, 3, 4 e 8 dias após a montagem do teste medindo-se o raio das colônias com paquímetro manual digital e os dados expressos em mm. As medições foram feitas a partir do centro do disco de micélio original de *Trichoderma* ou de *Rhizoctonia*, em direção ao centro da placa, até o momento da junção das duas colônias, obtidos aos 4° e 8° dias (Figura 2).

Os valores de raio de crescimento no 8° dia foram submetidos aos critérios propostos por Bell *et al.* (1982) conforme a seguinte escala de notas: 1 (antagonista cresce por toda a placa de Petri), 2 (antagonista cresce sobre 2/3 da placa), 3 (antagonista e patógeno crescem até metade da placa), 4 (patógeno cresce sobre 2/3 da placa) e 5 (patógeno cresce por toda a placa de Petri).

Adotou-se o delineamento de blocos ao acaso em esquema fatorial 5 x 6 x 2, com quatro repetições. Os dados foram transformados em $(x+1)^{1/2}$ e submetidas ao teste de Tukey a 5%.

Os valores, em percentuais de crescimento dos respectivos pareamentos em placas obtidos no 8° dia, foram representados graficamente.

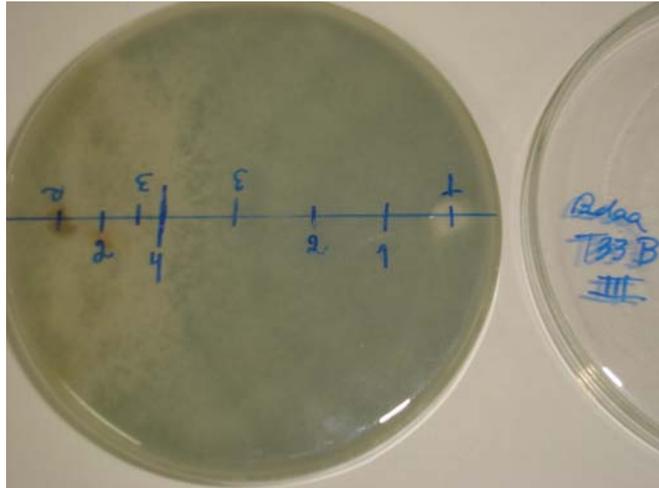


Figura 2: Pareamento de isolado de *Trichoderma* TENA33 (disco de micélio situado na porção direita) com *Rhizoctonia* RhB (disco de micélio situado na porção esquerda), no 8º dia. As marcações acompanham o raio de crescimento dos isolados aos 1, 2, 3 e 4 dias após incubação, quando então os micélios se encontraram. Seropédica, 2009.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Pareamento Entre Culturas de Isolados de *Trichoderma* spp. e *Rhizoctonia solani* *in vitro*

Na avaliação aos quatro e oito dias do crescimento das colônias dos fungos, observou-se efeito significativo de isolado de *Trichoderma*, de interações *Trichoderma* x *Rhizoctonia*, *Rhizoctonia* x meio de cultura e de interação tripla *Trichoderma* x *Rhizoctonia* x meio de cultura. Aos oito dias observou-se, adicionalmente, efeito simples de isolado de *Rhizoctonia* sobre o crescimento dos isolados de *Trichoderma* e de interação *Trichoderma* x meio de cultura.

Aos quatro dias, tanto no meio BDA como no BDA Ácido, observou-se em geral maior crescimento dos isolados TENA7, TENA31 e TENA33 que os isolados TENA1 e TENA16, quando pareados com a maioria dos isolados de *Rhizoctonia* (Tabela 8). Este resultado foi mantido na avaliação aos oito dias para a maioria dos pareamentos (Tabela 10). Geypens (1982) observou em experimento *in vitro* com *Trichoderma* e *Rhizoctonia*, que o pH do meio, a princípio, não influenciou o grau de inibição de *T. longibrachiatum*, mas *T. koningii* foi fortemente influenciado, apresentando maior atividade de antagonismo a um pH próximo de 5,2. Observou, ainda, que em meio mais rico (BDA + extrato de levedura) o efeito do pH não foi percebido até os níveis de 7,6 com quase 100% de inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*, e uma drástica diminuição na atividade antagonista a pH 8,8.

Tabela 8: Raio de crescimento (mm.disco⁻¹) de colônia de isolados de *Trichoderma* spp., pareados com isolados de *Rhizoctonia*, avaliado aos quatro dias após a montagem do teste em placas de Petri contendo meio BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.

Raio de crescimento da colônia de <i>Trichoderma</i> (mm.disco ⁻¹) 4º DIA						
Isolado de <i>Rhizoctonia</i>						
Meio BDA						
<i>Trichoderma</i>	RhB	RhC	RhD	RhE	RhF	RhG
TENA1	9,75 bAB	0,00 cB	9,25 cAB	19,25 bAB	9,75 bAB	23,25 bA*
TENA7	57,50 aA	67,75 aA	63,25 aA	54,75 aA	69,00 aA	60,50 aA
TENA16	9,75 bA	14,50 bcA*	21,25 bcA*	13,25 bA	13,25 bA	25,25 abA
TENA31	47,25 aA	49,50 aA	41,50 abA	44,75 aA	48,50 aA	39,25 abA
TENA33	52,75 aA	34,75 abA	45,75 abA	7,75 bB	52,00 aA*	46,00 abA
Meio BDA Ácido						
TENA1	18,50 bAB	25,50 aA*	12,75 bcAB	22,50 bcA	0,00 dB	8,75 bAB
TENA7	62,00 aA	62,25 aA	58,00 aA	62,00 aA	61,00 aA	45,00 aA
TENA16	15,25 bAB	1,75 bAB	0,00 cB	4,25 cAB	16,75 bcA	9,75 bAB
TENA31	37,55 abA	35,75 aA	38,50 aA	48,50 abA	39,25 abA	38,25 aA
TENA33	51,50 aA	55,50 aA*	33,00 abAB	38,75 abAB*	11,25 cdB	54,25 aA
C.V. (%)	28,66					

Letras maiúsculas iguais na mesma linha e minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. *As médias diferiram estatisticamente em relação ao meio de cultura. Média de 4 repetições.

Quando se analisa o crescimento das colônias de *Rhizoctonia*, observa-se também efeito simples e significativo dos isolados de *Trichoderma*, dos próprios isolados de *Rhizoctonia* e do meio de cultura bem como efeito de interação isolado de *Rhizoctonia* x meio de cultura aos quatro (Tabela 9) e oito dias (Tabela 10), e de interação isolado de *Trichoderma* e de *Rhizoctonia* aos oito dias da montagem do teste (Tabelas 11 e 12).

Tabela 9: Raio de crescimento (mm.disco⁻¹) de colônias de isolados de *Rhizoctonia* spp., pareados com isolados de *Trichoderma* spp., avaliado aos quatro dias após disposição de disco de micélio em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.

Isolado de <i>Trichoderma</i>	Raio de crescimento da colônia de <i>Rhizoctonia</i> (mm.disco ⁻¹)	
	4º DIA	
TENA1	9,27 b	
TENA7	6,31 b	
TENA16	18,20 a	
TENA31	9,08 b	
TENA33	11,85 ab	
Isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Meio de cultura	
	BDA	BDAA
RhB	19,05 abA	11,00 aA
RhC	7,35 cA	6,25 abA
RhD	16,30 abcA	12,90 aA
RhE	23,50 aA	5,50 abB
RhF	8,65 bcA	6,25 abA
RhG	14,00 abcA	0,60 bB
C.V. (%)	64,43	

Letras maiúsculas iguais na mesma linha e minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 48 repetições.

No 4º dia, embora se tenha observado diferenças no crescimento das colônias de *Rhizoctonia* em função dos isolados de *Trichoderma*, esta avaliação foi comprometida pela alta variabilidade observada no crescimento da colônia de *Rhizoctonia*. Nestas condições o maior crescimento dos isolados de *Rhizoctonia* ocorreu quando pareados com o isolado TENA16 (Tabela 9). Da mesma forma, embora tenham sido observadas diferenças significativas, a avaliação para o efeito da interação entre meio de cultura e isolado de *Rhizoctonia* também foi comprometido pela alta variabilidade (Tabela 9).

Tabela 10: Raio de crescimento (mm.disco⁻¹) de colônia de isolados de *Rhizoctonia* spp., em pareamento com isolados de *Trichoderma* spp., avaliado aos oito dias após disposição de discos de micélio em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.

Isolado de <i>Rhizoctonia</i>	Raio de crescimento da colônia de <i>Rhizoctonia</i> (mm.disco ⁻¹)	
	8º DIA	
	Meio de cultura	
	BDA	BDAA
RhB	29,90 ab	14,25 ab
RhC	13,35 c	8,80 ab
RhD	17,70 abc	23,45 a
RhE	36,15 a	10,40 ab
RhF	11,55 c	8,95 ab
RhG	17,25 bc	4,60 b
C.V. (%)	65,96	

Letras maiúsculas iguais na mesma linha e minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 20 repetições.

Este resultado, provavelmente, deve-se à grande variabilidade observada nos gêneros de *Trichoderma* e *Rhizoctonia* quando cultivados em meio de cultura, pois por se tratarem de

espécies diferentes, apresentam diferentes respostas de crescimento (ANDRADE *et al.*, 2005; BELL *et al.*, 1982; GEYPENS, 1977), e afetaram o crescimento um do outro. Isolados de *Trichoderma* são conhecidos por produzirem metabólitos voláteis e não voláteis, como acetaldeído e etanol sob influência de fatores nutricionais (GEYPENS, 1977), como pirona (CLAYDON *et al.*, 1987), entre outros antibióticos (HOWELL, 1982; PAPAVIDAS, 1985), que por sua vez são relatados como tendo ação inibidora e antagonista sobre diversos microrganismos (MELO, 1991).

Aos oito dias, pôde-se observar, em geral, menor crescimento das colônias dos isolados de *Rhizoctonia* quando pareados com os isolados de *Trichoderma* que apresentaram maior taxa de crescimento (Figura 3, Tabela 11 e Tabela 12 e Figura 4). O crescimento do isolado de *Rhizoctonia* foi afetado por um ou mais isolados de *Trichoderma*, indicando que isolados de *Trichoderma* podem ser efetivos contra isolado de espécie patogênica, nestas condições. Resultados semelhantes, principalmente com *Rhizoctonia*, foram obtidos por Bell *et al.* (1982) com teste de pareamento *in vitro* de diversos isolados de *Trichoderma* com fitopatógenos *Rhizoctonia solani* (AG1, 2, 3 e 4), *Sclerotium rolfsii*, *Ceratobasidium*, *Phytophthora* e *Pythium*.

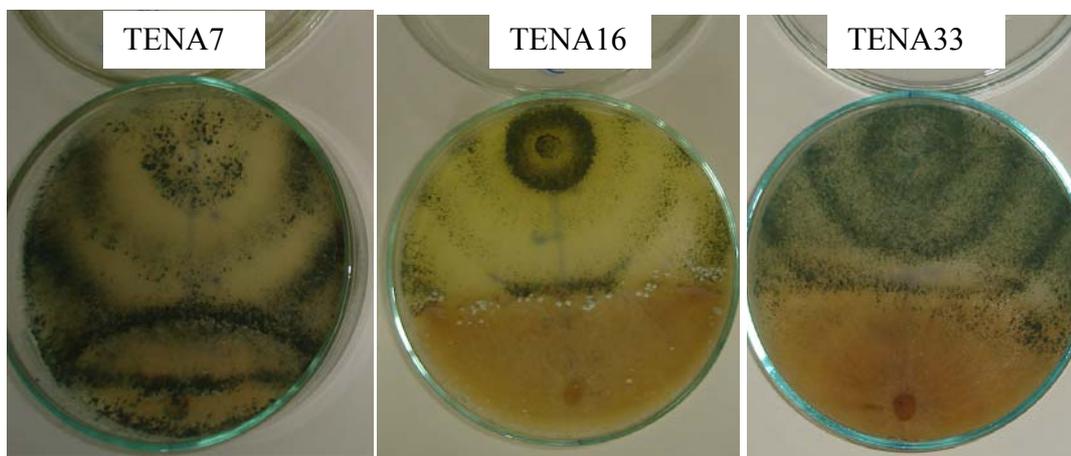


Figura 3 : Pareamento de isolados de *Trichoderma* (disco de micélio situado na porção superior) TENA7, TENA16 e TENA33, com *Rhizoctonia* RhB (disco de micélio situado na porção inferior), no 8º dia, demonstrando diferentes respostas de crescimento. Seropédica, 2009.

Tabela 11: Raio de crescimento (mm.disco⁻¹) de colônia de isolados de *Rhizoctonia* spp., pareados com isolados de *Trichoderma* spp., avaliado aos oito dias após disposição de discos de micélio em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.

Tratamento	Raio de crescimento da colônia de <i>Rhizoctonia</i> (mm.disco ⁻¹) 8º DIA					
	Isolado de <i>Rhizoctonia</i>					
	RhB	RhC	RhD	RhE	RhF	RhG
TENA1	34,50 aA	1,37 aB	17,25 bAB	15,25 bAB	2,50 bB	28,25 aA
TENA7	8,25 bA	3,25 aA	10,12 bA	10,37 bA	3,25 abA	2,62 bA
TENA16	30,87 abA	21,75 aA	47,25 aA	33,62 abA	25,87 aA	20,87 abA
TENA31	22,37 abA	13,00 aAB	8,87 bAB	13,87 abAB	10,00 abAB	0,00 bB
TENA33	14,37 abAB	16,00 aAB	19,37 abAB	43,25 aA	9,65 abB	2,87 bB
C.V. (%)	65,96					

Letras maiúsculas seguidas na mesma linha e letras minúsculas seguidas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 4 repetições.

Tabela 12: Raio de crescimento (mm.disco⁻¹) de colônia de isolados de *Trichoderma* spp., pareados com isolados de *Rhizoctonia* spp., avaliados aos oito dias após a montagem do teste em placas de Petri contendo meio BDA e BDA Ácido. Seropédica, 2008.

Raio de crescimento da colônia de <i>Trichoderma</i> (mm) 8° DIA						
Isolado de <i>Rhizoctonia</i>						
Meio BDA						
<i>Trichoderma</i>	RhB	RhC	RhD	RhE	RhF	RhG
TENA1	9,75 bA	0,00 cA	9,25 cA	29,00 abcA	12,75 bA	24,25 bA
TENA7	57,50 aA	68,75 aA	69,00 aA	64,00 aA	71,00 aA	71,00 aA
TENA16	9,75 bA	31,50 bcA	29,75 bcA	14,25 bcA	42,75 abA	42,00 abA
TENA31	51,25 aA	66,00 abA	57,50 abA	48,50 abA	59,50 aA	71,00 aA
TENA33	59,25 aA	46,75 abA	47,50 abA	8,00 cB	65,75 aA*	65,50 aA
Meio BDA Ácido						
TENA1	47,50 aAB*	68,50 aA*	25,50 b BC	46,50 abAB	0,00 cC	17,75 b BC
TENA7	67,50 aA	68,50 aA	62,25 aA	71,00 aA	64,25 aA	71,00 aA
TENA16	39,50 aAB*	20,00 bAB	7,25 bB	19,00 bAB	41,25 abAB	49,00 abA
TENA31	47,00 aA	49,00 abA	67,75 aA	65,50 aA	63,00 aA	71,00 aA
TENA33	55,50 aA	62,50 aA	38,50 abAB	44,75 abAB*	11,25 bcB	71,00 aA
C.V. (%)	32,01					

Letras maiúsculas iguais na mesma linha e minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. *As médias diferiram estatisticamente em relação ao meio de cultura. Média de 4 repetições.

Bell *et al.* (1982) trabalhando com *Rhizoctonia solani*, observou que diferenças na suscetibilidade ao antagonismo ocorreram entre grupos de anastomose, e, entre isolados dentro de um grupo de anastomose, de forma que no antagonismo classe 1, não houve nenhum crescimento de *Rhizoctonia* sobre o meio seletivo dentro de quatro dias e no antagonismo classe maior que 3, houve crescimento de todos os isolados de *R. solani* sobre o meio seletivo a partir de 2 dias. Com a utilização de escala de notas neste ensaio de confrontação direta (Tabela 13), observa-se que os isolados TENA7, TENA31 e TENA33 de *Trichoderma* apresentaram certa constância de comportamento nas condições avaliadas, independente do pH do meio de cultura utilizado e dos isolados de *Rhizoctonia* a que foram submetidos no pareamento.

Neste trabalho, é possível concluir que os isolados de *Trichoderma* como TENA7, TENA16 e TENA33, que alcançaram escore menor que 1,5 e muito próximo a 1 são possivelmente bons antagonistas a *Rhizoctonia solani* (Tabela 13).

□ *Rhizoctonia*
 ■ *Trichoderma*

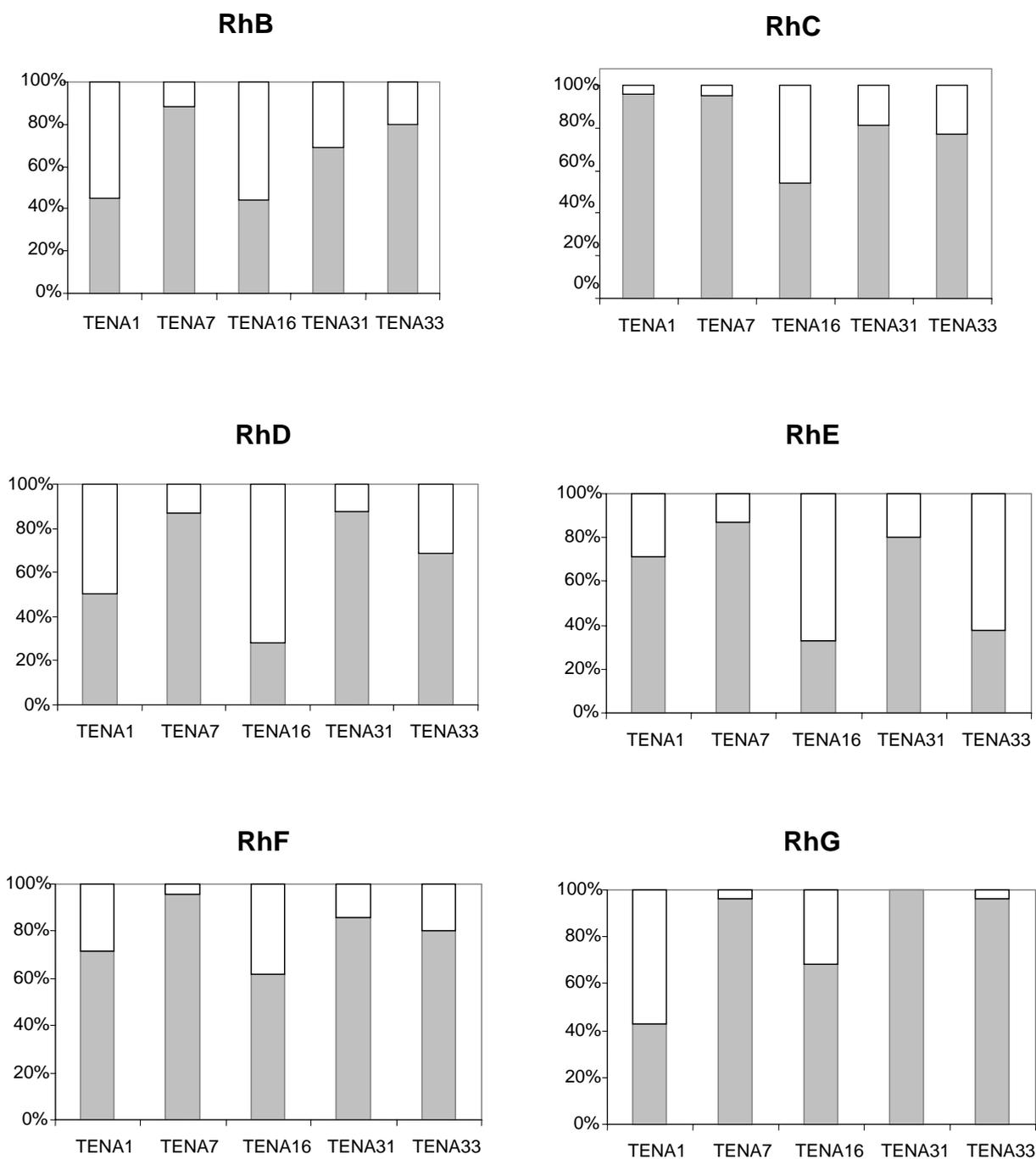


Figura 4: Reações de antagonismo *in vitro* de cinco isolados de *Trichoderma* spp. com seis isolados de *Rhizoctonia solani*, apresentando médias percentuais de raio de crescimento (mm.disco^{-1}) dos respectivos isolados, medido aos 8 dias, em placas de Petri. Seropédica, 2009.

Tabela 13: Teste de antagonismo *in vitro* pelo método de confrontação direta para efeito de meios de cultura BDA e BDA ácido, sobre o raio de crescimento das colônias dos isolados de *Trichoderma* e de *Rhizoctonia*, avaliado por meio de escalas de notas de 1 a 5, aos oito dias após o pareamento dos discos fúngicos em placas de Petri. Seropédica, 2009.*

		Meio de cultura BDA																										
		Isolado de <i>Rhizoctonia</i>																										
Isolado de <i>Trichoderma</i>		RhB				RhC				RhD				RhE				RhF				RhG				Total	Média	
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV			
TENA1		5	5	3	5	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1	5	2	2	-	-	-	5	3	3	4	46,0	1,9	
TENA7		2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	26,0	1,1	
TENA16		5	3	5	-	5	4	1	4	2	4	4	4	5	4	4	5	1	1	5	3	3	4	3	1	80,0	3,3	
TENA31		1	2	3	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	3	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	36,0	1,5	
TENA33		1	3	1	1	1	2	1	5	3	2	2	1	5	5	3	5	1	2	1	1	1	1	1	2	51,0	2,1	
																											1,98	
		Meio de cultura BDAA																										
		Isolado de <i>Rhizoctonia</i>																										
Isolado de <i>Trichoderma</i>		RhB				RhC				RhD				RhE				RhF				RhG				Total	Média	
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV			
TENA1		1	4	1	2	1	1	1	1	1	-	5	3	1	2	1	-	-	-	-	-	-	4	-	-	1	30,0	1,2
TENA7		1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	25,0	1,0	
TENA16		3	2	3	1	-	3	2	-	5	5	4	5	2	3	-	-	3	3	2	2	1	1	1	5	56,0	2,3	
TENA31		1	2	2	2	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	32,0	1,3	
TENA33		1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	3	-	1	2	5	1	2	-	-	-	1	1	1	1	30,0	1,2	
																											1,40	

*= 1(antagonista cresce por toda a placa de Petri), 2 (antagonista cresce sobre 2/3 da placa), 3 (antagonista e patógeno crescem até metade da placa), 4 (patógeno cresce sobre 2/3 da placa) e 5 (patógeno cresce por toda a placa de Petri), - (não houve crescimento de nenhuma cultura).

4 CONCLUSÕES

Isolados diferentes de *Trichoderma* e de *Rhizoctonia* variam quanto ao efeito sobre o crescimento um do outro.

Os isolados TENA7, TENA31 e TENA33, em geral, reduziram o crescimento da maioria dos isolados de *Rhizoctonia*, tanto em meio ácido quanto em meio neutro.

O pH do meio de cultura não afetou o desempenho dos antagonistas testados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R.C. Isolamento de Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 382 p.
- ANDRADE, D.E.G.T.; SILVA, C.F.B. da; SILVA, L.G.C. da; MICHEREFF, S.J.; SALES JÚNIOR, R.; ASSIS, T.C. de. Influência da densidade do inóculo e de isolados de *Rhizoctonia solani* na severidade da rizoctoniose do meloeiro. **Caatinga**, Mossoró, v.18, n. 3, jul/set, p. 164-168. 2005.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Minnesota, v. 72, p. 379-382. 1982.
- BENITEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v.7, nº 4, p. 249-260. 2004.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R.; AVENT, G.A. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Micological Society**, Londres, v.88, p.503-513. 1987.
- ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A.C.F. da; STEFANELO, D.R.; DA ROCHA, E.K. da. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n. 2, mar-abr, p. 127-133. 2005.
- GEYPENS, M. *In vitro* measurements of antagonism of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* and significance of nutritional factors. **Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv.** Gent, Bélgica, p. 997-1007. 1977
- HOWELL, C. R. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Minnesota, v.87, nº 1, p. 4-10. 2003.
- LOBO JUNIOR, M., SOBRAL, M.S. de. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.521-526, abr./jun., 2000.
- LUCON, C.M.M. Sideróforos e controle biológico de fitopatógenos. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de. **Controle Biológico**. Jaquariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, v. 3, p. 141-161, 2000. 388 p.
- MARIANO, R. de L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle biológico de patógenos de plantas. In: FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. Passo Fundo: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1993, v.I, p. 369-409. 417p.
- MARTINS, M.P. Potencial antagonístico de espécies de *Trichoderma* spp. contra *Verticillium dahliae* em berinjela (*Solanum melongena* L.). Piracicaba: ESALQ-USP, 1988, 156 p. Dissertação MS.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. de. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, jan/abr. 1998

MELO, I.S. de. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Melo, I.S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA-CNPDA, 1991, p.135-156.

MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente de antracnose do sorgo em condições de laboratório. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 19, n. 1, p. 14-17. 1993.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Minnesota: **Annual Reviews of Phytopathology**, Minnesota, v. 23, p. 23-54. 1985.

CAPÍTULO III

EFEITO DA APLICAÇÃO DE *Trichoderma* spp. EM SEMENTES SOBRE A QUALIDADE DE MUDAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) E PROTEÇÃO CONTRA *Rhizoctonia solani*.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito da aplicação *Trichoderma* spp. na emergência, proteção de sementes e plântulas de tomate contra o ataque de *Rhizoctonia solani* e qualidade das mudas. Dois experimentos foram realizados em condições de casa-de-vegetação. No primeiro aplicou-se o inóculo de cinco isolados de *Trichoderma* spp. por meio da imersão das sementes das cultivares Santa Clara e Garrafinha Vermelho em suspensão contendo 5×10^5 conídios.mL⁻¹. No segundo ensaio, aplicou-se o inóculo de três isolados de *Trichoderma* spp., à concentração de 2×10^6 conídios.mL⁻¹, em sementes das cultivares Santa Clara Miss Brasil e Perinha Água Branca. Como testemunhas foram utilizadas sementes imersas apenas em água + tween pelo mesmo período, sementes tratadas com captan (0,3%) e sementes sem nenhum tratamento. Logo em seguida as sementes foram distribuídas no substrato comercial próprio para produção de mudas de hortaliças, previamente infestado ou não com isolado RhB de *Rhizoctonia* sp.. Foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema fatorial 7 x 2 x 2, tendo como variáveis tratamento das sementes, cultivares e infestação ou não do substrato com *Rhizoctonia* sp. A semeadura foi feita em bandejas de polipropileno preto de 200 células, onde cada parcela correspondeu à metade de uma bandeja e em cada célula foram semeadas duas sementes de um mesma cultivar, totalizando 200 sementes.parcela⁻¹. Foram avaliados a porcentagem de emergência a partir do 4º dia após semeadura, o percentual final de tombamento das mudas, contabilizadas e somadas até o 24º dia, o comprimento de raízes, a altura das mudas e a área radicular ao longo de três semanas. As sementes tratadas com os isolados TENA7 e TENA16 de *Trichoderma* spp. apresentaram maior velocidade de emergência das plântulas porém não afetaram a porcentagem final de emergência, enquanto as sementes tratadas com captan apresentaram menor percentual de emergência. Não houve efeito dos tratamentos sobre o tombamento pós emergência. O efeito dos tratamentos foi melhor detectado no período entre 10 e 14 dias após semeadura. A área radicular não variou em função dos tratamentos.

Palavras-chave: proteção de sementes, fungos de solo, controle biológico.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of *Trichoderma* spp. on the emergence, protection of seeds and seedlings of tomato against the attachment of *Rhizoctonia solani* and quality of seedlings. Two experiments were carried out in a greenhouse. At first we applied the inoculum of five isolates of *Trichoderma* spp. by immersion of 'Santa Clara Miss Brasil' and 'Garrafinha Vermelho' seeds in water suspension containing 5×10^5 conidia.mL⁻¹. In the second test, the inoculum of three isolates of *Trichoderma* spp., at the concentration of 2×10^6 conidia.mL⁻¹ was applied on 'Santa Clara Miss Brasil' and 'Perinha Água Branca' seeds. As witnesses were used seeds immersed in water + tween the same period, seeds treated with captan (0.3%) and seeds without any treatment. Soon the seeds were distributed on the substrate suitable for commercial production of vegetable seedlings, previously infested or not with isolated RhB *Rhizoctonia* sp .. The experimental design consisted of randomized blocks with four replications in a factorial $2 \times 2 \times 7$, with the variables seed treatment, cultivar and infestation or not the substrate with *Rhizoctonia* sp. The sowing was done in polypropylene black 200 cells, where each plot corresponded to half a tray, and in each cell two seeds were sown of a cultivar, totaling 200 sementes.parcela⁻¹. We evaluated the percentage of emergence from the 4th day after sowing and the final percentage of seedling damping-off, counted and summed up until 24 days, root length, seedling height and root area over three weeks. The seeds treated with *Trichoderma* isolates TENA7 and TENA16 had a higher rate of seedling emergence but did not affect the final germination percentage, whereas the seeds treated with captan showed lower percentage of emergency. There was no treatment effect on post-emergence damping off. The effect of treatment was better detected in the period between 10 and 14 days after sowing. The root area did not vary with the treatments.

Keywords: protection of seeds, soil fungi, biological control.

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro está sujeito a uma série de doenças, causadas por patógenos de solo, que podem causar desde morte da semente e tombamento, à podridão de raízes, de colo, além daqueles que causam as murchas vasculares. *Rhizoctonia solani* é um fungo imperfeito, basidiomicota, habitante do solo, causador de prejuízos em vários hospedeiros, desenvolvendo-se dentro ou sobre a superfície do solo (AGRIOS, 2005). O tombamento, também conhecido como *damping-off*, é provavelmente a doença mais comum causada por *Rhizoctonia* em plantas, podendo ocorrer em fase de pré-emergência com a morte das sementes antes da emergência, ou, na fase de plântulas logo após sua emergência do solo, colonizando não somente as raízes como também o caule (AGRIOS, 2005).

A verificação da produção de esporos por *Rhizoctonia* na natureza é muito rara, porém, em sua fase teleomórfica, pode produzir esporos sexuais sob condições especiais de laboratório, sendo denominado como *Thanatephorus cucumeris* (AGRIOS, 2005).

Entre as medidas de controle mais importantes estão adequada irrigação, rotação de culturas, uso de sementes com atestado fitossanitário, solarização do solo, tratamento das sementes com fungicidas (KIMATI *et al.*, 1997) e controle biológico, que é uma estratégia promissora para a agricultura orgânica, onde é proibido o uso de agrotóxicos. O tratamento de sementes com fungos antagonistas, pode ser associado ou não a práticas como a solarização do solo (BOURBOS & SKOUDRIDAKS, 1996; IOANNOU, 2000; RICCI *et al.*, 2000).

Para tornar o uso dos agentes de controle biológico mais efetivo para o controle de doenças de plantas, é preciso entender como os agentes atuam e quais são as suas limitações (HOWELL, 2003). Estes mecanismos são variados e complexos, e o efeito final, resultante de diferentes mecanismos (HOWELL, 2003). A complexidade das interações planta-microrganismos e as poucas informações existentes têm dificultado o desenvolvimento de métodos de biocontrole por dois motivos principais: poucos resultados práticos com biocontrole e a escassez de informações do sistema como um todo (HANDELSMAN & STABB, 1996).

Microrganismos que são antagonistas a fungos fitopatogênicos têm sido usados para controle de doenças, e 90% de tais aplicações é realizado com diferentes cepas do fungo *Trichoderma* (BENITEZ *et al.*, 2004). A maioria das cepas de *Trichoderma* é classificada como fungos imperfeitos uma vez que não têm sido associados a nenhum estágio sexual conhecido (KUBICEK & HARMAN, 1998; HOWELL, 2003; BENITEZ *et al.*, 2004; HARMAN, 2004). Espécies de *Hypocrea* e gêneros altamente relacionados dentro de *Hypocreales* têm anamorfos como *Trichoderma*. Pesquisas tem relacionado um grande número de teleomorfos de *Hypocrea* à anamorfos de *Trichoderma* (KUBICEK & HARMAN, 1998), cuja seqüência de transcrição interna de DNA ribossomal (“internal transcribed spacer”) tem revelada esta proximidade taxonômica (HERMOSA *et al.*, 2000).

O relativo sucesso do uso de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico pode ser atribuído à capacidade metabólica de diversas espécies deste gênero e à sua natureza agressivamente competitiva (KUBICEK & HARMAN, 1998). O comportamento de *Trichoderma* spp. pode ser variável em função das condições do ambiente e do fitopatógeno testado, influenciados por competência de crescimento na rizosfera e competição por espaço ou por nutrientes (HOWELL, 2003).

Espécies do gênero *Trichoderma* são de ocorrência generalizada, facilmente isoladas de solo, madeira em decomposição e outras formas de matéria orgânica vegetal (PAPAVIZAS, 1985; HOWELL, 2003; HARMAN, 2004), sendo freqüentemente componentes dominantes da microflora do solo em grande variedade de habitats (KUBICEK & HARMAN, 1998). Caracteristicamente eles são cosmopolitas e saprófitas, podendo, porém, ser também micoparasitas (KUBICEK & HARMAN, 1998). Por serem saprófitas,

Trichoderma spp. são hábeis em crescer sobre uma variedade de hidratos de carbono complexos e substratos nitrogenados, tendo uma marcante habilidade biossintética, ilustrado pela capacidade da maioria das espécies em crescer em meios simples (KUBICEK & HARMAN, 1998).

As interações competitivas entre *Trichoderma* e outros microrganismos são complexas. O biocontrole com uso de cepas de *Trichoderma* spp. resulta tanto da competição, na qual a demanda por nutrientes ou espaço excede o suprimento imediato (LUCON, 2000; BENITEZ *et al.*, 2004), como da habilidade de *Trichoderma* em produzir e/ou resistir a metabólitos que impedem germinação de esporos (fungistase), mata a célula (antibiose) ou modifica a rizosfera, por exemplo, pela acidificação do solo, restringindo o crescimento dos patógenos (BENITEZ *et al.*, 2004). O biocontrole pode também resultar de uma interação direta entre o próprio patógeno e o agente de biocontrole, mecanismo conhecido como micoparasitismo, no qual os nutrientes do patógeno são utilizados pelo agente de biocontrole (LUCON, 2000). Este mecanismo envolve contato físico, síntese de enzimas hidrolíticas, com compostos tóxicos e/ou antibiose atuando sinergicamente com as enzimas (LORITO *et al.*, 1993; BENITEZ *et al.*, 2004). As enzimas envolvidas nestes processos são de considerável importância comercial, existindo variação na habilidade de vários *Trichoderma* spp. do solo em degradar diferentes materiais vegetais (KUBICEK & HARMAN, 1998).

Existem muitos relatos de ação de *Trichoderma* sobre fitopatógenos, principalmente micoparasitismo e/ou antibiose, porém resultados práticos de biocontrole são menos freqüentes devido a variações nas respostas e a interferência de vários fatores (HOWELL, 2003). Em adição à habilidade de *Trichoderma* em atacar ou inibir o crescimento de fitopatógenos diretamente, alguns trabalhos indicam que eles também podem induzir resistência sistêmica e localizada (YEDIDIA *et al.*, 1999; HARMAN, 2004). Neste caso, os agentes de biocontrole estimulariam os mecanismos de auto-defesa do vegetal (YEDIDIA *et al.*, 2001; BENITEZ *et al.*, 2004), com respostas à presença do antagonista resultando em mecanismos de resistência induzida à patógenos (LUCON, 2000; HARMAN, 2004). *Trichoderma* spp. como agentes de controle biológico podem ainda exercer efeitos positivos indiretos com o aumento do crescimento da planta (KLEIFELD & CHET, 1992; YEDIDIA, 2001).

O tratamento biológico pode ser feito através da inoculação direta nas sementes ou através da adição ao substrato utilizado na produção de mudas, com a vantagem de uma ação residual de proteção mais prolongada que os tratamentos químico e térmico, principalmente se o microrganismo protetor encontrar condições favoráveis ao seu desenvolvimento e estabelecimento no solo (MACHADO, 2000).

Muitos estudos têm sido realizados demonstrando efetividade de *Trichoderma* spp. no controle de tombamento, não só em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) com também em outras culturas como pimentão, pepino, cenoura, trigo, milho e várias outras. Trabalhos também demonstram efeitos de *Trichoderma* spp. na qualidade das mudas, principalmente no aumento da massa fresca, massa seca, comprimento de raízes e parte aérea (WINDHAM & ELAD, 1986; INBAR *et al.*, 1994; ALTOMARE *et al.*, 1999; YEDIDIA *et al.*, 1999, 2001).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito da aplicação *Trichoderma* spp. sobre (i) a emergência, (ii) a proteção das sementes e plântulas contra o ataque de *Rhizoctonia* sp. e (iii) o desenvolvimento e qualidade das mudas formadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos em condições de casa-de-vegetação no setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ nos períodos de outubro de 2007 a janeiro de 2008 e de agosto a novembro de 2008. O substrato comercial próprio para hortaliças Plantmax[®] utilizado nos experimentos foi submetido à análise química no Laboratório de Fertilidade do Departamento de Solos do Instituto de Agronomia da UFRRJ.

2.1 Ensaio de Controle Biológico I

No primeiro ensaio, utilizaram-se os isolados TENA7, TENA16, TENA31 e TENA33 de *Trichoderma* sp., previamente selecionados e conservados no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Instituto de Agronomia (SUDO-MARTELLETO, 2005). O material vegetal constituiu de sementes das cultivares Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, obtidas de sistema de Produção de Semente Orgânica da PESAGRO-RIO. O patógeno utilizado foi o isolado RhB de *Rhizoctonia solani*, obtido de alface.

A aplicação dos tratamentos com os isolados de *Trichoderma* sp. foi feita pela imersão das sementes, por 10 min, em suspensão contendo 5×10^5 conídios.mL⁻¹ em água contendo uma gota de tween 80% por L. A concentração de inóculo dos respectivos isolados a serem testados foi ajustada com auxílio de hemacitômetro. Como testemunhas foram utilizadas sementes imersas apenas em água + tween pelo mesmo período, sementes tratadas com captan (0,3%) e sementes sem tratamento.

A infestação do substrato com patógeno foi feita no mesmo dia da semeadura, pela adição de suspensão na concentração de 277,6 mg de micélio do isolado RhB de *Rhizoctonia*.L⁻¹ de substrato, por meio de rega. Utilizou-se o inóculo de *Rhizoctonia* puro (DINGHRA & SINCLAIR, 2000), sem veículo de crescimento, ou base alimentar ou substrato.

Para preparo do inóculo de *Rhizoctonia*, discos de micélio foram cultivados em 200 ml de meio batata-dextrose líquido (200 ml de calda de batata e 20 g de dextrose completado com água destilada até 1 L) por 10 dias em incubadora a 27° C, no escuro. Após a retirada do micélio do meio líquido por meio de filtração com auxílio de bomba de vácuo e papel filtro, estes foram postos para secar em papel toalha por cerca de dez min. Após este período foram pesados e triturados em água destilada com auxílio de mixer manual esterilizado e concentração ajustada para 4,0 g de micélio para cada litro de água. Para o tratamento testemunha utilizou-se apenas água destilada.

Foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema fatorial 7 x 2 x 2, sete tratamentos com as sementes, duas cultivares e substrato infestado e não infestado com *R. solani*.

A semeadura foi realizada logo após a aplicação dos tratamentos, em bandejas de polipropileno preto de 200 células, contendo substrato comercial para produção de mudas de hortaliças (Plantmax[®]) previamente infestado, ou não, com o isolado RhB de *Rhizoctonia* sp.. Cada parcela foi composta por 100 células ou metade de uma bandeja e em cada célula foram semeadas duas sementes de um mesma cultivar.

Para manutenção da umidade relativa do ar em torno de 80% e temperaturas mais amenas de dia em torno de 30°C, foram colocados sombrites e microaspersores elevados à altura aproximada de 2,5 m do chão, com timer regulado para 10 segundos de atomização a cada 30 min de intervalo.

Após a semeadura foram feitas observações aos 4, 5, 6, 7 e 21 dias, para quantificação da porcentagem de emergência e de tombamento, para comprimento das raízes e altura da parte aérea aos 6 e 14 dias, respectivamente. A medição do comprimento de raiz foi feita considerando-se a maior raiz até o ponto de inserção do caule, e para medição da altura, partiu-se deste ponto de inserção até a ponta de crescimento apical da parte aérea, e os dados

expressos em mm.planta⁻¹. Aos 21 dias, foram retiradas amostras de mudas para determinação de área radicular e presença de *Trichoderma* e *Rhizoctonia*.

A amostragem foi obtida com a retirada das mudas contidas em oito células, retirando-se as mudas da segunda, quarta e sexta fileiras da respectiva parcela, a partir da borda em direção ao centro da bandeja, no sentido do comprimento, deixando-se as bordaduras.

Antes do processamento das amostras foram retirados fragmentos de raiz para isolamentos em BDA com vistas à confirmação da presença de *Trichoderma* e de *Rhizoctonia*. Para a observação da presença de *Trichoderma* e de *Rhizoctonia*, as raízes das mudas coletadas foram cortadas e submetidas a procedimento de limpeza superficial em água corrente para retirada de restos de substrato, desinfestação com hipoclorito de sódio a 0,5% seguido de lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Para confirmação da presença de *Rhizoctonia*, após o processo de limpeza as raízes foram postas em meio ágar água. A partir do crescimento micelial em ágar água foi feito reisolamento em meio BDA e incubadas em B.O.D., sob regime escuro, a 25°C. Após 3 dias de incubação em BDA, foram retirados amostras das estruturas e postas em lâmina para observação em microscópio estereoscópico e confirmação da presença do patógeno. Para confirmação da presença de *Trichoderma*, após o processo de limpeza pedaços de raízes foram postos em meio BDA ácido e incubados em B.O.D. para crescimento do antagonista, também sob regime escuro, a 25° C.

Para determinação da área radicular seguiu-se o procedimento descrito por Zonta (2003). As raízes frescas foram removidas manualmente, com auxílio de espátula esterilizada a cada mudança de parcela, evitando perda de raízes secundárias ou contaminação das parcelas. O material retirado foi acondicionado em caixas plásticas tipo gerbox e em seguida lavadas em bacias de água para separação das partículas de solo aderidas ao sistema radicular. Pequenos pedaços de raízes soltas com o movimento de lavagem foram coletados também com auxílio de peneiras para evitar eventuais perdas. Após a lavagem, as raízes foram acondicionadas em recipientes contendo solução de ácido acetil salicílico a 2% até o processamento.

Para obtenção das imagens o sistema radicular foi distribuído sobre uma folha de acetato tamanho A4 e dispersas com solução de NaCl 0,9%, de forma que não houvesse sobreposição dos eixos. O excesso da solução foi retirado com auxílio de pequenos pedaços de papel filtro. A imagem foi digitalizada a 300 dpi e armazenada no formato BMP. Após digitalizadas, as imagens foram submetidas a cálculo de área radicular e comprimento por meio de programa SIARCS[®]3,0 (Embrapa/CNPDIA).

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias de Tukey a 5%, e quando necessário foram transformados em $(x+1)^{1/2}$.

2.2 Ensaio de Controle Biológico II

O experimento foi repetido no período de agosto a novembro de 2008 sob as mesmas condições, porém testaram-se apenas os isolados TENA7, TENA16 e TENA33 de *Trichoderma*. O material vegetal consistiu de sementes das cultivares Santa Clara Miss Brasil e Perinha Água Branca. O patógeno utilizado foi o mesmo isolado RhB de *Rhizoctonia*, utilizado em 2.1.

A infestação do substrato com patógeno foi feita no mesmo dia da sementeira, pela adição de suspensão na concentração de 277,6 mg de micélio do isolado RhB de *Rhizoctonia* sp. .L⁻¹ de substrato, por meio de rega, conforme descrito no item 2.2 do capítulo I.

A sementeira foi feita em bandejas de polipropileno preto de 200 células, contendo substrato Plantmax[®] previamente infestado, ou não, com o isolado RhB de *Rhizoctonia*. Cada parcela foi composta por 100 células (metade de uma bandeja) e em cada célula foram semeadas duas sementes da mesma cultivar.

A aplicação dos tratamentos com os isolados de *Trichoderma* sp. foi feita logo após a distribuição das sementes nas bandejas, pela adição de 1mL da suspensão de conídios de *Trichoderma* ajustada com auxílio de hemacitômetro para a concentração de 2×10^6 conídios.mL⁻¹ em água contendo uma gota de tween 80% por L. Como testemunhas foram utilizadas sementes imersas apenas em água + tween pelo mesmo período e sementes tratadas com fungicida (0,3%).

Adotou-se o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema fatorial 5 x 2 x 2, cinco tratamentos com as sementes, duas cultivares e substrato infestado e não infestado com *Rhizoctonia* sp.

As avaliações iniciaram-se aos 4 dias quando quantificou-se a porcentagem de emergência prosseguindo-se aos 5, 6, 7 e 24 dias após a semeadura. A incidência de mudas com tombamento foi feita pelo somatório das contagens diárias das mudas tombadas dos 4 aos 24 dias.

A qualidade das mudas foi avaliada medindo-se o comprimento do sistema radicular e da parte aérea, em amostras coletadas aos 6 e 14 dias após a semeadura e pela área radicular em amostras coletadas aos 10 dias, conforme descrito no item 2.1.

Para confirmação da presença de *Trichoderma* e de *Rhizoctonia* em amostras de raízes das mudas, seguiu-se o procedimento descrito no item 2.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de Controle Biológico I

Observou-se efeito significativo de tratamentos com *Trichoderma* sobre a emergência das plântulas em todas as avaliações realizadas aos 4, 5, 6, 7 e 21 dias após semeadura e de cultivar aos 5, 6, 7 e 21 DAS. Sobre a porcentagem de tombamento, observou-se efeito apenas de inoculação com *Rhizoctonia*, medida pelo somatório de mudas tombadas ao longo de 21 dias.

Nas diferentes avaliações, observaram-se menores porcentagens de emergência no tratamento com captan, e em geral, nenhuma diferença estatística entre os demais tratamentos, e maior porcentagem de emergência para a cultivar Garrafinha Vermelho, exceto na avaliação realizada aos quatro dias, quando se observaram maiores velocidades de emergências nas sementes tratadas com os isolados TENA 7, TENA 16 e TENA 31 (Tabela 14 e Figuras 5 e 6).

Tabela 14: Efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp. e de cultivar sobre a emergência de mudas aos 4, 5, 6, 7 e 21 dias após semeadura (DAS) e da presença de *Rhizoctonia* sp. sobre a porcentagem de tombamento aos 21 DAS em ensaio realizado em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008.

Tratamento de Sementes (*)	Emergência (%)				
	4 DAS	5 DAS	6 DAS	7 DAS	21 DAS
TENA7	7,00 a	57,09 a	76,28 a	76,68 ab	80,34 ab
TENA16	7,46 a	47,03 a	73,21 a	74,21 ab	77,84 ab
TENA31	6,09 a	46,75 a	73,40 a	74,90 ab	78,46 ab
TENA33	3,31 ab	47,68 a	76,25 a	77,43 a	81,59 ab
ÁGUA + Tween	3,53 ab	49,78 a	74,28 a	76,12 ab	79,71 ab
Sem Tratamento	1,03 ab	45,84 a	78,87 a	80,00 a	83,50 a
Fungicida (Captan)	0,21 b	19,96 b	61,18 b	70,40 b	75,00 b
Cultivar (**)					
Santa Clara	3,74 a	34,11 b	59,52 b	62,33 b	66,30 b
Garrafinha Vermelho	4,44 a	55,64 a	87,18 a	89,02 a	92,68 a
CV%	49,87	24,10	5,10	4,40	4,48
<i>Rhizoctonia</i> sp. (**)					
Tombamento aos 21 DAS (%)					
Ausente	0,00 b				
Presente	11,05 a				
CV%	48,05				

Médias seguidas por mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (*) Média de 16 repetições. (**) Média de 56 repetições.

A maior velocidade de emergência promovida por isolados de *Trichoderma* também foi observada por outros autores em tomate (WINDHAM *et al.*, 1986; TSAHOURIDOU & THANASSOULOPOULOS, 2002) e em pimentão (CHANG *et al.*, 1986; KLEIFELD & CHET, 1992). RAJU *et al.* (1999), em teste feito com sementes de cinco cultivares diferentes de sorgo infectadas por *Fusarium moniliforme* e tratadas com *T. harzianum*, observaram redução significativa na incidência da doença, assim como verificaram aumentos na porcentagem de germinação das sementes, no vigor das mudas e na emergência no campo.

Este efeito sobre a germinação da semente parece ser muito dependente da espécie vegetal, do isolado utilizado na inoculação, da forma com que *Trichoderma* é introduzido no sistema e do ambiente que se apresenta. Kleifeld & Chet (1992) utilizando diferentes métodos

de aplicação de *Trichoderma* T-203, observaram maior percentual final de germinação de sementes de feijão, rabanete, tomate, pimentão e abóbora quando estas foram tratadas com *Trichoderma* em preparado de farelo de trigo, comparado à aplicação do fungo com suspensão conidial e cobertura de semente feito com película e testemunha. Maiores percentuais de emergência de plântulas de arroz, quando as sementes foram tratadas com *Trichoderma harzianum* desenvolvido em pó de substrato de sorgo, também foram obtidas proporcionalmente ao aumento de concentração de inóculo (MISHRA & SINHA, 2000).

O efeito dos isolados de *Trichoderma* sobre a emergência de plântulas aos quatro dias (Figura 5) pode estar associado ao fato de que o fungo pode produzir fatores reguladores de crescimento que aumentam a velocidade da germinação das sementes e o acúmulo de massa seca de parte aérea das plantas (WINDHAM & ELAD, 1986).

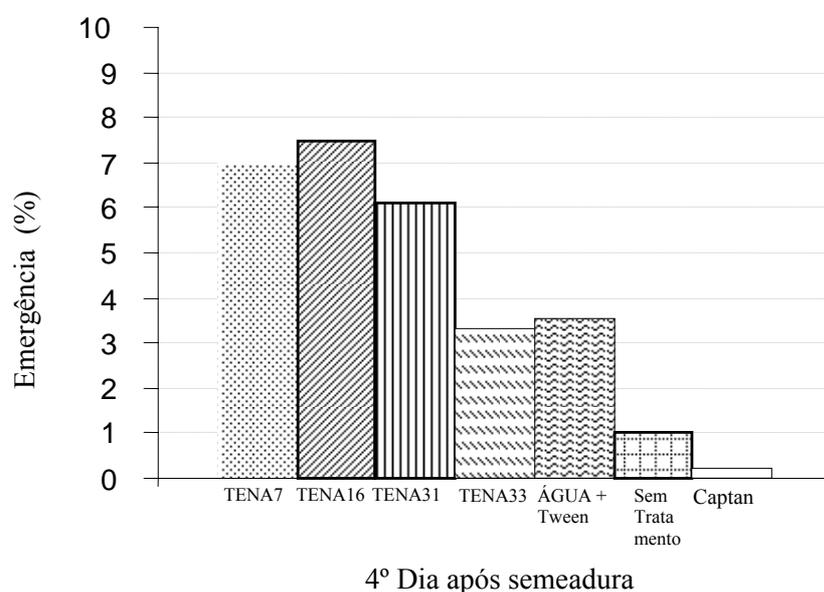


Figura 5: Efeito de isolados de *Trichoderma* spp. sobre emergência de plântulas de tomate aos quatro dias após semeadura em substrato comercial. Seropédica, 2007.

O fungo *Rhizoctonia solani* é um patógeno de solo que causa tombamentos de pré e pós-emergência em diversas espécies vegetais, entre os quais o tomateiro, e que apresenta alta taxa de variabilidade. O isolado de *Rhizoctonia* utilizado (RhB) não ocasionou morte das sementes ou tombamento em pré-emergência, visto que a escolha do isolado de *Rhizoctonia*, foi baseada desde o começo para efeito deletério pós-emergência, e, portanto, apresentou poucos danos na fase de pré-emergência, confirmado pela porcentagem de emergência final (Tabela 14). Ou seja, em ambos os experimentos não foi observado tombamento de pré-emergência. Este fato dificultou a avaliação do efeito protetor dos tratamentos nas fases iniciais do processo de germinação, período no qual se observa rápida colonização da espermosfera por *Trichoderma* (SUDO-MARTELLETO, 2005; CHAO *et al.*, 1986; PAPAIVIZAS, 1985).

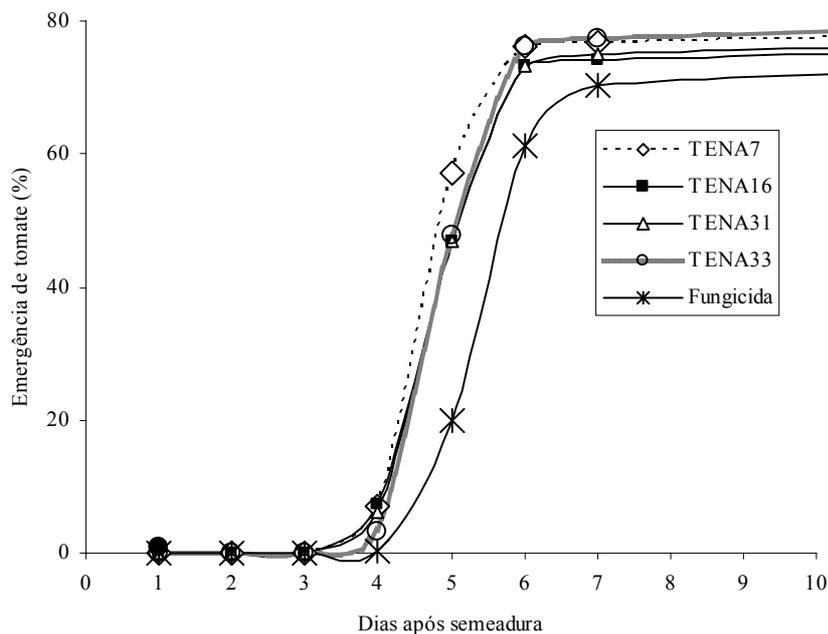


Figura 6: Efeito de isolados de *Trichoderma* spp. sobre emergência de sementes de tomate semeados em substrato comercial para hortaliças. Seropédica, 2007.

Na fase de pós-emergência, a ocorrência de tombamento das mudas até os 21 dias foi observada nas parcelas inoculadas com *Rhizoctonia*, tendo atingido ao final do ensaio o valor de 11,05% (Tabela 14), demonstrando ausência de efeito protetor dos isolados de *Trichoderma* testados e do próprio fungicida captan utilizado como testemunha, nesta fase.

Estes resultados diferem dos resultados dos testes *in vitro* de confrontação direta entre os isolados e o patógeno, onde foram observados efeitos de antibiose e de antagonismo dos isolados testados (Capítulo II) e dos de outros autores (LUZ, 1993; MAO *et al.*, 1998; PRASAD, 2002; AHMED, 2003), que relatam sucesso no controle de *Rhizoctonia* com isolados de *Trichoderma*. LARANJEIRA & MENEZES (1993) observaram parasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *R. solani* em condições de laboratório. HADAR *et al.* (1979), aplicaram *T. harzianum* através de farelo de trigo em solo infestado com *R. solani*, e obtiveram controle efetivo de tombamento de mudas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e tomate (*L. esculentum*). NORONHA *et al.* (1996), relatam que *T. harzianum* em feijão, quando aplicado via tratamento de sementes ou do solo contendo diferentes densidades de inóculo de *R. solani* apresentou os melhores níveis de controle da doença, superando o fungicida quintozene. *Trichoderma* spp. são fungos ativos como micoparasitas de fitopatógenos, produzem esporos e clamidósporos que podem ser formulados e utilizados para tratamento de solos, de sementes, de estolões e de bulbos e, ainda, pulverizados por via aérea (MELO, 1996). Provavelmente para reforçar o efeito protetor dos isolados de *Trichoderma* uma reinoculação por meio de pulverização aérea fosse interessante, a partir do momento da emergência das plântulas. A inoculação das sementes não foi suficiente para uma efetiva proteção das plântulas de tomateiro. Nos reisolamentos feitos a cada sete dias para verificar a presença de *Rhizoctonia* e de *Trichoderma*, confirmou-se que ambos estavam presentes na região das raízes.

A ocorrência de tombamento refletiu sobre o comprimento inicial da parte aérea das plântulas (Tabela 15), que obtiveram, por tal ocorrência, maior disponibilidade espacial e luminosidade. A qualidade das mudas avaliada aos seis, 14 e 21 dias após a semeadura,

através de medições de comprimento e área radicular mostraram efeito dos tratamentos, das cultivares e da presença ou não de patógeno no substrato.

A cultivar Santa Clara, apesar da menor porcentagem de emergência final, apresentou maior desenvolvimento das mudas, expresso pelo maior comprimento das raízes e da parte aérea aos 6 dias e 14 dias, podendo estes efeitos serem resultado de diferenças na qualidade fisiológica das sementes e característica genética de cada cultivar, respectivamente (Tabelas 14, 15 e 16).

Tabela 15: Efeito de cultivar e da presença ou ausência de *Rhizoctonia* sp. sobre o comprimento de raízes e altura de mudas de tomates (mm.plantula⁻¹) avaliados aos seis dias após o semeio em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Cultivar*	Comprimento de Raízes (mm.plantula ⁻¹)	Altura de mudas (mm.plantula ⁻¹)
Santa Clara	24,32 a	30,41 a
Garrafinha Vermelho	21,44 b	28,03 b
<i>Rhizoctonia</i> sp.*		
Ausente	23,77 a	28,44 b
Presente	21,99 a	30,00 a
CV(%)	23,67	12,07

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Média de 56 repetições. **Média de 16 repetições.

Nas avaliações realizadas aos 14 dias após o semeio, observou-se efeito significativo da interação tratamento x *Rhizoctonia* sobre o comprimento das raízes e altura das mudas.

O efeito dos tratamentos e da presença ou não do patógeno sobre o comprimento das raízes e altura das mudas aos 14 dias variou em função da cultivar (Tabela 16). Na cultivar Santa Clara não houve grandes variações quanto ao comprimento das raízes devido à presença ou ausência do patógeno, enquanto em ‘Garrafinha Vermelho’, o comprimento das raízes foi, em geral, significativamente maior nas parcelas não inoculadas com o patógeno, exceto para os tratamentos com TENA31, TENA33 e captan, onde não diferiram estatisticamente.

Estes tratamentos, em geral, também se destacaram pelo maior comprimento das raízes comparado aos demais tratamentos, indicando efeito benéfico sobre o alongamento das raízes na presença do patógeno.

Estes resultados são confirmados pelas medidas de comprimento da altura das mudas, onde não se observaram efeito significativo dos tratamentos para a cultivar Santa Clara e inoculado ou não com *Rhizoctonia*, e ‘Garrafinha Vermelho’ não inoculado, e diferença devido aos tratamentos nas parcelas de ‘Garrafinha Vermelho’ inoculado (Tabela 16). Nestas parcelas, observaram-se, em geral, a exemplo do resultado para o comprimento de raízes, maior altura das mudas oriundas de sementes tratadas com TENA31, TENA33, TENA16 e captan.

Tabela 16: Efeito do tratamento de sementes com *Trichoderma* spp. e da ausência ou presença de inóculo de *Rhizoctonia* sp. sobre o comprimento de raízes e altura de mudas de tomate (mm.planta⁻¹), cultivar Santa Clara e Garrafinha Vermelho, aos 14 dias após o semeio, em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Tratamento de Sementes	Comprimento de Raízes (mm.planta ⁻¹)				Altura (mm.planta ⁻¹)			
	Santa Clara		Garrafinha Vermelho		Santa Clara		Garrafinha Vermelho	
	Ausência de <i>Rhizoctonia</i>	Presença de <i>Rhizoctonia</i>	Ausência de <i>Rhizoctonia</i>	Presença de <i>Rhizoctonia</i>	Ausência de <i>Rhizoctonia</i>	Presença de <i>Rhizoctonia</i>	Ausência de <i>Rhizoctonia</i>	Presença de <i>Rhizoctonia</i>
TENA7	75,58 abA	76,95 abA	72,99 abA	46,55 cB	45,58 aA	45,18 aA	50,92 aA	32,66 cB
TENA16	68,60 bcA	67,90 bA	70,34 abA	62,88 bB	44,83 aA	46,42 aA	49,71 aA	45,10 abA
TENA31	66,86 bcB	75,20 abA	67,84 abA	69,96 abA	48,85 aA	45,62 aA	49,53 aA	50,23 aA
TENA33	76,50 abA	73,59 abA	70,16 abA	74,45 aA	46,85 aA	49,10 aA	47,92 aA	48,79 aA
Água + tween	79,20 aA	74,21 abA	69,82 abA	46,39 cB	45,48 aA	44,42 aA	50,39 aA	35,72 bcB
Sem tratamento	75,67 abA	78,42 aA	75,40 aA	48,84 cB	48,90 aA	47,23 aA	50,65 aA	34,60 cB
Captan	64,29 cA	69,08 abA	62,95 bA	63,41 bA	45,62 aA	46,80 aA	46,13 aA	49,43 aA
C.V. (%)	6,7				9,6			

Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de 4 repetições.

Quanto à área radicular das mudas aos 21 DAS, observou-se como tendência, aumento do efeito dos tratamentos nas parcelas inoculadas com *Rhizoctonia* e redução da área radicular devido aos tratamentos com o *Trichoderma* e principalmente captan comparado às testemunhas com o diluente água + tween, nas parcelas não inoculadas ou sem a presença do patógeno (Tabela 17).

De forma geral, também não se observou efeito conclusivo do patógeno sobre a área radicular. Esta, em geral, não variou em função da presença ou não do patógeno, exceto no tratamento TENA16 e TENA7 em ‘Santa Clara’ e ‘Garrafinha Vermelho’, respectivamente, onde houve redução significativa devido à presença do patógeno, e no tratamento com captan em ‘Santa Clara’ onde observou-se redução de área nas parcelas não inoculadas comparada à inoculada (Tabela 17).

Tabela 17: Efeito de tratamento de sementes de tomate cultivares Santa Clara e Garrafinha Vermelho com isolados de *Trichoderma* spp., sobre a área radicular de mudas ($\text{cm}^2 \cdot \text{planta}^{-1}$), semeadas em bandejas de polipropileno contendo substrato inoculado com *Rhizoctonia*, conduzidos dentro de casa-de-vegetação, e avaliadas aos 21 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Tratamento	Área Radicular aos 21 DAS ($\text{cm}^2 \cdot \text{planta}^{-1}$)			
	Santa Clara		Garrafinha Vermelho	
	<i>Rhizoctonia</i>			
	Ausente	Presente	Ausente	Presente
TENA7	15,01 abA*	13,25 aA	26,35 aA**	15,45 a B
TENA16	16,24 abA	10,33 a B	13,16 bA	15,14 aA
TENA31	15,64 abA	11,02 aA	13,22 bA	14,70 aA
TENA33	16,49 abA	12,03 aA	12,91 bA	14,23 aA
Água + tween	17,81 a A	16,05 aA	15,42 abA	11,02 aA
Sem tratamento	13,03 abA	13,79 aA	14,92 abA	15,92 aA
Fungicida	9,48 bB	14,29 aA	13,38 bA	11,59 aA
C.V. (%)				12,13

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de 4 repetições.

As dificuldades observadas em se interpretar os resultados e as variações das respostas entre as diferentes variáveis e datas de avaliação podem estar relacionadas à baixa incidência de tombamento, apenas 11,05% e às dificuldades normalmente relatadas em estudos de controle biológico em condições de campo e de casa-de-vegetação. Estudos anteriores utilizando diferentes isolados de *Trichoderma* sp. em tomate e diferentes épocas e substratos demonstraram variações nas respostas de um mesmo isolado (SUDO-MARTELLETO, 2005).

3.2 Ensaio de Controle Biológico II

O segundo experimento foi realizado no período de agosto a novembro de 2008, com cinco tratamentos, TENA7, TENA16, TENA33, água + tween e fungicida captan, em substrato infestado ou não com *Rhizoctonia*, e com duas cultivares Santa Clara Miss Brasil e Perinha Água Branca.

Sobre a velocidade da emergência, avaliada aos cinco dias, observou-se efeito significativo da interação entre cultivar, presença do patógeno e tratamento. A velocidade da emergência das plântulas da cultivar Santa Clara foi significativamente maior nos tratamentos testemunha e com captan na presença do patógeno em relação à ausência do patógeno,

enquanto que na cultivar Perinha Água Branca não foram observadas diferenças entre os tratamentos e a presença ou não do patógeno (Tabela 18).

A presença do patógeno favoreceu significativamente a velocidade de emergência das mudas da cultivar Santa Clara aos cinco e seis dias após o semeio. Pode ter ocorrido certo sinergismo entre enzimas de degradação do patógeno e os exsudatos liberados pelas sementes logo no início do processo germinativo, durante a fase de estabelecimento das plântulas, com produção de enzimas favoráveis à germinação das sementes, uma vez que o isolado de *Rhizoctonia* escolhido não apresentou patogenicidade na pré-emergência. A cultivar Perinha Água Branca caracterizou-se pela baixa velocidade de emergência, expressa pela porcentagem reduzida de plântulas aos cinco, seis e oito dias, porém, maior porcentagem final de emergência conforme avaliação aos 24 dias (Tabelas 18, 19, 20 e 21). Assim como no primeiro ensaio, a ação dos tratamentos sobre a emergência vai reduzindo com o tempo (Tabela 14).

Tabela 18: Efeito da interação entre isolados de *Trichoderma* spp e cultivar sobre a emergência de mudas (%), em substrato inoculado ou não com *Rhizoctonia*, avaliada aos cinco dias após semeadura (DAS) em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008.

Tratamento*	Emergência de Plântulas (%)			
	5 DAS			
	Santa Clara		Perinha	
Sem <i>Rhizoctonia</i>	Com <i>Rhizoctonia</i>	Sem <i>Rhizoctonia</i>	Com <i>Rhizoctonia</i>	
TENA7	19,75 aA	22,25 abA	0,00 aA	0,25 aA
TENA16	16,25 aA	17,50 bA	0,00 aA	0,50 aA
TENA33	19,00 aA	20,50 bA	0,00 aA	0,00 aA
ÁGUA+Tween	19,50 aB	31,75 aA	2,75 aA	1,87 aA
FUNGICIDA	16,25 aB	24,25 abA	0,00 aA	0,00 aA
Total médio	20,70 A		0,45 B	
Cultivar**	<i>Rhizoctonia</i>			
	Ausente		Presente	
Santa Clara	18,15 a B		23,25 aA	
Perinha	0,55 bA		0,35 bA	
C.V.(%)	51,04			

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Media de 16 repetições. **Media de 40 repetições.

Tabela 19: Efeito do tratamento de sementes de tomate e da interação entre cultivar e presença ou não de *Rhizoctonia*, sobre a emergência das plântulas aos seis dias após o semeio, em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008.

Tratamento*	Emergência de Plântulas (%)	
	6 DAS	
TENA7	37,56 ab	
TENA16	36,43 ab	
TENA33	34,62 b	
ÁGUA+Tween	43,56 a	
FUNGICIDA	31,37 b	
	<i>Rhizoctonia</i>	
Cultivar**	Ausente	Presente
Santa Clara	65,35 aB	72,30 aA
Perinha	5,55 bA	3,65 bA
C.V.(%)	23,06	

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Media de 16 repetições. **Media de 40 repetições.

Tabela 20: Efeito da interação entre tratamento das sementes com isolados de *Trichoderma* spp e de cultivar sobre a emergência de mudas avaliada aos oito dias após a semeadura, em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008. Seropédica, 2008.

Tratamento*	Emergência de Plântulas (%)	
	8 DAS	
	Sem <i>Rhizoctonia</i>	Com <i>Rhizoctonia</i>
TENA7	81,25 aA	76,50 aA
TENA16	81,12 aA	79,87 aA
TENA33	73,00 abA	75,37 aA
ÁGUA+Tween	82,00 aA	86,00 aA
FUNGICIDA	66,00 bB	84,87 aA
Cultivar**		
Santa Clara	82,50 a	85,60 a
Perinha	70,85 b	75,45 b
C.V.(%)	12,09	

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Media de 16 repetições. **Media de 40 repetições.

Em relação ao tombamento, neste ensaio, ao contrário do primeiro, observou-se efeito significativo somente de *Rhizoctonia*. A análise de variância não demonstra efeito de tratamento nem de cultivar, porém no desdobramento dos tratamentos em ambiente infestado com *Rhizoctonia* é perceptível diferentes respostas das cultivares em relação ao tombamento (Tabela 21).

Foi registrado porcentagem maior de tombamento das mudas, em comparação com o experimento anterior, com média de 42,62% até os 24 dias após o semeio (Tabela 21). Em substrato infestado com *Rhizoctonia*, dentro da cultivar Santa Clara, não houve efeito dos tratamentos sobre a porcentagem de tombamento, que variou de 43 a 46,50%, enquanto que em ‘Perinha Água Branca’ houve efeito significativo dos tratamentos, com menores percentuais no tratamento com TENA33, 33,00%, sendo que no tratamento testemunha estes valores foram de 51,25%.

Tabela 21: Efeito de cultivar sobre a porcentagem de emergência, da presença ou não de *Rhizoctonia* e da interação entre tratamento das sementes com isolados de *Trichoderma* spp. e cultivar sobre a porcentagem de tombamento em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 24 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Cultivar*		Emergência final (%)	
Santa clara		85,37 b	
Perinha		94,47 a	
C.V.%		7,35	
<i>Rhizoctonia</i> *		Tombamento final (%)	
Ausente		0,00 b	
Presente		42,62 a	
C.V.%		42,33	
		Tombamento final (%)	
		Santa Clara	Perinha
Tratamento**		Com <i>Rhizoctonia</i>	Com <i>Rhizoctonia</i>
TENA7		44,75 a	37,00 ab
TENA16		45,75 a	42,25 ab
TENA33		42,25 ab	33,00 b
Água + Tween		46,50 a	51,25 a
Fungicida		43,00 a	39,00 a
C.V.%		42,33	

Médias seguidas por letras iguais na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Média de 40 repetições. **Média de 4 repetições.

A ocorrência de maior porcentagem de tombamento neste 2º experimento, não permitiu a diferenciação entre os tratamentos, principalmente a partir das avaliações seguintes ao 10º DAS. Muitos patógenos de sementes e que sobrevivem no solo requerem nutrientes exógenos para germinação, para penetração e para infecção, sendo muitas vezes supridos por nutrientes originados da exudação das sementes e das raízes (LUZ, 1993).

Na avaliação de altura de mudas aos 10 e 17 dias após semeadura, houve efeito significativo de tratamento e de cultivar, e aos 24 dias efeito apenas de cultivar (Tabela 22).

O crescimento das plantas, expresso pela altura das mudas seguiu a mesma tendência observada para a emergência, tendo sido maior no tratamento água + tween e menor no tratamento com fungicida até os 17 dias apenas, enquanto na avaliação final, aos 24 dias, as mudas de todos tratamentos apresentaram altura estatisticamente igual. O mesmo ocorreu para o efeito de cultivar, maior comprimento de parte aérea das mudas e das raízes em ‘Santa Clara’ que em ‘Perinha Água Branca’, devido, provavelmente, a fatores genéticos e qualidade fisiológica das sementes (Tabelas 18, 19, 20, 21, 22 e 23).

Tabela 22: Efeito de tratamento das sementes com isolados de *Trichoderma* spp e de cultivar sobre a altura mudas (mm.planta⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliado aos 10, 17 e 24 dias após a semeadura. Seropédica, 2008.

Tratamento*	Altura das mudas (mm.planta ⁻¹)		
	10DAS	17DAS	24DAS
TENA7	33,31 ab	51,64 ab	98,42 a
TENA16	33,85 ab	51,56 ab	106,84 a
TENA33	31,42 ab	48,62 ab	102,53 a
ÁGUA+Tween	34,45 a	53,21 a	99,55 a
FUNGICIDA	30,36 b	45,16 b	95,52 a
Cultivar**			
Santa Clara	39,77 a	63,25 a	113,67 a
Perinha	25,58 b	36,83 b	87,48 b
C.V.(%)	11,60	13,57	11,73

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Média de 16 repetições. **Média de 40 repetições.

Quanto ao comprimento das raízes, aos 10 dias após semeadura (DAS), observou-se efeito apenas de cultivar.

Observou-se efeito significativo de cultivar sobre o comprimento de raízes aos 10 DAS, com maior comprimento de raízes em Santa Clara que em ‘Perinha Água Branca’ (Tabela 22).

Tabela 23: Efeito de cultivar sobre o comprimento de raízes de mudas (mm.planta⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliado aos 10 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Cultivar	Comprimento de Raízes (mm.planta ⁻¹)
	10 DAS
Santa Clara	37,12 a
Perinha	31,77 b
C.V.(%)	29,29

Médias seguidas por letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de 40 repetições.

Não houve efeito significativo de tratamento, cultivar ou inóculo de *Rhizoctonia* para o comprimento de raízes aos 17 dias nem para área radicular aos 10 dias.

Estudos mais detalhados relacionados com a dinâmica populacional poderiam ajudar na interpretação da ocorrência de maior tombamento num ensaio que no outro. Tanto o patógeno quanto os isolados de *Trichoderma* estavam presentes na região das raízes, pois os mesmos foram recuperados nos isolamentos periódicos realizados a partir de amostras de raízes ao longo do período experimental. Não foram feitas, porém, avaliações quantitativas, o que impede comparações entre os tratamentos. A competência de *Trichoderma* em se estabelecer na rizosfera é contraditória, pois alguns estudos apontam que *Trichoderma* pode não ser muito competente nesta zona radicular (AHMAD & BAKER, 1987; CHAO *et al.*, 1986; PAPAIVIZAS, 1981, 1985), e outros estudos contradizem esta afirmação (TSAHOURIDOU & THANASSOULOPOULOS, 2002). A concentração e a forma de aplicação do inóculo de *Trichoderma* utilizadas foram suficientes para o estabelecimento do antagonista e está de acordo com a concentração relatada por outros autores em sementes de pimentão, feijão, rabanete, tomate, abóbora, fumo (CHANG *et al.*, 1986; KLEIFELD &

CHET, 1992; WINDHAM & ELAD, 1986). Porém, estudo de Papavizas (1981) com *Trichoderma harzianum* indicou que o isolado desta espécie não se estabeleceu na rizosfera de mudas de feijão e ervilha desenvolvidos de sementes tratadas com conídios, pois o número de unidades formadoras de colônias (ufc) reisoladas foi sempre consideravelmente menor do que o número de conídios adicionado por semente, o que indicou falha na sobrevivência e/ou esporulação na rizosfera, observando-se ainda que a mensuração quantitativa de competência de rizosfera é melhor e mais constante quando realizada na ponta de raízes, onde exsudados estão em relativamente maior concentração (AHMAD & BAKER, 1987).

4 CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichoderma* spp. reduziram o tempo de emergência de plântulas de tomate.

Os isolados de *Trichoderma* e o fungicida captan não foram eficientes no controle do tombamento pós-emergência, nas condições em que foram realizados os testes.

Os efeitos de *Trichoderma* sobre a emergência, incidência de tombamento e desenvolvimento das mudas não foram constantes, o que impede uma interpretação definitiva.

A área radicular não variou em função dos tratamentos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5ª edição. USA: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- AHMAD, J.S.; BAKER, R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Minnesota, v. 77, p. 182-189. 1987.
- AHMED, A.S.; EZZIYYANI, M. SÁNCHEZ, C.P.; CANDELA, M.E. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. **European Journal of Plant Pathology**, n. 109, p. 633-637. 2003.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n° 7, p. 2926-2933. 1999.
- BENITEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v.7, n° 4, p. 249-260. 2004.
- BOURBOS, V.A.; SKOUDRIDAKIS, M.T. Soil solarization for the control of *Verticillium* wilt of greenhouse tomato. **Phytoparasitica**, Holanda, v. 24, n. 4, p. 277-280. 1996.
- CHANG, YA-CHUN; CHANG, YIH-CHANG; BAKER, R.; KLEIFELD, O. & CHET, I. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, Minnesota, v. 70, p. 145-148. 1986.
- CHAO, W.L.; NELSON, E.B.; HARMAN, G.E.; HOCH, H.C. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. **Phytopathology**, Minnesota, v.76, p. 60-65. 1986.
- DINGHRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Long-Term storage of plant pathogens. In: **Basic Plant Pathology Methods**. USA: Lewis Publishers. 2nd.edition. p.61-66. 2000.
- HADAR, Y.; CHET, I. & HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Minnesota, v.69, p. 64-68. 1979.
- HANDELSMAN, J.; STABB, E.V. Biocontrol do soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, v.8, p. 1855-1869, out. 1996.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, n° 2, jan, p. 43-56. 2004.
- HERMOSA, M.R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E.A.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n° 5, p. 1890-1898, mai. 2000.

- HOWELL, C. R. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Minnesota, v.87, nº 1, p. 4-10. 2003.
- INBAR, J.; ABRAMSKY, M.; CHET, I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 337-346. 1994.
- IOANNOU, N. Soil solarization as a substitute for methyl bromide fumigation in greenhouse tomato production in Cyprus. **Phytoparasitica**, Holanda, v. 28, n. 3, p. 248-256. 2000.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. 3ª.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v.2., p.690-719. 1997.
- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 144, p. 267-272. 1992.
- KUBICEK, C.P.; HARMAN, G.E. **Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics**. USA, v.1, 1998. 278 p.
- LARANJEIRA, D.; MENEZES, M. Parasitismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani* em condições de laboratório. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, nº 18 (suplemento): 446, ago. 1993.
- LORITO, M.; HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; BROADWAY, R.M.; TRONSMO, S.L.; WOO, S.L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 302-307. 1993.
- LUCON, C.M.M. Sideróforos e controle biológico de fitopatógenos. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de. **Controle Biológico**. Jaquariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, v. 3, p. 141-161, 2000. 388 p.
- LUZ, W.C. da. Microbiolização de sementes para o controle de doenças. In: LUZ, W.C. da; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M. ; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo: RAPP, 1993, v.1, p. 33-77. 417 p.
- MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA, 2000. 138p.
- MAO, W.; LEWIS, J.A.; LUMSDEN, R.D. & HEBBAR, K.P. Biocontrol of selected soilborne of tomato and pepper plants. **Crop Protection**, v.17, nº 6. 1998a.
- MAO, W.; LUMSDEN, R. D.; LEWIS, J.A.; HEBBAR, P.K. Seed treatment using pre-infiltration and biological agents to reduce damping-off of corn caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. **Plant Disease**, Minnesota, v.82, nº 3, p.294-299. 1998b.
- MELO, I. S. de. *Trichoderma* e *Gliocladium* com bioprotetores de plantas. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo: RAPP, 1996, v.4, p.261-295. 415 p.

MISHRA, D.S. & SINHA, A.P. Plant growth-promoting activity of some fungal and bacterial agents on rice seed germination and seedling growth. **Tropical Agriculture**, v.77, n° 3, p.188-191, jul. 2000.

NORONHA, M.A.; ANTUNES SOBRINHO, S.; SILVEIRA, N.S.S.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R. de; MARANHÃO, E. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 22, p. 156-162. 1996.

PAPAVIZAS, G.C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizosphere. **Phytopathology**, Minnesota, v. 71, p. 121-125. 1981.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 23, p. 23-54. 1985.

PRASAD, R.D.; RANGESHWARAN, R.; HEDGE, S.V.; ANUROOP, C.P. Effect of soil and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum* under field conditions. **Crop Protection**, v. 21, p. 293-297. 2002.

RAJU, N.S.; NIRANJANA, S.R.; JANARDHANA, G.R.; PRAKASH, H.S.; SHEKAR SHETY, H.; MATHUR, S.B. Improvement of seed quality and field emergence of *Fusarium moniliforme* infected sorghum seeds using biological agents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 206-212, 1999.

RICCI, M.S.F.; ALMEIDA, D.L.A.; FERNANDES, M.C.A.; RIBEIRO, R.L.D.; CANTANHEIDE, M.C. Efeitos da solarização do solo na densidade populacional da tiririca e na produtividade de hortaliças sob manejo orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, nov. 2000.

SUDO-MARTELLETO, M. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o tratamento de sementes de tomate visando a proteção contra patógenos de solo e de armazenamento e promoção de crescimento. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Dissertação de Mestrado, 2005. 112p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

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

USHERWOOD, N.R. Interações do potássio com outros íons. In: YAMADA, T.; IGUE, K.; MUZILI, O.; USHERWOOD, N.R. **Potássio na agricultura brasileira**. Londrina: Fundação IAPAR, 1982. 556p.

WINDHAM, M.T.; ELAD, Y. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Minnesota, v. 76, n° 5, p. 518-521. 1986.

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

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

ZONTA, E. **Estudos da tolerância ao alumínio em arroz de sequeiro e seus efeitos sobre a interface solo-planta**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Tese de doutorado, 2003. 139 p.

CAPÍTULO IV

**MACRONUTRIENTES EM MUDAS DE TOMATEIRO (*Lycopersicon
esculentum* Mill.) PRODUZIDAS A PARTIR DE SEMENTES TRATADAS
COM *Trichoderma* spp. E SEMEADAS EM SUBSTRATO INFESTADO
OU NÃO COM *Rhizoctonia* sp.**

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito da aplicação *Trichoderma* spp. em sementes de tomateiro semeadas em substrato infestado, ou não, com inóculo de *Rhizoctonia* sp., sobre os teores de nitrogênio, fósforo e potássio nas mudas desenvolvidas. Dois experimentos foram realizados em condições de casa-de-vegetação. No primeiro aplicou-se o inóculo de cinco isolados de *Trichoderma* spp. por meio da imersão das sementes das cultivares Santa Clara e Garrafinha Vermelho em suspensão contendo 5×10^5 conídios.mL⁻¹. No segundo ensaio, aplicou-se o inóculo de três isolados de *Trichoderma* spp., à concentração de 2×10^6 conídios.mL⁻¹, em sementes das cultivares Santa Clara Miss Brasil e Perinha Água Branca. Como testemunhas foram utilizadas sementes imersas apenas em água + tween pelo mesmo período, sementes tratadas com captan (0,3%) e sementes sem tratamento. A semeadura foi feita em bandejas de polipropileno preto de 200 células contendo substrato comercial para produção de mudas previamente inoculados, ou não, com o patógeno. Cada parcela correspondeu à metade de uma bandeja e em cada célula foram semeadas duas sementes de uma mesma cultivar, totalizando 200 sementes.parcela⁻¹. Foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema fatorial 7 x 2 x 2, tendo como variáveis tratamento das sementes, cultivares e infestação ou não do substrato com *Rhizoctonia* sp. Avaliaram-se a massa seca de raízes e de parte aérea, os teores e conteúdos de nitrogênio, fósforo e potássio em amostras coletadas aos 21 dias no 1º ensaio e aos 24 dias no 2º ensaio. As cultivares testadas responderam de forma distinta, com maior desenvolvimento de ‘Santa Clara’ comparado a ‘Perinha Água Branca’ e ‘Garrafinha Vermelho’, independente da presença ou não do patógeno e dos tratamentos recebidos. A influência dos tratamentos com os isolados de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento das plantas pode ser observada apenas no ensaio com menor ocorrência de tombamento das mudas. A ocorrência de tombamentos e, conseqüente redução do número de mudas por parcela resultaram em menor competição entre plantas e maior acúmulo de massa seca e conteúdo de P e K nas amostras avaliadas. O isolado de *Trichoderma* TENA33 proporcionou manutenção da qualidade das mudas na medida em que continha maior número de mudas.célula⁻¹, decorrente de boa emergência e menor percentual de tombamento, em relação aos demais tratamentos. O tratamento com TENA33 foi o que se manteve mais estável em relação ao controle de tombamento nas cultivares Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, e manutenção da qualidade nutricional das mudas mesmo sob pressão de competição. Na cultivar Perinha Água Branca, foi o tratamento que proporcionou menor percentual de tombamento. O isolado TENA31 apresentou maior afinidade e interação com as sementes de tomate de ‘Garrafinha Vermelho’, favorecendo maior controle de tombamento nesta cultivar.

Palavras-chave: macronutrientes, mudas de tomateiro, controle biológico.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of *Trichoderma* spp. in tomato seeds sown on infested or not with inoculum of *Rhizoctonia* RhB, on the concentration of nitrogen, phosphorus and potassium in seedlings developed. Two experiments were carried out in a greenhouse. At first we applied the inoculum of five isolates of *Trichoderma* spp. by immersing the seeds of the 'Santa Clara Miss Brasil' and 'Garrafinha Vermelho' in suspension containing 5×10^5 conidia mL^{-1} . In the second test was applied to the inoculum of three isolates of *Trichoderma* spp., The concentration of 2×10^6 conidia mL^{-1} in seeds of the 'Santa Clara Miss Brasil' and 'Perinha Água Branca'. As witnesses were used seeds immersed in water + tween the same period, seeds treated with captan (0.3%) and untreated seeds. Sowing was done in polypropylene black 200 cells containing substrate comercial para production of seedlings previously inoculated or not with the pathogen. Each plot corresponded to half a tray in each cell and two seeds were sown in the same cultivar, totaling 200 sementes.parcela⁻¹. The experimental design consisted of randomized blocks with four replications in a factorial $2 \times 2 \times 7$, with the variables seed treatment, cultivar and infestation or not the substrate with *Rhizoctonia* sp. Evaluations of the dry mass of roots and shoots, the concentration and content of nitrogen, phosphorus and potassium in samples collected at 21 days in the 1st test and 24 days in the 2nd test. The cultivars responded differently, with greater development in 'Santa Clara Miss Brasil' compared to 'Perinha Água Branca' and 'Garrafinha Vermelho', regardless of the presence or absence of pathogen and treatments received. The influence of treatment with *Trichoderma* spp. on plant development can be observed only in the test with a lower incidence of seedling damping-off. The incidence of damping-off and consequent reduction in the number of seedlings per plot resulted in less competition between plants and higher dry matter accumulation and content of P and K were shown. The incidence of damping-off and consequent reduction in the number of seedlings per plot resulted in less competition between plants and higher dry matter accumulation and content of P and K. The isolate *Trichoderma* TENA33 provided maintenance of quality seedlings in that it contained a greater number of mudas.célula-1, resulting from good emergence and a lower percentage of damping-off in the other treatments. The treatment with TENA33 was what was best maintained in the control of damping-off in the cultivars Santa Clara Miss Brazil and Garrafinha Vermelho, and maintenance of the nutritional quality of seedlings under pressure of competition. In the cultivar Perinha Água Branca, was the treatment that provided a lower percentage of damping-off. The isolated TENA31 showed higher affinity and interaction with the tomato seeds of 'Garrafinha Vermelho', promoting greater control of damping-off in this cultivar.

Keywords: macronutrients, tomato seedlings, biological control.

1 INTRODUÇÃO

Vários estudos com a aplicação de *Trichoderma* em sementes ou plantas relatam aumento do crescimento da planta durante os estágios vegetativo e reprodutivo (CHANG *et al.*, 1986; YEDIDIA *et al.*, 2001; TSAHOURIDOU & THANASSOULOPOULOS, 2002). Diversos mecanismos pelos quais *Trichoderma* influencia o desenvolvimento da planta têm sido sugeridos, tais como produção de hormônios de crescimento (HARMAN, 2000; WHINDHAM *et al.*, 1986), mineralização da matéria orgânica no solo (ALTOMARE *et al.*, 1999) e aumento de retirada e translocação de minerais menos disponíveis com liberação de nutriente do solo ou matéria orgânica (KLEIFELD & CHET, 1992; INBAR *et al.*, 1994). Estudos com mudas de tomateiro com sementes inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp., também revelam incrementos na qualidade destas, refletidos no aumento da massa seca de parte aérea, da altura das mudas, e dos teores de nitrogênio e fósforo, em condições de casa-de-vegetação (SUDO-MARTELLETO, 2005).

A grande maioria dos trabalhos envolvendo os termos nutrição e doença de plantas abordam o efeito da deficiência ou excesso de determinado elemento mineral no metabolismo da planta, como responsável pelo aumento de resistência ou pela redução da severidade de doenças. Poucos trabalhos relatam as alterações nos teores de macronutrientes em tecidos de plantas doentes (MARINGONI, 2003), ou ainda, de plantas que sobreviveram à doença. A nutrição da planta pode ser alterada por muitos patógenos dificultando a identificação dos fatores responsáveis por distúrbios nutricionais como excesso ou deficiência de nutrientes (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993). Todos os nutrientes essenciais são considerados importantes no desenvolvimento e controle de doenças, sendo o seu efeito muitas vezes determinado por comparação das concentrações de elementos nos tecidos vegetais (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993).

O N é um elemento presente nas moléculas de compostos orgânicos enquanto o P é um nutriente para aquisição e utilização de energia, tendo papel central em reações que envolvem ATP, na manutenção da integridade estrutural e para constituição do genoma e o K serve para ativar ou controlar a atividade de enzimas, atua na manutenção do potencial osmótico, no balanço de íons e no potencial elétrico (MENGEL & KIRKBY, 1987; EPSTEIN & BLOOM, 2006).

Os solos tropicais apresentam, normalmente, baixa concentração de fósforo disponível e alto potencial de fixação do P aplicado via fertilizante, ficando junto com o N como um dos nutrientes que mais limitam a produção das culturas no Brasil (PRADO, 2008). A interação do fósforo com constituintes do solo, com Al, Fe e Ca, sua ocorrência em formas orgânicas e sua lenta taxa de difusão na solução do solo tornam o P o nutriente menos prontamente disponível na rizosfera (ARAÚJO & MACHADO, 2006). O aumento do fósforo no solo é importante, pela adubação mineral e pela orgânica, que só se tornará disponível quando os microrganismos do solo quebrarem a matéria orgânica em formas simples, liberando íons fosfato inorgânicos (fósforo disponível) (PRADO, 2008). Os microrganismos do solo desempenham importante função na mineralização de formas orgânicas de P nos solos, solubilizando fosfatos minerais por meio da produção e liberação de ácidos orgânicos, que solubilizam formas precipitadas de P (ARAÚJO & MACHADO, 2006).

O potássio, presente nas plantas como o cátion K^+ , desempenha um importante papel na regulação do potencial osmótico das células vegetais, ativa muitas enzimas envolvidas na respiração e na fotossíntese, sendo que sua carência é refletida numa baixa taxa de crescimento (MALAVOLTA & CROCOMO, 1982; TAIZ & ZEIGER, 2006) e na diminuição da síntese de parede celular em hastes/caule predispondo a cultura a ventos, provocando seu tombamento (PRADO, 2008).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito da aplicação de *Trichoderma* spp. em substrato infestado ou não com micélios de *Rhizoctonia* sp., sobre o crescimento, teores e conteúdos de nitrogênio, fósforo e potássio em mudas de tomateiro.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos em condições de casa-de-vegetação no setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ nos períodos de outubro de 2007 a janeiro de 2008 e de agosto a novembro de 2008. O substrato comercial próprio para hortaliças Plantmax[®] utilizado nos experimentos foi submetido à análise química no Laboratório de Fertilidade do Departamento de Solos do Instituto de Agronomia da UFRRJ.

A análise química do substrato utilizado apresentou os seguintes valores: Na=0,011 Cmol_c/dm³, Ca = 11,0 Cmol_c/dm³, Mg = 8,5 Cmol_c/dm³, K = 0,10 Cmol_c/dm³, H+Al = 22,6 Cmol_c/dm³, Al = 0,0 Cmol_c/dm³, S = 19,61 Cmol_c/dm³, T = 42,21 Cmol_c/dm³, V = 46%, m = 0%, n = 0%, pH_{H2O} = 6,5, Corg = 15,84%, P = 386 mg.L⁻¹ e K=38 mg.L⁻¹.

2.1 Ensaio de Controle Biológico I

Foram utilizadas sementes das cultivares Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, obtidas de sistema de Produção de Semente Orgânica da PESAGRO-RIO, e o isolado RhB de *Rhizoctonia* sp., obtido de alface. Como tratamentos, utilizaram-se os isolados TENA7, TENA16, TENA31 e TENA33 de *Trichoderma* sp., previamente selecionados e conservados no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Instituto de Agronomia (SUDO-MARTELLETO, 2005).

A aplicação dos isolados de *Trichoderma* sp. foi feita pela imersão das sementes, por 10 minutos, em suspensão contendo 5x10⁵ conídios.mL⁻¹ em água contendo uma gota de tween 80% por L. A concentração de inóculo dos respectivos isolados a serem testados foi ajustada com auxílio de hemacitômetro. Como testemunhas foram utilizadas sementes imersas apenas em água + tween pelo mesmo período, sementes tratadas com captan (0,3%) e sementes sem tratamento.

A infestação do substrato com patógeno foi feita no mesmo dia da sementeira, pela adição de suspensão na concentração de 277,6 mg de micélio do isolado RhB de *Rhizoctonia* sp.L⁻¹ de substrato, por meio de rega. Utilizou-se o inóculo de *Rhizoctonia* puro (DINGHRA & SINCLAIR, 2000), sem veículo de crescimento, ou base alimentar ou substrato. O preparo do inóculo foi conforme o item 2.1 do capítulo III.

Foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema fatorial 7 x 2 x 2, sete tratamentos com as sementes, duas cultivares e substrato infestado e não infestado com *Rhizoctonia* sp.

A sementeira foi realizada logo após a aplicação dos tratamentos, em bandejas de polipropileno preto de 200 células, contendo substrato comercial para produção de mudas de hortaliças (Plantmax[®]). Cada parcela foi composta por 100 células ou metade de uma bandeja e em cada célula foram semeadas duas sementes de um mesma cultivar.

Para avaliação da massa seca das raízes e da parte aérea das mudas, as amostras foram coletadas aos 6, 14 e 21 dias após sementeira. As mesmas amostras de mudas coletadas aos 21 dias foram utilizadas na avaliação dos teores e conteúdos de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK). O procedimento de coleta para as avaliações, foi feita com a retirada de amostras das mudas contidas em oito células, coletadas da segunda, quarta e sexta fileiras da respectiva parcela, a partir da borda em direção ao centro da bandeja, no sentido do comprimento, deixando-se as bordaduras.

Para obtenção da massa seca das mudas, separou-se as raízes e a parte aérea das amostras, que foram secas em estufa de circulação forçada, a 65° C, durante 72 horas. Depois de secas, as amostras foram pesadas, obtendo-se os valores de massa seca final das mudas de cada parcela. Em seguida, dividiu-se o valor obtido pelo número de plantas postas para secar, para obtenção da massa seca por planta.

Para determinação dos teores de N, P e K, tomaram-se as diferentes amostragens secas, que foram moídas em almofariz de porcelana e pesadas no valor de 0,200 g de cada amostra. Em seguida, foram submetidas a processo de mineralização em solução sulfúrica com peróxido de hidrogênio (TEDESCO *et al.*, 1985) adicionada de catalizadores (Na_2SO_4 + CuSO_4 + selênio) para determinação dos teores de N, P e K, conforme metodologia TEDESCO *et al.* (1985) adotada pelo Laboratório de Fertilidade do Departamento de Solos do Instituto de Agronomia (UFRRJ), onde foram realizadas as análises dos teores desses nutrientes.

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias de Tukey a 5%, e quando necessário foram transformados em $(x+1)^{1/2}$.

2.2 Ensaio de Controle Biológico II

O experimento foi repetido no período de agosto a novembro de 2008 sob as mesmas condições, porém testaram-se apenas os isolados TENA7, TENA16 e TENA33 de *Trichoderma*. O material vegetal consistiu de sementes das cultivares Santa Clara Miss Brasil e Perinha Água Branca. O patógeno utilizado foi o mesmo isolado RhB de *Rhizoctonia*, utilizado em 2.1.

A infestação do substrato com patógeno foi feita no mesmo dia, antes da semeadura, pela adição de suspensão na concentração de 277,6 mg de micélio do isolado RhB de *Rhizoctonia* sp..L⁻¹ de substrato, por meio de rega, conforme descrito no item 2.2 do capítulo I.

A semeadura foi feita em bandejas de polipropileno preto de 200 células, contendo substrato Plantmax® previamente infestado, ou não, com o isolado RhB de *Rhizoctonia*. Cada parcela foi composta por 100 células (metade de uma bandeja) e em cada célula foram semeadas duas sementes da mesma cultivar.

A aplicação dos tratamentos com os isolados de *Trichoderma* sp. foi feita logo após a distribuição das sementes nas bandejas, pela adição de 1mL da suspensão de conídios de *Trichoderma*, por célula. A concentração de conídios foi ajustada com auxílio de hemacitômetro para 2×10^6 conídios.mL⁻¹ de água contendo uma gota de tween 80% por L. Como testemunhas foram utilizadas sementes imersas apenas em água + tween pelo mesmo período e sementes tratadas com fungicida (0,3%).

Adotou-se o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema fatorial 5 x 2 x 2, cinco tratamentos com as sementes, duas cultivares e substrato infestado e não infestado com *Rhizoctonia* sp.

Para avaliação da massa seca das raízes e da parte aérea das mudas, as amostras foram coletadas aos 10, 17 e 24 dias após semeadura. As mesmas amostras de mudas coletadas aos 24 dias foram utilizadas na avaliação dos teores e conteúdos de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK). O procedimento de coleta para as avaliações foi feito seguindo o mesmo procedimento descrito em 2.1.

Para obtenção da massa seca das mudas e determinação de teores de nitrogênio, fósforo e potássio seguiu-se os mesmos procedimentos descritos em 2.1.

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias de Tukey a 5%, e quando necessário foram transformados em $(x+1)^{1/2}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de Controle Biológico I

Aos seis, 14 e 21 dias após a semeadura, observou-se efeito de tratamento, cultivar e presença ou não de patógeno no substrato.

A massa seca da raiz das duas cultivares somente diferiu estatisticamente aos 14 dias, com maiores valores em Santa Clara que Garrafinha Vermelho. Já a massa seca da parte aérea foi significativamente maior em Santa Clara aos seis, 14 e 21 dias, sendo que nesta última avaliação apenas nas parcelas infestadas com *Rhizoctonia* (Tabela 24).

Tabela 24: Efeito de cultivar sobre a massa seca de plântulas de tomates avaliados aos seis, 14 e 21 dias após o semeio (DAS) em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Cultivar*	Massa Seca (mg.plântula ⁻¹)						
	6 DAS		14 DAS		21 DAS		
	Parte Aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz		Parte aérea	
				<i>Rhizoctonia</i>			
				Ausente	Presente	Ausente	Presente
Santa Clara	1,746 a	2,1 a	13,6 a	7,3 aA	6,8 aA	38,3 aA	41,1 aA
Garrafinha Vermelho	1,379 b	1,8 b	10,9 b	6,9 aA	6,5 aA	34,4 aA	30,5 bA
CV%	14,25	18,13	17,12	19,16		23,91	

Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Média de 56 repetições.**Média de 16 repetições.

Este resultado pode estar relacionado à qualidade fisiológica das sementes e às características genéticas de cada cultivar, e à menor competição entre plantas decorrente da menor taxa de emergência em Santa Clara (Tabelas 14 e 21 do capítulo III).

Quanto ao efeito dos tratamentos, observou-se menor desenvolvimento inicial das plântulas oriundas das sementes tratadas com captan comparada às demais, expressa pela massa seca da parte aérea aos seis dias após o semeio, independente da presença ou não de *Rhizoctonia* (Tabela 25).

Tabela 25: Efeito do tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp, na ausência ou presença de inóculo de *Rhizoctonia* sp., sobre a massa seca das plântulas (mg.plânta⁻¹), cultivares Santa Clara e Garrafinha Vermelho, aos seis, 14 e 21 dias após sementeira em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Tratamento de Sementes**	MASSA SECA (mg.plânta ⁻¹)								
	6 DAS	14 DAS				21 DAS			
	Parte Aérea	Raiz		Parte aérea		Raiz		Parte aérea	
		<i>Rhizoctonia</i>				<i>Rhizoctonia</i>			
	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	
TENA7	1,62 a	2,2 aA	1,8 abA	14,1 aA	9,9 bB	7,7 aA	6,8 aA	38,7 aA	34,9 abA
TENA16	1,58 a	2,2 aA	1,7 bB	13,5 aA	10,2 bA	6,6 aA	7,1 aA	36,7 aA	38,3 abA
TENA31	1,62 a	1,8 abB	2,2 abA	13,4 aA	11,7 abA	7,6 aA	5,9 a B	39,3 aA	30,6 bB
TENA33	1,56 ab	2,0 abB	2,4 aA	12,3 aA	13,9 aA	6,9 aA	7,5 aA	32,5 a B	43,9 aA
Água + tween	1,58 a	2,3 aA	1,9 abB	13,9 aA	10,5 bB	7,0 aA	6,3 aA	34,6 aA	33,7 abA
Sem tratamento	1,60 a	1,9 abA	1,7 bA	14,2 aA	9,9 bB	7,1 aA	6,3 aA	33,8 aA	31,6 abA
Fungicida	1,34 b	1,5 bA	1,7 bA	12,1 aA	11,7 abA	6,8 aA	6,7 aA	38,8 aA	37,6 abA
C.V. (%)	14,25	18,13		17,12		19,16		23,91	

Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Média de 56 repetições.**Média de 16 repetições.

Confrontando os dados da emergência com o efeito dos tratamentos, sobre o acúmulo de matéria seca até os seis dias, estes foram similares (Tabelas 14 e 21 do capítulo III e Tabela 25 deste capítulo), tendo o tratamento com aplicação de captan resultado em menor percentual de emergência e de massa seca das mudas que os demais tratamentos. Nas avaliações subsequentes, porém, houve efeito significativo da interação tratamento e presença de *Rhizoctonia* tanto sobre a massa seca de raízes quanto da parte aérea (Tabela 25). Estas diferenças foram mais acentuadas aos 14 dias (Tabela 25), com destaque para o tratamento com o isolado TENA33 que, em geral, apresentou maior média de massa seca de raiz e parte aérea.

Em geral, a massa seca da raiz e da parte aérea foi maior nas parcelas sem a presença de patógeno comparada às parcelas com patógeno, nos dois tratamentos testemunha, água + tween e sem nenhum tratamento (Tabela 25). Este resultado deve-se aos danos causados pelo patógeno aos sistema radicular e conseqüentemente à parte aérea. Esta tendência pode também ser observada nos tratamentos com TENA7 e TENA16. Nos tratamentos com TENA31 e TENA33, observou-se o contrário, maiores valores de massa seca das mudas desenvolvidas nas parcelas com substrato infestado com *Rhizoctonia*. Nesta avaliação, aos 14 dias, menores valores de massa seca de raiz foram registrados nas mudas dos tratamentos testemunha, captan e TENA16 (Tabela 25).

Estes resultados não foram mantidos na avaliação aos 21 dias, onde, de forma geral não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Nesta avaliação, pode-se destacar o tratamento TENA33, com maior massa seca de parte aérea e TENA31 com menor massa seca de parte aérea, nas parcelas inoculadas com *Rhizoctonia*. Aos 21 dias, não houve diferenças entre os tratamentos quanto ao efeito sobre a massa seca de raiz (Tabela 25). Ao analisar este resultados porém, deve-se considerar o efeito da competição entre plantas, especialmente aos 21 dias, com baixo percentual de tombamento, cerca de 11% (Tabela 14 do capítulo III).

Analisando-se a massa seca de parte aérea (mg.planta^{-1}) aos 21 dias (Tabela 25), os tratamentos, no geral, apresentaram médias semelhantes a um estudo feito por Andriolo *et al.* (2001) com mudas de tomateiro produzidas empregando diferentes métodos de irrigação, obtendo máximo de $0,039 \text{ g de massa seca.planta}^{-1}$ de parte aérea aos 24 dias após semeadura. O efeito dos tratamentos sobre a massa seca de parte aérea foi observado apenas na presença do patógeno, com diferença significativa entre os tratamentos TENA33, com a maior massa média, e TENA31, com a menor massa média, sem diferirem, porém, das testemunhas (Tabela 25). Observa-se que o valor obtido com o tratamento TENA33 na presença de *Rhizoctonia*, superou os valores dos outros tratamentos, reforçando a tendência de ser este, um isolado que mantém, em alguns casos, e melhor em outros, as qualidades da muda em condições de presença de patógeno.

A massa seca de raízes neste experimento apresentou um máximo de 7,7 mg, muito abaixo do valor obtido por Andriolo *et al.* (2001), provavelmente em função do tipo de bandeja utilizada por eles, que foi de 128 células, demonstrando a limitação que pode ser imposta às raízes de acordo com o compartimento acondicionado às mudas.

Observou-se efeito significativo dos tratamentos sobre o teor de N e efeito da presença do patógeno sobre os teores de P e K.

O teor e conteúdo de N apresentado pelas plantas não sofreu efeito significativo da presença ou ausência de *Rhizoctonia*, que neste experimento apresentou 11,05% de tombamento (Tabela 14 do capítulo III).

Aos 21 dias, houve maior teor de N nas mudas do tratamento com fungicida, e menor teor nas mudas da testemunha sem tratamento. O tratamento com fungicida apresentou maior teor e conteúdo de N (Tabela 26), apesar de menores valores de área radicular aos 21 dias (Tabela 17 do capítulo III), iguais estatisticamente aos tratamentos com *Trichoderma* e água + tween. Estes resultados diferem dos de HARMAN (2000) que mostrou que sementes de milho

(*Zea mays* L.) semeadas em solo com *T. harzianum* (T-22) e baixo teor de N resultaram em plantas vigorosas na maior parte da fase de crescimento e na maturidade, incluindo diâmetro de caule e maior rendimento de grãos e silagem no campo.

Tabela 26: Efeito do tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma* spp. e de cultivar sobre o teor (%) e conteúdo (mg. g muda⁻¹) de N em mudas de tomateiro aos 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Tratamento*	Teor de N (%)	Conteúdo de N (mg.planta ⁻¹)
TENA7	1,29 ab	0,0511 ab
TENA16	1,34 ab	0,0550 ab
TENA31	1,47 ab	0,0506 ab
TENA33	1,32 ab	0,0470 b
Água + tween	1,24 ab	0,0466 b
Sem tratamento	1,15 b	0,0393 b
Fungicida	1,58 a	0,0707 a
C.V.(%)	5,77	
Cultivar**		
Santa Clara	1,33 a	0,0561 a
Garrafinha Vermelho	1,35 a	0,0468 b
C.V.(%)		0,85

Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Média de 12 repetições. **Média de 42 repetições. (estas análises foram efetuadas com três repetições em função de perda de parcela durante a digestão de material e não disponibilidade de mais matéria seca).

Houve efeito de tratamento e de cultivar sobre o conteúdo de N, efeitos de interação entre Tratamento x *Rhizoctonia* e *Rhizoctonia* x Cultivar sobre o conteúdo de P, e nenhum efeito sobre conteúdo de K nas mudas aos 21 dias.

As mudas da cultivar Santa Clara apresentaram maior conteúdo de N que as de Garrafinha Vermelho (Tabela 26), apesar de não ter sido observado efeito de cultivar sobre o teor de N das duas cultivares, 1,33 % e 1,35 %, respectivamente. A diferença no conteúdo deve-se à maior massa seca em Santa Clara (Tabela 25), que na média apresentou menor percentual de emergência (Tabela 14 do capítulo III), com conseqüente redução na competição por espaço e luz.

O conteúdo de N, foi superior no tratamento com captan, que por sua vez não diferiu dos tratamentos com os três isolados de *Trichoderma* TENA7, TENA16 e TENA31 (Tabela 26). Este resultado deve-se ao maior teor de N nas mudas deste tratamento.

As mudas do tratamento com isolado de *Trichoderma* TENA33, apresentaram menor conteúdo de N que as do tratamento com captan, provavelmente devido às diferenças na massa seca acumulada nas mudas destes dois tratamentos (Tabela 25), que por sua vez, está relacionada à porcentagem de emergência, maior nas mudas do tratamento TENA33, com 81,59%, que no de captan, com 75,0% (Tabela 14 do capítulo III).

Os teores de N observados nas mudas dos diferentes tratamentos e nas duas cultivares são semelhantes aos registrados por Fayad *et al.* (2002), que obtiveram aos 12 dias após transplantio, teores de N e K iguais a 4,1% e 2,0% em tomateiro cv. Santa Clara, e de 1,5% e 1,3% em híbrido EF-50, respectivamente. Conforme o resultado obtido, diferentes cultivares podem apresentar grande variabilidade quanto aos teores de N, P e K, como foi demonstrado por Fayad *et al.* (2002) e podendo o teor de N no tecido vegetal variar com a espécie, variedade, parte, desenvolvimento e estado nutricional da planta, em geral, situando-se entre 0,5 e 5% (TEDESCO *et al.*, 1995).

O teor de N, apesar de estar dentro da faixa descrita por TEDESCO *et al.* (1995) e compatível com as de Fayad *et al.* (2002) foi influenciado pela presença de duas mudas.célula⁻¹, resultando em competição por este nutriente pelas mesmas. As mudas não apresentaram sintoma de deficiência de N, descritos como clorose generalizada e hábito estiolado, com crescimento retardado ou lento (EPSTEIN & BLOOM, 2006). Os teores de N obtidos neste 1º experimento (Tabela 26), máximo de 1,58% para o tratamento com fungicida e o valor mínimo de 1,15% das sementes sem tratamento, não ficam muito distantes do valor aproximado de ocorrência em análise de numerosas espécies vegetais apresentado por Epstein & Bloom (2006).

A presença do patógeno afetou negativamente o teor de P e de K nas mudas de tomate (Tabela 27). Os teores de P encontrados foram de 0,40 a 0,45%, dentro da faixa citada por TEDESCO *et al.* (1995), que no tecido vegetal varia de maneira geral entre 0,08 e 1,5%.

Tabela 27: Efeito da presença ou não de *Rhizoctonia* sobre o teor (mg.g massa seca⁻¹) de P e K em mudas de tomates aos 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

<i>Rhizoctonia</i>	Teor de P (%)	Teor de K (%)
Ausente	0,453 a	2,73 a
Presente	0,406 b	2,23 b
C.V. (%)	6,56	15,55

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de 3 repetições (estas análises foram efetuadas com três repetições em função de perda de parcela durante a digestão de material e não disponibilidade de mais matéria seca).

Os teores e conteúdos de N, P e K estão relacionados com a presença de *Rhizoctonia*, consequentemente com a incidência de tombamento, que por sua vez, afeta o número de mudas em desenvolvimento por célula, e os valores de macronutrientes obtidos.

O conteúdo de P, afetado pela interação *Rhizoctonia* x tratamento das sementes, apresentou mais variações em função dos tratamentos na presença que na ausência do patógeno (Tabela 28).

As mudas de ‘Garrafinha Vermelho’ na presença do patógeno apresentaram menor conteúdo de P (Tabela 28) do que na ausência do mesmo.

Tabela 28: Efeito da interação entre tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma* spp. e ausência ou presença de inóculo de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre o conteúdo de P (mg.planta⁻¹) em mudas de tomate, aos 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Tratamento	Conteúdo de P aos 21DAS (mg.planta ⁻¹)	
	<i>Rhizoctonia</i>	
	Ausente	Presente
TENA7	0,1988 aA	0,1596 abA
TENA16	0,1745 aA	0,1680 abA
TENA31	0,1668 aA	0,1266 bA
TENA33	0,1470 a B	0,2008 aA
Água + tween	0,1807 aA	0,1499 abA
Sem tratamento	0,1387 aA	0,1436 abA
Fungicida	0,1695 aA	0,1909 aA
Cultivar		
Santa Clara	0,1780 aA	0,1913 aA
Garrafinha Vermelho	0,1580 aA	0,1343 bB
C.V.(%)	1,52	

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de 3 repetições.

O baixo percentual de tombamento, 11,05%, registrado neste ensaio, permitiu observar efeito de tratamento sobre o conteúdo de P nas plantas, na presença de *Rhizoctonia* (Tabelas 27 e 28). O tratamento com o isolado TENA33, em presença de *Rhizoctonia*, apresentou resultados de conteúdo de P e massa seca maiores, apesar do maior número de plantas em crescimento.célula⁻¹ competindo por espaço e nutrientes. Esta restrição por espaço, provavelmente é fator responsável pelo menor teor de P, e menor teor e conteúdo de N no tratamento com o isolado TENA33.

O tratamento com o isolado TENA31, em presença de *Rhizoctonia*, apresentou menor conteúdo de P (Tabela 28), menor acúmulo de massa seca de raiz e de parte aérea aos 21 dias (Tabela 25). Este tratamento resultou em maior percentual de tombamento (18,80%) das mudas da cultivar Santa Clara. Porém, convém salientar que dentro da cultivar Garrafinha Vermelho, o tratamento com o isolado TENA31 resultou em apenas 7,7% de tombamento, evidenciando efeito de interação entre cultivar e isolado (Tabela 29).

Tabela 29: Efeito de tratamento de sementes de variedades de tomate Santa Clara ‘Miss Brasil’ e Garrafinha Vermelho com isolados de *Trichoderma* spp. sobre o tombamento total de mudas (%), semeadas em bandejas de polipropileno contendo substrato inoculado com *Rhizoctonia*, sendo conduzidos dentro de casa-de-vegetação, e avaliadas aos 21 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Tratamento	Tombamento final (%)	
	Santa Clara	Garrafinha Vermelho
	Com <i>Rhizoctonia</i>	Com <i>Rhizoctonia</i>
TENA7	17,40 aA	10,62 aA
TENA16	16,20 aA	9,80 aA
TENA31	18,80 aA	7,70 a B
TENA33	7,40 aA	5,90 aA
ÁGUA+Tween	10,52 aA	9,35 aA
Sem tratamento	6,65 aA	8,70 aA
Fungicida	9,82 aA	18,85 aA
C.V.(%)	48,05	

Médias seguidas por letras minúsculas na mesma coluna e por letras maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de 4 repetições.

O tratamento com fungicida captan em presença de *Rhizoctonia*, apresentou maior conteúdo de P, devido ao maior acúmulo de massa seca decorrentes da menor competição entre plantas por espaço e nutrientes. Esta menor competição entre plantas deve-se à maior porcentagem de tombamento, que chegou a 18,8% nas mudas de ‘Garrafinha Vermelho’ (Tabela 29), semelhante ao observado com o tratamento com o isolado TENA31.

Entre esses dados e interações avaliados, o tratamento com TENA33 foi o que se manteve mais estável em relação ao controle de tombamento nas cultivares Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, e manutenção da qualidade nutricional das mudas.

Problemas fitossanitários podem ocorrer em plantas com deficiência de P apresentando desenvolvimento radicular limitado, comprometendo o processo de absorção de nutrientes. Além disso, as raízes podem ficar mais suscetíveis ao ataque de patógenos radiculares, devido à atividade microbiológica na rizosfera, menor resistência física à entrada do patógeno devido menor quantidade de lignina e suberina e diminuição de defensivos endógenos como alexinas, glicosídeos, alcalóides e acumulação de substratos que seriam fonte alimentar para os patógenos (PRADO, 2008; MALAVOLTA, 2006).

O fósforo é um constituinte integral de compostos importantes das células vegetais, incluindo fosfato-açúcares, intermediários da respiração e fotossíntese, bem como fosfolipídeos que compõem as membranas vegetais, componente de nucleotídeos utilizados no metabolismo energético das plantas (como ATP) e no DNA e RNA (PRADO, 2008; TAIZ & ZEIGER, 2006). O tratamento com TENA33, apresentou maior conteúdo de P só na presença de *Rhizoctonia* (Tabela 28), e 7,40 e 5,90 % de tombamento nas cultivares Santa Clara e Garrafinha Vermelho respectivamente, demonstrando efeito deste tratamento na absorção de nutrientes apesar da limitação de espaço. Altomare (1999) reportou que certos fungos fitopatogênicos, entre eles *Rhizoctonia* e *Pythium*, são incapazes de solubilizar fosfatos, sugerindo que isolados de *Trichoderma* competentes na rizosfera podem ter algum papel na supressão destes fitopatógenos pela retirada de P.

Alguns trabalhos indicam que *Trichoderma* spp. podem induzir resistência sistêmica e localizada a fitopatógenos (YEDIDIA *et al.*, 1999; HARMAN, 2004). Neste caso, os agentes de biocontrole estimulariam os mecanismos de auto-defesa do vegetal (YEDIDIA *et al.*, 2001; BENITEZ *et al.*, 2004), com respostas à presença do antagonista resultando em mecanismos de resistência induzida à patógenos (LUCON, 2000; HARMAN, 2004). *Trichoderma* spp.

como agentes de controle biológico podem ainda exercer efeitos positivos indiretos sobre plantas com um aumento no crescimento da planta (KLEIFELD & CHET, 1992; YEDIDIA, 2001). O fósforo aumenta a resistência das plantas, por elevar o teor na planta ou por acelera a maturação dos tecidos, auxiliando-a a escapar da infecção por patógenos que têm preferência por tecidos jovens e de um modo geral, o fósforo tem sido importante no decréscimo do ataque dos fungos em diferentes espécies de plantas (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993). Na planta, o P ocorre em formas orgânicas e inorgânicas (acumulado no vacúolo) que são liberadas para o citossol à medida que a planta necessita, evitando prejudicar algum processo fisiológico importante, como a fotossíntese, na ausência de P no meio externo (PRADO, 2008), e também favorece o desenvolvimento do sistema radicular, inclusive de raízes adventícias ao caule, e estimula o engrossamento do caule (FILGUEIRA, 2003), de modo que pode ter influenciado na resistência ao tombamento.

O fósforo é absorvido da solução do solo na forma de H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-} , predominando no solo a forma H_2PO_4^- , necessitando ocorrer o contato desse nutriente com a raiz antes da ocorrência da absorção propriamente dita (PRADO, 2008). O movimento do P no solo é governado pelo fenômeno da difusão (movimento de íons a favor de um gradiente de concentração), responsável por mais de 94% do contato P-raiz, caracterizado por percorrer pequena distância, recomendando-se por isso aplicação localizada para favorecer absorção (PRADO, 2008).

Para íons pouco móveis, como o fosfato, a absorção é frequentemente relacionada com o comprimento radicular (ARAÚJO & MACHADO, 2006), sendo que neste experimento foi melhor correlacionada com os dados de massa seca de raízes e de parte aérea, pois o comprimento e, provavelmente, a área radicular amostrados ficaram limitados pelo recipiente. Estudos demonstram que *Trichoderma* spp. são capazes de solubilizar diversos minerais nutrientes vegetais, como fosfato de rocha, MnO_2 , Fe_2O_3 e Zn, podendo o fósforo ser solubilizado e armazenado na biomassa de *Trichoderma* para ser liberado numa forma prontamente assimilável próximo às raízes, após lise do micélio com o passar do tempo (ALTOMARE *et al.*, 1999). Muito da natureza dinâmica dos solos deriva direta e indiretamente das raízes (EPSTEIN & BLOOM, 2006). Uma direta interação planta-fungo pode ser responsável pelo aumento de resposta de crescimento, assim como por outras respostas na planta (YEDIDIA *et al.*, 2001). Embora não seja o mecanismo mais importante associado a espécies de *Trichoderma* potenciais agentes de controle biológico, a sua ação como promotores de crescimento é extremamente relevante por poder contribuir para a maior tolerância das plantas a doenças por meio do aumento no crescimento da raiz ou parte aérea, resistência a estresses bióticos ou abióticos, e mudanças no status nutricional da planta (HOWELL, 2003).

Em estudo reunindo diversos autores apresentando teores de macronutrientes em tomate, Dechen *et al.* (1988) apresentaram valores de P que variaram entre 0,09% a 0,50%, em parte aérea de tomateiro com 90 a 110 dias. Em vista do teor de P apresentados pelas mudas neste experimento, pode-se presumir que este nutriente foi bem assimilado. Enquanto o nitrogênio e o potássio dos adubos permanecem em formas que as raízes podem aproveitar durante um período mais ou menos longo, com o fósforo não se dá o mesmo, pois ele pode reagir de modo mais ou menos rápido com determinados componente do solo sendo convertido em outras formas que as plantas não absorvem ou só o fazem com dificuldades (MALAVOLTA, 1989).

Tedesco *et al.* (1995) consideram que o teor de K no tecido vegetal pode variar entre 0,2 e 10%, dependendo de vários fatores. Segundo Malavolta & Crocomo (1982), os teores foliares de K que a cultura do tomate deve apresentar no início do florescimento considerado adequado é de 3,0% e deficiente é de 1,5-2,0% respectivamente. O teor total de K na planta para crescimento/desenvolvimento ótimo estaria entre 2% a 5% do peso da massa seca,

podendo ainda ocorrer variação em função da cultura e outros fatores (PRADO, 2008). Os valores apresentados neste experimento encontram-se dentro das faixas relatadas e não apresentaram efeito dos tratamentos nem de cultivar, apenas respostas diferenciadas em função de presença ou ausência de *Rhizoctonia* (Tabela 27). O que pode ser um indicativo de relação com o patógeno, uma vez que no 2º experimento onde houve maior percentual de tombamento, o teor de K foi mais elevado na presença de *Rhizoctonia*, notadamente na cultivar Perinha Água Branca, onde apresentou teor médio de K de 5,67% (Tabela 32) e será discutido adiante.

3.2 Ensaio de Controle Biológico II

Neste segundo ensaio, em geral, a massa seca das mudas foi maior em ‘Santa Clara Miss Brasil’ que em ‘Perinha Água Branca’, nas três avaliações, aos 10, 17 e 24 dias (Tabelas 30 e 31), similar ao observado no ensaio anterior (Tabela 25), e nas parcelas com substrato não infestado comparado às infestadas com *Rhizoctonia* (Tabelas 30 e 31). Este resultado confirma o efeito deletério do patógeno sobre o desenvolvimento das mudas.

Tabela 30: Efeito da interação entre tratamento das sementes com isolados de *Trichoderma* spp. e cultivar e presença ou não de *Rhizoctonia* spp. sobre a massa seca de mudas de tomate (mg.planta^{-1}), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 10 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Tratamento*	Massa Seca de Mudanças (mg.planta^{-1})	
	10DAS	
	Santa Clara	Perinha
TENA7	4,02 aA	1,53 aB
TENA16	4,22 aA	1,50 aB
TENA33	3,48 abA	1,42 aB
Água+Tween	3,47 abA	2,11 aB
Fungicida	3,03 bA	1,44 aB
<i>Rhizoctonia</i> **		
Ausente	2,84 a	
Presente	2,40 b	
C.V.(%)	25,59	

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Média de 16 repetições. **Média de 40 repetições.

Observou-se, na presença de *Rhizoctonia*, maior massa seca de raízes aos 17 dias (Tabela 31), devido à maior disponibilidade de espaço resultante da ocorrência de tombamento, 42,62%. Da mesma forma, aos 24 dias após o semeio, observou-se maior massa seca de raiz e de parte aérea nas parcelas infestadas às não infestadas. Este resultado deve-se, provavelmente, à menor competição por espaço e luz na primeira, decorrente do menor número de plantas e maior desenvolvimento das plantas sobreviventes, visto a ocorrência de 42,62% de tombamento (Tabela 21 do capítulo III). Este efeito foi mais acentuado em ‘Santa Clara Miss Brasil’, onde ocorreu maior porcentagem de tombamento, 43%, e menor emergência, 85,37%, comparado com ‘Perinha Água Branca’, que apresentou 39% de tombamento e 94,47% de emergência (Tabela 21 do capítulo III).

Tabela 31: Efeito da interação entre cultivar e presença ou não de *Rhizoctonia* sobre a massa seca de mudas de tomate (g.planta⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 17 e 24 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Cultivar*	Massa Seca (mg.planta ⁻¹)						
	17 DAS			24 DAS			
	Planta inteira*		Raízes**	Parte Aérea*		Planta inteira*	
	<i>Rhizoctonia</i>			<i>Rhizoctonia</i>			
	Ausente	Presente		Ausente	Presente	Ausente	Presente
Santa Clara	14,62 aA	9,77 aB	4,155 a	41,9 aB	54,1 aA	45,5 a B	58,9 aA
Perinha	7,71 bA	5,84 bA	2,357 b	29,9 bA	31,9 bA	31,8 bA	34,7 bA
<i>Rhizoctonia**</i>							
Ausente	11,1 a		2,728 b				
Presente	7,8 b		3,784 a				
C.V.(%)	34,90		38,35		14,40		13,77

Médias seguidas por letras minúsculas na mesma coluna e por letras maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Média de 20 repetições. **Média de 40 repetições.

Neste ensaio não foi observado efeito dos tratamentos das sementes sobre os teores e conteúdos de N, P e K. Observou-se no entanto efeito de cultivar sobre o conteúdo de N, P e K e da presença ou não do patógeno sobre o conteúdo de P e K e da interação cultivar x *Rhizoctonia* sobre o teor de K (Tabela 32).

Tabela 32: Efeito de cultivar sobre o conteúdo de N e de P (mg.planta⁻¹), da presença ou não de *Rhizoctonia* sobre o conteúdo de P (mg.planta⁻¹), da interação entre cultivar e presença ou não *Rhizoctonia* sp. sobre o teor de K (%) e de cultivar e presença ou não *Rhizoctonia* sp sobre o conteúdo de K, em mudas de tomate, em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 24 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Cultivar	Conteúdo de N (mg.planta ⁻¹)	Conteúdo de P (mg.planta ⁻¹)
Santa Clara	0,1648 a	0,0292 a
Perinha	0,1168 b	0,0198 b
C.V. (%)	1,85	0,41
<i>Rhizoctonia</i>		Conteúdo de P (mg.planta ⁻¹)
Ausente		0,0223 b
Presente		0,0267 a
C.V. (%)		0,41
Teor de K aos 24 DAS (%)		
<i>Rhizoctonia</i>		
Cultivar	Ausente	Presente
Santa Clara	4,54 aA	4,41 bA
Perinha	4,14 a B	5,67 aA
C.V.(%)	11,21	
Cultivar	Conteúdo de K (mg.planta ⁻¹)	
Santa Clara	0,2178 a	
Perinha	0,1518 b	
<i>Rhizoctonia</i>		
Ausente		
Presente		
C.V. (%)		
2,75		

Médias seguidas por letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média de 4 repetições.

Estes resultados estão diretamente relacionados ao de massa seca, maior em Santa Clara, e nas parcelas infestadas com *Rhizoctonia* (Tabela 31), que foi influenciado pela disponibilidade de espaço em função da porcentagem de emergência e ocorrência de tombamento (Tabela 21 do capítulo III).

A qualidade das mudas avaliada pelas variações de massa seca, teor e conteúdo de macronutrientes N, P e K mostraram pouco efeito significativo dos tratamentos, observando-se apenas os efeitos da presença de *Rhizoctonia* e de cultivar. A pouca influência dos tratamentos pode ter sido ocasionada pela forma de inoculação dos isolados de *Trichoderma* sobre as sementes, onde neste ensaio foi feita nas bandejas, pela adição de 1mL da suspensão de conídios de *Trichoderma*, por célula, e embora tenha sido usada uma concentração bem maior, 2×10^6 conídios.mL⁻¹ de água com tween. Outro ponto importante é a população de *Rhizoctonia*, adicionada ao substrato na forma de micélio e em doses altas comparado às de *Trichoderma*. A inoculação de *Trichoderma* por imersão mostrou-se mais eficiente, uma vez que no primeiro ensaio, possibilitou observar efeito dos tratamentos nas diferentes variáveis analisadas.

Os teores de K apresentados pelas plantas também foram elevados nas parcelas não infestadas com patógeno, acima de 4,0%, maior que o observado no experimento anterior (Tabela 27). Dentro da cultivar Perinha Água Branca, observou-se teor de potássio igual a 5,67% na presença de *Rhizoctonia*, que diferiu estatisticamente do teor de 4,14% na ausência do patógeno.

Os resultados em substrato infestado com *Rhizoctonia* foram obtidos das mudas que sobreviveram ao tombamento, e onde algumas apresentavam alguma lesão ocasionada pelo patógeno e que não foram diferenciadas na coleta de amostras para análise. Desta forma os teores e conteúdos apresentados pelas análises demonstram o estado em que as mudas se apresentavam após sobreviverem a condição de stress ocasionado pela presença de patógeno, que neste ensaio ocasionou 42,62% de tombamento. De forma geral, o fornecimento equilibrado de K à planta diminui a incidência de doenças em razão do aumento da resistência à penetração e desenvolvimento de alguns patógenos (BASSETO *et al.*, 2007), uma vez que a síntese de proteínas, de açúcares, celulose, parede celular, amido são promovidos pelo potássio (MALAVOLTA & CROCOMO, 1982). O potássio não faz parte de nenhum composto orgânico na planta, não tendo função estrutural, mas sua principal função é de ativador enzimático (PRADO, 2008) de um grande número de enzimas encontradas nas células vegetais, principalmente dos grupos das sintetases, oxidoredutases, desidrogenase e quinases, estando estreitamente relacionado com os processos de assimilação de CO₂ e de nitrogênio, favorecendo a formação de compostos nitrogenados de alto peso molecular como as proteínas, e a síntese, translocação e armazenamento de açúcares (MALAVOLTA & CROCOMO, 1982). As interações que envolvem o potássio podem ser especialmente significativas, pois podem influenciar na disponibilidade de nutrientes, alterar processos fisiológicos vitais, levar a mudanças na qualidade e produção das culturas, sendo a interação entre nitrogênio e potássio muito estudada com respeito à produção de matéria seca, qualidade do produto colhido, bem como em relação a parâmetros como resistência à doença e acamamento da planta (USHERWOOD, 1982). Na cultura de soja, o incremento de K no solo, sob condições de casa-de-vegetação, não resultou em resposta positiva para controle cultural da mela ocasionada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, nem influenciaram no acúmulo de massa seca aos 42 dias após semeadura (BASSETO *et al.*, 2007). Neste experimento, apesar do teor de K mais elevado, também não se observou resposta positiva sobre o controle de tombamento.

Sob condições de nitrogênio adequado e de potássio inadequado, as plantas podem ficar mais suscetíveis a organismos responsáveis por podridão do colmo, e consequente

acamamento (USHERWOOD, 1982), por outro lado, aumentos no nível de K na planta além do ótimo não causa efeitos substanciais nos constituintes orgânicos e nem na resistência a doenças (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993). Os teores e conteúdos de K apresentados pelas plantas foram elevados nas plantas que sobreviveram ao tombamento.

Às vezes, um teor excessivo de K na planta também pode se manifestar comumente como carência de magnésio induzida (MALAVOLTA & CROCOMO, 1982), porém, análises de Ca e Mg não foram realizadas impossibilitando uma discussão a respeito. O conteúdo de K da parte vegetativa da planta, expresso como peso seco, é maior quanto mais jovem for o material, devido ao fato de que os materiais mais jovens são mais ricos em água (baixo teor de matéria seca) e esta água, presente principalmente nos vacúolos, necessita de K por razões osmóticas (MENGEL, 1982).

4 CONCLUSÕES

A influência dos tratamentos com os isolados de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento das plantas pode ser observada apenas no ensaio com menor ocorrência de tombamento das mudas.

O tratamento com o isolado de *Trichoderma* TENA33 resultou em maior porcentagem de emergência, menor percentual de tombamento, em relação aos demais tratamentos e melhor qualidade nutricional das mudas. O tratamento com o isolado TENA31 apresentou maior afinidade e interação com as sementes de tomate de ‘Garrafinha Vermelho’, favorecendo maior controle de tombamento nesta cultivar.

As cultivares testadas responderam de forma distinta nos tratamentos, independente da presença ou não de *Rhizoctonia solani*, com maior desenvolvimento de ‘Santa Clara Miss Brasil’ comparado a ‘Perinha Água Branca’ e ‘Garrafinha Vermelho’.

A ocorrência de tombamentos, e conseqüente redução do número de mudas por parcela, resultaram em maior acúmulo de massa seca e conteúdo de P e K e em menor competição entre plantas.

A avaliação do efeito de patógeno e dos tratamentos sobre o desenvolvimento das plantas é dificultado pela alteração da população de plantas ao longo do ensaio, sendo necessário o uso de delineamento e métodos de avaliação que corrijam este efeito.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. American Society for Microbiology: **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n° 7, p. 2926-2933. 1999.
- ANDRIOLO, J.L.; BOEMO, M.P.; BONINI, J.V. Crescimento e desenvolvimento de mudas de tomateiro e melão empregando os métodos de irrigação por microaspersão, inundação sub-superficial e flutuação. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, n.3, p. 332-335, nov. 2001.
- ARAÚJO, A.P.; MACHADO, C.T.T. Fósforo. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2006.
- BASSETO, M.A.; CERESINI, P.C.; VALÉRIO FILHO, W.V. Severidade da mela da soja causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em função de doses de potássio. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.1, p. 56-62. 2007.
- BENITEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v.7, n° 4, p. 249-260. 2004.
- CHANG, YA-CHUN; CHANG, YIH-CHANG; BAKER, R.; KLEIFELD, O. & CHET, I. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, Minnesota, v. 70, p. 145-148. 1986.
- DECHEN, A.R.; HAAG, H.P.; SARRUGE, J.R.; OLIVEIRA, G.D. Nutrição mineral de hortaliças – Efeitos de doses de cálcio na solução nutritiva, no desenvolvimento e nos teores de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: HAAG, H.P.; MINAMI, K. **Nutrição Mineral em Hortaliças**. 2ª edição. Campinas, SP: Fundação Cargill, 1998. 538 p.
- DINGHRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Long-Term storage of plant pathogens. In: **Basic Plant Pathology Methods**. 2nd.edition. USA: Lewis Publishers. p.61-66. 2000.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas**. 2ª edição. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p.
- FAYAD, J.A.; FONTES, P.C.R.; CARDOSO, A.A.; FINGER, F.L.; FERREIRA, F.A. Absorção de nutrientes pelo tomateiro cultivado sob condições de campo e de ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.1, mar. 2002.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura** – agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2ª edição. Viçosa: UFV, 2003. 421 p.
- HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Minnesota, v.84, n° 4, p. 377-393, abril. 2000.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, n° 2, jan, p. 43-56. 2004.

- HOWELL, C. R. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Minnesota, v.87, nº 1, p. 4-10. 2003.
- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 144, p. 267-272. 1992.
- LUCON, C.M.M. Sideróforos e controle biológico de fitopatógenos. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de. **Controle Biológico**. Jaquariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, v. 3, p. 141-161, 2000. 388 p.
- MALAVOLTA, E.; CROCOMO, O.J. Funções do potássio nas plantas. In: YAMADA, T.; IGUE, K.; MUZILI, O.; USHERWOOD, N.R. **Potássio na agricultura brasileira**. Londrina: Fundação IAPAR, 1982. 556p.
- MALAVOLTA, E. **ABC da Adubação**. 5ª edição. São Paulo: Agronômica Ceres, 1989. 292p.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 2006. 631 p.
- MARINGONI, A.C. Alterações nos teores de macronutrientes em plantas de feijoeiro infectadas por *Curtobacterium flacunfaciens* pv. *flacunfaciens*. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 27, n.1, p. 217-222, jan/fev. 2003.
- MENGEL, K. Fatores que afetam a demanda de potássio. In: YAMADA, T.; IGUE, K.; MUZILI, O.; USHERWOOD, N.R. **Potássio na agricultura brasileira**. Londrina: Fundação IAPAR, 1982. 556p.
- PRADO, R.de.M. **Nutrição de Plantas**. São Paulo: UNESP, 2008. 407 p.
- SUDO-MARTELLETO, M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o tratamento de sementes de tomate visando a proteção contra patógenos de solo e de armazenamento e promoção de crescimento**. Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Dissertação de Mestrado, 2005. 112p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p .
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS – Departamento de solos. 1995. 174p.
- TSAHOURIDOU, P.C.; THANASSOULOPOULOS, C.C. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Grã-Bretanha, v. 34, p. 767-776. 2002.
- USHERWOOD, N.R. Interações do potássio com outros íons. In: YAMADA, T.; IGUE, K.; MUZILI, O.; USHERWOOD, N.R. **Potássio na agricultura brasileira**. Londrina: Fundação IAPAR, 1982. 556p.
- WINDHAM, M.T.; ELAD, Y. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Minnesota, v. 76, nº 5, p. 518-521. 1986.

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

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

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. In: FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo: RAPP, v.1, p.275-318. 1993.

CAPÍTULO V

**TRATAMENTOS TÉRMICO E QUÍMICO DE SEMENTES DE
TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ASSOCIADOS À
MICROBIOLIZAÇÃO COM *Trichoderma* spp.**

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da associação entre tratamentos térmico e químico e a microbiolização de sementes de tomate com isolados previamente selecionados de *Trichoderma* spp. Foram utilizadas sementes de tomate da cultivar Perinha Água Branca, quatro tratamentos de erradicação de patógenos das sementes: i) tratamento térmico, via calor seco a 70 °C, por 96 h; ii) tratamento térmico via úmida com água a 50 °C, durante 30 min; iii) HCl a 5%, durante 10 min, iv) e testemunha sem qualquer pré-tratamento, associados à aplicação de tratamentos de microbiolização com isolados de *Trichoderma* spp. i) TENA7, ii) TENA16 e iii) TENA7 + TENA16; iv) fungicida captan (3g de captan/1000 g de sementes), e v) testemunha. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 4x5, com quatro repetições. Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados foram aplicados à concentração de 5×10^4 conídios.mL⁻¹ em água destilada com tween 80 por meio da imersão das mesmas na suspensão de conídios durante 10 min. As sementes foram semeadas em caixas tipo gerbox com papel e em bandejas de alumínio contendo substrato para produção de mudas de hortaliças, com 50 sementes/parcela. O teste nas condições de gerbox demonstrou ser um bom método para diagnosticar o sucesso do processo de inoculação, detectando a presença do organismo biológico protetor utilizado na microbiolização; os tratamentos com água a 50° C durante 30 min e com HCl a 5% durante 10 min associados a protetor biológico TENA16, apresentaram boa porcentagem final de germinação. O tratamento de sementes via calor seco a 70° C/ 96 hs associado a protetor biológico resultou em baixa germinação de sementes tanto em gerbox quanto em substrato. Em substrato, os tratamentos de sementes com água quente associados a TENA7 ou a TENA16 como protetores biológicos apresentaram os melhores resultados de emergência aos 14 DAS. A associação de tratamento com HCl a 5% por 10 min com o isolado TENA7 de *Trichoderma* foi o que proporcionou maior porcentagem de emergência aos 15 dias e de massa seca de raízes aos 30 dias após o semeio.

Palavras-chave: proteção de sementes, erradicação de patógenos, controle biológico.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of the combination between thermal and chemical treatments and microbiolization of tomato seeds with previously selected isolates of *Trichoderma* spp. Were used tomato seeds of cultivar 'Perinha Água Branca', four treatments for the eradication of pathogens from seed: i) heat treatment, via dry heat to 70 °C for 96 h, ii) wet heat treatment with water at 50 ° C for 30 min, iii) 5% HCl for 10 min, iv) and control without any pre-treatment, with the introduction of treatments microbiolization with *Trichoderma* spp. i) TENA7, ii) TENA16, iii) TENA7 + TENA16, iv) captan fungicide (3g captan/1000 g of seeds), and v) control. Were used the design of randomized blocks in factorial scheme 4x5, with four replications. Isolates of *Trichoderma* spp. were applied to the concentration of 5×10^4 conidia.mL⁻¹ in distilled water with Tween 80 by immersing the samples in the conidial suspension for 10 minutes. Seeds were sown in boxes gerbox with paper and aluminum trays containing substrate for growing seedlings of vegetables, with 50 seeds per plot. The gerbox test conditions proved a good method to diagnose the success of the inoculation process, detecting the presence of the biological organism protector used in microbiolization; treatments with water at 50 ° C for 30 minutes and with HCl 5% during 10 minutes associated with biological protector TENA16, had good final germination percentage. Seed treatment by dry heat at 70 ° C / 96 hours associated with biological shield resulted in low germination in both seedling and in the substrate. On a substrate, the seed treatment with hot water associated with TENA7 or TENA16 as biological protectors presenting results of emergency at 14 DAS. The association of treatment with 5% HCl for 10 minutes with the strain of *Trichoderma* TENA7 promoted the highest percentage of emergency for 15 days and dry weight of roots at 30 days after sowing.

Keywords: protection of seed, eradication of pathogens, biological control.

1 INTRODUÇÃO

As sementes infectadas constituem um dos mais eficientes meios de disseminação de patógenos de plantas. Semente contendo estruturas de patógeno em sua superfície ou interior é fonte primária de inóculo, desempenhando papel capital na transmissão ou introdução de doenças num novo ambiente de cultivo. O uso de lotes de sementes contaminadas, mesmo que em baixas proporções, pode resultar em graves epidemias no campo, e ainda afetar diretamente a produtividade e o rendimento da cultura, ainda que não ocorra a morte total das plantas (AGRIOS, 1997; CARMO *et al.*, 1996b).

A intensidade com que patógenos ocorrem no viveiro ou no campo, e conseqüentemente os danos causados, depende de uma série de fatores como condições de ambiente predominante, suscetibilidade da cultivar plantada, virulência do patógeno além dos diferentes aspectos relacionados ao manejo da cultura. Além destes fatores, a quantidade inicial do inóculo é fator crítico para o estabelecimento da doença e desenvolvimento da epidemia. Neste particular, as sementes podem representar importante fonte de inóculo primário quando não são observados a sua qualidade sanitária, nem métodos de tratamento eficientes (BAKER & SMITH, 1966; MACHADO, 2004; MARCOS FILHO, 2005).

O tratamento de sementes pode ser entendido como qualquer operação que envolva as sementes, visando melhoria ou garantia de seu desempenho em condições de cultivo (MACHADO, 2000). O tratamento de sementes pode ser feito pela aplicação de produtos de natureza química, biológica, nutricional ou hormonal, de processos como embebição ou secagem, ou de distintas formas de energia como a irradiação, calor, magnetismo ou eletricidade (GIMÉNEZ-SAMPAIO & SAMPAIO, 1994). O tratamento de sementes, visando o controle, pode ser feito pela aplicação de procedimentos que resultem na eliminação do inóculo associado às sementes, proteção das sementes e da parte aérea contra ataque de patógenos presentes no solo e prevenção da transmissão e disseminação de inóculo (MACHADO, 2000).

Desde a descoberta do tratamento de sementes para controlar doenças, uma grande variedade de alternativas químicas, biológicas, físicas e mecânicas têm sido usado para eliminar patógenos da porção interna e externa de sementes, e para ajudar na proteção das sementes contra patógenos do solo (NEERGARD, 1977).

A semente em germinação e o solo ao seu redor representam um rico habitat para o desenvolvimento de microrganismos e o estabelecimento dos mesmos (NELSON, 2004). A maior parte dos trabalhos com tratamento biológico de sementes visa principalmente controlar os patógenos que causam as podridões de sementes, o tombamento, a morte das plântulas e as podridões radiculares, sendo verificado também ação sobre o crescimento das plantas relacionado com a inibição de patógenos secundários da rizosfera (LUZ, 1993).

A produtividade do tomateiro pode ser significativamente reduzida por várias doenças de etiologia fúngica e bacteriana. Várias destas doenças têm as sementes como a principal fonte de inóculo primário (MACHADO, 2000; KIMURA, 1984; SCHAAD, 1982; SCHAAD, 1988; SHARON *et al.*, 1982; SHEKHAWAT & CHACKRAVARTI, 1979) e a sua utilização pode resultar em severas epidemias no viveiro e no campo, ocasionando grandes perdas na produção (CARMO *et al.*, 1996; HARMAN, 1983; RICHARDSON, 1979). Entre as principais doenças fúngicas transmitidas por sementes estão a pinta preta ou mancha de alternária, causada por *Alternaria solani* (Ell. & Martin) Jones & Grout; a septoriose ou mancha de septoria, causada por *Septoria lycopersici* Speg.; a mancha de stenfilio, causada por *Stemphylium solani* Weber, a requeima do tomateiro causada por *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary e a murcha de fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen; a antracnose, ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (KUROZAWA & PAVAN, 1997; ZAMBOLIM *et al.*, 2000).

A eficiência da transmissão de patógenos pelas sementes e a intensidade dos danos causados no viveiro ou no campo dependem de uma série de fatores como a natureza do próprio patógeno e sua virulência, condições de ambiente predominante, suscetibilidade da cultivar plantada além dos diferentes aspectos relacionados ao manejo da cultura.

Entre os métodos de tratamento mais eficientes está o tratamento térmico com o uso de calor, e o tratamento químico com ácido clorídrico (KIMURA, 1991; MARINGONI & KUROSZAWA, 1994; MACHADO, 2000; SILVA *et al.*, 2002; CARMO *et al.*, 2004). Estes métodos de tratamento não são seletivos, e atuam contra fitobactérias e outros microrganismos residentes nas sementes. A ação do calor pode atingir estruturas de patógenos, bem como de outros microrganismos localizados externa e internamente nas sementes (MACHADO, 2000). O princípio básico deste tratamento é baseado na diferença dos pontos térmicos letais do patógeno e da semente, e a possibilidade de sucesso reside na diferença entre a temperatura para inativação do patógeno e da semente (BAKER, 1966; MACHADO, 2000).

O tratamento das sementes com ácido clorídrico a 5% é feito principalmente para a erradicação de patógenos por meio da desinfecção superficial. Neste tipo de tratamento há uma maior eficiência no controle de patógenos localizados na parte externa das sementes, podendo também ocorrer redução da germinação (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1997).

O tratamento térmico e o tratamento com ácido clorídrico não oferecem uma proteção residual às sementes, anulando uma ação preventiva contra patógenos presentes no solo. A utilização de *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. pode vir a ser um método complementar de grande valia, agindo como protetor de sementes, de raízes e de plântulas, promotor de germinação e da qualidade das mudas e da cultura, além de benefícios relativos à microflora e à diversidade (PAPAVIZAS, 1985).

A utilização de uma associação de tratamentos térmicos e químicos com a inoculação de microrganismos antagonistas de controle biológico, como *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp., sobre as sementes é uma alternativa que deve ser melhor estudada. Isolados de *Trichoderma* spp. aplicados à semente podem proteger a plântula por serem os primeiros colonizadores da rizosfera (SIVAN & CHET, 1989; LUZ, 1993; MELO, 1996), proporcionando proteção contra diversos patógenos de solo. Estes microrganismos são citados ainda como promotores de crescimento (ALTOMARE *et al.*, 1999; INBAR *et al.*, 1994; KLEIFELD & CHET, 1992; WINDHAM & ELAD, 1986; YEDIDIA, 2001).

O uso de técnicas de controle biológico no manejo de doenças, apesar das muitas pesquisas e do reconhecido potencial, esbarra na falta de dados práticos e de métodos de aplicação que tornem a técnica rotineira para os produtores. Uma das alternativas bastante citadas é a associação entre a aplicação de microrganismos antagonistas às sementes (microbiolização) associado a métodos de tratamentos para erradicação de fitopatógenos das sementes como a termoterapia (REIFSCHNEIDER, 1985; SILVA *et al.*, 2002; CARMO *et al.*, 2004), ácido clorídrico (MARINGONI & KUROSZAWA, 1994; CARMO *et al.*, 2004), antibióticos e fungicidas (MENTEN, 1995; MACHADO, 2000). Estes procedimentos podem reduzir drasticamente a microflora das sementes (MACHADO, 2000) e a aplicação de microrganismos benéficos previamente selecionados poderia vir a contribuir para proteção das sementes e plântulas devido ao estabelecimento destes como colonizadores primários da região da espermosfera e da rizosfera, impedindo ou reduzindo a ação de patógenos originalmente presentes nas sementes ou no solo ou substrato.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de tratamentos térmicos e químico e associados à microbiolização com isolados previamente selecionados de *Trichoderma* spp. sobre a qualidade das sementes e plântulas de tomate.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Utilizaram-se sementes de tomate, cultivar Perinha Água Branca. As sementes foram obtidas de frutos maduros, recém-colhidos em plantio realizado no Setor de Horticultura do Instituto de Agronomia da UFRRJ, no período de julho a novembro de 2008, e retiradas manualmente. Logo após a extração das sementes estas foram postas para fermentar por três dias no próprio suco do fruto sem adição de água. A seguir, foram lavadas em água corrente com auxílio de peneira granulométrica, postas para secar em estufa de ventilação forçada a 25°C, por três dias e armazenadas em recipiente de vidro sob refrigeração de geladeira.

Foram avaliados quatro tratamentos de erradicação de patógenos das sementes, a saber: (i) tratamento térmico, via calor seco a 70 °C por 96 h sob ventilação forçada (SILVA *et al.*, 2002; CARMO *et al.*, 2004), (ii) tratamento térmico via úmida com água mantida a 50 °C por 30 min (REIFSCHNEIDER, 1985; CARMO *et al.*, 2004); (iii) HCl a 5% por 10 min (MARINGONI & KUROZAWA, 1994; CARMO *et al.*, 2004); além da (iv) testemunha sem qualquer pré-tratamento, associados à aplicação de tratamentos de proteção, a saber: microbiolização com isolados de *Trichoderma* sp. (i) TENA7 (isolado de raiz de tomate), (ii) TENA16 (isolado de madeira de pinho) e (iii) TENA7+TENA16, (iv) fungicida captan (3g de captan/1000 g de sementes) e (v) testemunha. A microbiolização foi feita na concentração de 5×10^4 conídios.mL⁻¹ em água contendo uma gota de tween 80 por L⁻¹. A aplicação dos tratamentos de proteção foi feita logo após os tratamentos de erradicação das sementes, por meio da imersão das mesmas na suspensão de conídios por 10 min. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 4x5, totalizando 20 tratamentos, com quatro repetições.

As sementes foram submetidas aos seguintes testes para avaliação da qualidade fisiológica: teste de germinação, teste de emergência em substrato, peso da matéria seca de raiz e de parte aérea.

O teste padrão de germinação foi conduzido em caixas plásticas tipo gerbox contendo três folhas de papel germiteste, umedecido com água esterilizada em proporção de 2,5 vezes o peso do papel, com a distribuição de 50 sementes por caixa. As caixas gerbox foram acondicionadas em germinador regulado para a temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 hs e 80% de umidade relativa. As avaliações foram realizadas aos cinco e 14 dias após a semeadura, e foram avaliadas seguindo as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), e para a qualidade sanitária conforme metodologia descrita por Silva *et al.* (2002). O teste de emergência em substrato comercial para hortaliças, foi feito simultaneamente ao teste em gerbox, com quatro repetições de 50 sementes. Utilizaram-se caixas de alumínio, 22,0 x 15,0x 5,0 cm contendo substrato comercial para produção de mudas (Plantmax®) e a distribuição de 50 sementes por caixa. O semeio foi feito a 1,5 cm de profundidade e as caixas acondicionadas em germinador regulado para 25° C e 12 hs de fotoperíodo. As avaliações de emergência foram feitas aos cinco, 14 e 30 dias após o semeio contando-se o número de plântulas emergidas. A avaliação da massa seca das mudas foi realizada aos 30 dias após semeadura. As mudas emergidas foram cuidadosamente retiradas e seccionadas em duas partes, raízes e parte aérea. As raízes foram lavadas em água corrente e em seguida as amostras foram retiradas para isolamentos em meio BDA visando a recuperação do isolado originalmente inoculado conforme Carvalho (2004). A parte aérea e as raízes restantes foram colocadas em sacos de papel, e secas em estufa com circulação de ar à temperatura de 70° C, durante três dias, quando atingiu peso constante.

Os dados obtidos, em porcentagem, foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se efeito significativo de tratamento de erradicação, de tratamento para proteção e de interação entre estes sobre a porcentagem de germinação e de emergências das plântulas de tomate, avaliados aos cinco e 14 dias após o semeio.

As sementes sem qualquer tratamento térmico ou químico associado ao fungicida, bem como a testemunha sem associação com protetor, apresentaram 92,50% e 92,00% de germinação, respectivamente (Tabela 33).

A porcentagem de germinação das sementes aos cinco dias, no teste em caixas tipo gerbox, foi muito baixa na maioria dos tratamentos, sendo, porém, significativamente maior no tratamento com HCl sem associação com protetor, 12,00% (Tabela 33). Nas condições de gerbox, aos cinco dias, 100% das sementes microbiolizadas com isolados de *Trichoderma* apresentavam-se colonizadas pelo fungo, facilmente visível a olho nu nas sementes tratadas com TENA16, devido à sua coloração verde mais escura, e com auxílio de microscópio ótico nas sementes tratadas com o isolado TENA7. Em gerbox, os tratamentos com fungicida e testemunha não apresentaram incidência dos antagonistas, indicando ausência de contaminação entre as parcelas.

Tabela 33: Efeito do tratamento de sementes e microbiolização com isolados de *Trichoderma* spp. sobre a germinação de tomate cultivar 'Perinha Água Branca', semeadas em caixas plásticas tipo gerbox com papel germitest. Seropédica, 2009.

Germinação aos 5 DAS (%) em papel					
Tratamentos	Protetores				
	TENA7	TENA16	TENA7+TENA16	Fungicida	Testemunha
HCl	0,00 a B	0,50 a B	0,00 a B	0,50 a B	12,00 aA
50° C	0,00 a B	0,50 a B	0,00 a B	0,00 a B	4,50 bA
70° C	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 cA
Sem tratamento	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	1,50 aA	1,00 bcA
C.V. (%)	39,26				
Germinação aos 14 DAS (%) em papel					
Tratamentos	Protetores				
	TENA7	TENA16	TENA7+TENA16	Fungicida	Testemunha
HCl	1,50 aB	66,50 aA	1,50 aB	88,50 aA	79,50 abA
50° C	3,50 aB	75,00 aA	2,00 aB	87,00 aA	66,00 abA
70° C	2,00 a C	27,00 bB	2,50 a C	45,50 bA	60,00 bA
Sem tratamento	1,50 a C	58,50 a B	7,50 a C	92,50 aA	92,00 aA
C.V. (%)	24,53				

Letras minúsculas iguais seguidas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 4 repetições.

Aos 14 dias, observou-se maior porcentual de germinação das sementes resultantes dos tratamentos com HCl e com água quente a 50° C associados à aplicação do isolado TENA 16, ao fungicida ou sem nenhum tratamento (testemunha), comparado aos mesmos tratamentos associados com TENA 07 e TENA 07+ TENA 16 (Tabela 33).

Carmo *et al.* (2004) citam que em testes realizados em caixas gerbox com sementes de tomate, o tratamento com HCl a 5% durante 10 min, foi eficiente na erradicação de *Xanthomonas vesicatoria*, porém afetou a qualidade de sementes, apresentando cerca de 21 % de germinação aos 15 dias, que pode estar relacionado a efeito residual de HCl. Este resultado relatado é inferior ao observado no presente trabalho, onde procedeu-se intensa lavagem das sementes após o tratamento químico.

Entre os métodos de erradicação, observou-se menor porcentagem de germinação nas sementes submetidas ao tratamento térmico a seco (70 °C por 96 hs), independente do tratamento posterior para proteção das sementes, indicando efeito deletério deste procedimento sobre as sementes de tomate, reduzindo o vigor e a germinação. A exposição ao calor seco a 70° C por 96 hs controlou *Xanthomonas vesicatoria* pv. *vesicatoria*, bem como *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp. e outras bactérias como *Erwinia* e *Bacillus* (CARMO *et al.*, 2004), mas pode provocar redução do vigor, da germinação das sementes, devido à maior lixiviação de exsudados (LOPES & ROSSETO, 2004) e alterações na estrutura destas, como na região dos tricomas, provavelmente devido ao reduzido teor de água das sementes submetidas a esse tratamento (SILVA *et al.*, 2002). Este fenômeno está diretamente relacionado à liberação de exsudatos durante o processo de embebição. Sementes mais secas apresentam maior liberação de exsudados do que as mais úmidas, acarretando prejuízos pela entrada mais rápida de água (MARCOS FILHO, 2005), o que sugere ser necessário um período de adaptação das sementes em temperatura ambiente, antes de submetê-la ao processo de inoculação. Provavelmente o processo de inoculação com *Trichoderma* spp. por meio de imersão em solução com água, acentuou os danos aos tecidos e conseqüentemente a capacidade germinativa das mesmas, comprovado pela baixa germinação nos tratamentos com inoculação comparado ao tratamento térmico a 70° apenas (60%), como pode ser observado na avaliação de germinação aos 14 dias (Tabela 33). A porcentagem de germinação das sementes submetidas ao tratamento térmico a 70° C/ 96h, foi semelhante à obtida por Carmo *et al.* (2004).

Os resultados para a velocidade de emergência avaliados em substrato (Tabela 34), diferem daqueles observados em caixas tipo gerbox (Tabela 33). No substrato, observaram-se porcentagem de emergência aos cinco dias muito maior que a de germinação aos cinco dias em caixas gerbox, exceto para o tratamento a 70° C, que se manteve baixa (menor que 3,0%) (Tabela 34). De forma geral, as maiores velocidades de emergência foram observadas nos tratamentos com HCl e a 50° C associados com TENA 16 e TENA 07 e a combinação destes, comparada aos tratamentos com fungicida e a testemunha.

O tratamento de sementes em água quente a 50° C associado à microbiolização com o isolado *Trichoderma* TENA16 foi o que apresentou melhores resultados aos cinco DAS (dias após semeadura), com 54,50% de plântulas emergidas, e na avaliação aos 14 DAS, apresentou 72,50% de emergência (Tabela 33).

Tabela 34: Efeito do tratamento de sementes e microbiolização com isolados de *Trichoderma* spp. sobre a emergência de tomate cultivar Perinha Água Branca, semeadas em bandejas contendo substrato. Seropédica, 2009.

Emergência aos 5 DAS (%) em Substrato					
Tratamentos	Protetores			Fungicida	Testemunha
	TENA7	TENA16	TENA7+TENA16		
HCl	42,50 aA	36,50 aA	41,00 aA	26,00 aA	29,00 aA
50° C	48,50 aAB	54,50 aA	48,50 aAB	20,50 abC	30,00 aBC
70° C	0,00 bA	3,00 bA	1,00 bA	1,00 cA	2,00 cA
Sem tratamento	39,00 aA	39,00 aA	36,50 aA	12,50 bB	11,50 bB
C.V. (%)	17,68				
Emergência aos 14 DAS (%) em Substrato					
Tratamentos	Protetores			Fungicida	Testemunha
	TENA7	TENA16	TENA7+TENA16		
HCl	51,50 abA	56,00 aA	57,00 aA	49,00 aA	42,00 aA
50° C	73,00 aA	72,50 aA	67,00 aAB	47,50 aAB	44,00 aB
70° C	4,00 cB	11,00 bAB	17,50 bA	16,50 bA	9,50 bAB
Sem tratamento	43,00 bA	48,00 aA	48,00 aA	30,50 abAB	18,00 bB
C.V. (%)	15,50				

Letras minúsculas seguidas na mesma coluna e letras maiúsculas seguidas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 4 repetições.

Na avaliação de emergência aos 14 dias em substrato, os tratamentos com HCl e em água quente a 50° C associados com *Trichoderma* spp. TENA7 e TENA16, proporcionaram melhor emergência em relação à testemunha sem tratamento (Tabela 34).

O efeito da presença dos isolados de *Trichoderma* foi mais acentuado nas sementes sem tratamento de erradicação. Os tratamentos com os isolados TENA7, TENA16 e associação destes, resultaram em 43,0%, 48,0% e 48,0% de emergência aos 14 dias, respectivamente, enquanto a testemunha sem tratamento apresentou emergência significativamente menor, apenas 18%.

Aos 14 dias, as sementes inoculadas com os isolados TENA7 ou TENA16 após o tratamento térmico a 50° C, apresentaram maiores porcentagens de emergência em substrato, 73% e 72,50%, respectivamente, significativamente superior à testemunha (Tabela 34). As sementes submetidas a tratamento térmico a 70° C apresentaram baixa porcentagem de emergência em substrato, tanto aos cinco quanto aos 14 DAS, associado ou não a um protetor, devido provavelmente a danos nas sementes pelo tratamento (CARMO *et al.*, 2004; MARCOS FILHO, 2005).

O uso de isolados de *Trichoderma* spp. pré-selecionados podem vir a ser bons protetores, principalmente quando em complemento após os tratamentos das sementes com HCl a 5% e água quente a 50° C. O tratamento térmico das sementes de hortaliças com água quente tem sido pouco utilizado, mas apresenta amplo espectro, podendo ser aplicado em diversas culturas para erradicação de diversos patógenos (REIFSCHNEIDER *et al.*, 1985).

Diferenças de resultados entre os testes em gerbox com papel germiteste e em bandejas com substrato devem-se às diferenças entre os dois substratos quanto à disponibilidade de exsudados liberados pela semente e raiz, além da composição microbiológica dos mesmos.

A contagem da porcentagem de germinação feita em condições de gerbox é um critério comumente utilizado em testes de qualidade de sementes, e este tipo de avaliação é feito associado à contagem de plântulas germinadas anormais ou normais, complementando informações a respeito da condição fisiológica apresentada pelas sementes. Apesar de, neste

ensaio, não ter sido contabilizada a porcentagem de plântulas normais e anormais, é interessante relatar que os tratamentos associados com fungicida, e testemunha, apresentaram plântulas normais, com bom desenvolvimento das folhas e pares cotiledonares, ao contrário do que foi observado nas associações com os isolados TENA7 ou TENA16. Nos tratamentos associados com o isolado TENA16, as sementes apresentaram boa germinação, porém o desenvolvimento das plântulas foi interrompido, além de lesões nas folhas cotiledonares, o que as enquadrariam como plântulas anormais. As sementes dos tratamentos associados com o isolado TENA7, tiveram seu desenvolvimento interrompido logo após a emissão da radícula. Esta informação indica rápida colonização por TENA7, principalmente durante a fase de embebição, e de TENA16, após a germinação das sementes. Este comportamento pode estar associado provavelmente, ao tipo de enzimas produzidas pelos respectivos isolados e à qualidade dos exsudados liberados em cada fase do processo de germinação. A rápida colonização das sementes pelos isolados de *Trichoderma*, afetou o desenvolvimento das plântulas em condições de gerbox, conforme já relatado por SUDO-MARTELLETO (2005), porém tal ocorrência não se repetiu no ensaio em condições de substrato para produção de mudas de hortaliças. O teste de germinação é realizado sob condições altamente favoráveis às sementes, e conduzem a superestimativa do potencial fisiológico das sementes para dar origem às plântulas normais (MARCOS FILHO, 2005), porém o que se viu neste teste, é que o ambiente proporcionado às sementes também foi altamente propício ao desenvolvimento dos isolados de *Trichoderma* spp., principalmente pela falta de competição biológica e pela disponibilidade dos exsudados liberados pelas sementes e pelas radículas. Num ambiente asséptico, os exsudados liberados pela semente durante a embebição (MARCOS FILHO, 2005; NELSON, 2004), favorecem a rápida multiplicação de *Trichoderma* spp. que associada às condições propícias ao seu desenvolvimento resulta na produção de enzimas que atuam na quebra de polissacarídeos, quitinas e β -glucanas (HOWELL, 2003). Como *Trichoderma* spp. são saprófitas, são hábeis em crescer sobre uma variedade de hidratos de carbono complexos e substratos nitrogenados, com uma marcante habilidade biossintética (KUBICEK & HARMAN, 1998), que pode ser observado já nos primeiros dias de avaliação em gerbox. As enzimas têm a propriedade de catalisar transformações de moléculas orgânicas em condições brandas de reação e, uma vez elaboradas, podem atuar independente da presença da célula que a produziu, desde que o pH, a temperatura e o substrato, entre outros fatores, sejam adequados (ALBERTS *et al.*, 2004). O efeito deletério do isolado TENA 07 sobre as sementes de tomate, observado no ensaio em Gerbox, não se repetiu no teste em substrato, apresentando-se as plântulas totalmente normais. No ambiente de substrato, há competição com outros microrganismos e a dispersão de enzimas e exsudatos é favorecida. Esta tendência, de plântulas normais, se manteve na avaliação realizada aos 14 dias (Tabela 34).

Na avaliação das mudas, através da medição de massa seca, observou-se efeito significativo da interação entre tratamento e microbiolização sobre a massa seca de raiz (g.planta^{-1}) avaliado aos 30 dias após o semeio e nenhum efeito sobre a massa seca de parte aérea.

Como as mudas foram desenvolvidas em condições de germinador com luminosidade baixa e alta densidade, o seu desenvolvimento foi reduzido, confirmado pelos baixos teores de massa seca e pelo aspecto estiolado e heterogeneidade no desenvolvimento devido à distribuição irregular da luz.

Nestas condições, observou-se diferenças significativas entre os tratamentos de erradicação apenas dentro da testemunha e do tratamento com HCl, sem qualquer tratamento de proteção, com menor massa seca de raízes. A massa seca das mudas foi significativamente maior no tratamento térmico úmido a 50° C, seguido do tratamento térmico a 70° C que por sua vez, não diferiu do tratamento com HCl a 5% e da testemunha (Tabela 35).

Tabela 35: Efeito do tratamento de sementes e microbiolização com isolados de *Trichoderma* spp. sobre a massa seca aos 30 dias após semeadura de tomate cultivar Perinha Água Branca, em bandejas contendo substrato. Seropédica, 2009.

Tratamentos	Massa Seca de Raízes (mg.planta ⁻¹)				
	Protetores			Fungicida	Testemunha
	TENA7	TENA16	TENA7+TENA16		
HCl	2,3283 aA	1,1736 aA	0,8163 aA	2,1734 aA	0,4836 bA
50	0,5673 aA	0,8136 aA	1,2644 aA	2,1333 aA	2,8598 aA
70	0,4600 aA	0,5100 aA	0,7194 aA	1,6891 aA	0,8200 abA
Sem tratamento	1,8657 aA	1,6791 aA	0,9312 aA	0,3389 aA	0,4972 bA
C.V. (%)	98,03				

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 4 repetições.

4 CONCLUSÕES

A análise de sementes em condições de gerbox é um bom método para diagnosticar o sucesso do processo de inoculação, detectando a presença do organismo biológico utilizado na microbiolização, porém é inadequado para avaliar os tratamentos com microbiolização das sementes.

O tratamento de sementes via calor seco a 70° C/ 96 horas resulta em baixa germinação de sementes tanto em gerbox quanto em substrato.

A associação entre tratamentos de erradicação com água quente a 50° C por 30 min, e com HCl a 5% por 10 min, associado a *Trichoderma* TENA7 ou TENA16 como protetores biológicos mostraram-se promissores.

O isolado TENA7 é extremamente agressivo, com rápida colonização de sementes durante o processo de germinação em caixas gerbox.

Os resultados indicam viabilidade do uso de tratamentos de erradicação seguido de microbiolização.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L.A.; KIMURA, O.; AKIBA, F.; CASTILHO, A.M.C.; CASTILHO, K.S.C.; CARMO, M.G.F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Agronomia**, Seropédica, v. 18 (1/2), 78-82. 2000.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 4ª edição, Porto Alegre, RS, 2004. 1463 p.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. American Society for Microbiology: **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n° 7, p. 2926-2933. 1999.
- BAKER, K.F.; SMITH, S.H. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.4, p. 311-334. 1966.
- CARMO, M.G.F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L.A.; CARVALHO, A.O.C. Determinação do nível de tolerância de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 336-341. 1996a.
- CARMO, M.G.F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L.A.; CARVALHO, A.O.C. Progresso da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em condições de viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 66-70. 1996b.
- CARMO, M.G.F.; MAFFIA, L.A.; KIMURA, O.; CARVALHO, A.O.C. Disseminação da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em condições de viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 85-93. 1996c.
- CARMO, M.G.F.; CORREA, F.M.; CORDEIRO, E.S.; CARVALHO, A.O.; ROSSETTO, C.A.V. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.579-584, jul-set 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/hb/v22n3/a15v22n3.pdf>
- GIMÉNEZ-SAMPAIO T.; SAMPAIO, N.V. Recobrimento de sementes. Curitiba, PR: **Informativo ABRATES**, v.4, n° 3, dez. 1994.
- HARMAN, G.E. Mechanisms of seed infection and pathogenesis. **Phytopathology**, Minnesota, v.73, p. 326-329. 1983.
- HEATHER, P. W.; O. GARRO, L.W. Bacterial spot of pepper and tomato in Barbados. **Plant Disease**, Minnesota, v.76, p. 1046-1048. 1992.
- HOWELL, C. R. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Minnesota, v.87, n° 1, p. 4-10. 2003.
- INBAR, J.; ABRAMSKY, M.; CHET, I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 337-346. 1994.

- JONES, J.B.; WOLTZ, S.S.; JONES, J.P.; PORTIER, K.L. Population dinamica of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with Koper bactericides. **Phytopathology**, Minnesota, v. 81, p. 714-719. 1991.
- KIMURA, O. Enfermidades bacterianas do pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, p. 39-41. 1984.
- KIMURA, O.; CARMO, M.G.F. Enfermidades bacterianas do pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, p. 66-73, 1996.
- KIMURA, O. Controle de fitobactérias em hortaliças através do tratamento térmico de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Itaguaí, v.6, suplemento, p.8. 1991 (Palestra).
- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants nad effect on growth response. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 144, p. 267-272. 1992.
- KUBICEK, C.P.; HARMAN, G.E. ***Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics**. USA, v.1, 1998. 278 p.
- KUROZAWA, C. & PAVAN, M.A. Doenças do Tomateiro (*Lycopersicum esculentum* Mill.). In: KIMATI,H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**: Doenças de Plantas Cultivadas. 3^a.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v.2., p.690-719. 1997.
- LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças**: diagnose e controle. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1997. 70 p.
- LOPES, F.S.; ROSSETTO, C.A.V. Qualidade de sementes de tomate influenciada pelos tratamentos térmico e osmótico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p. 642-646, jul-set 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/hb/v22n3/a29v22n3.pdf>
- LUZ, W.C. da. Microbiolização de sementes para o controle de doenças. In: LUZ, W.C. da; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M. ; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS: RAPP, v.1, p. 33-77. 1993. 417 p.
- MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA, 2000. 138p.
- MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M. das G.G.C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 62-67. 2004.
- MARCO, G.M.; STALL, R.E. Control of bacterial spot of pepper initiated by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensibility to copper. **Plant Disease**, Minnesota, v. 67, p. 779-781. 1983.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.
- MARINGONI, A.C.; KUROZAWA, C. Erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n.2, p. 191-194. 1994.

MELO, I. S. de. *Trichoderma* e *Gliocladium* com bioprotetores de plantas. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS: RAPP, v.4, p.261-295. 1996. 415 p.

MENTEN, J.O. **Patógenos em sementes** – detecção, danos e controle químico. São Paulo: Ciba Agro, 1995. 321 p.

NEERGARD, P. **Seed Pathology**. London: MacMillan, v.1, 1977. 838p.

NELSON, E.B. Microbial Dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Reviews of Phytopathology**, n. 42, p. 271-309. 2004.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Reviews of Phytopathology**, Minnesota, v. 23, p. 23-54. 1985.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CUNHA, M.M.; GUEDES, A;C. Diagnóstico da patologia de sementes de hortaliças no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 125-132. 1985.

RICHARDSON, M.J. **An annotated list of seed-borne disease**. 3.ed. Kew, *Comonwealth Mycollogical Institute*, 320p. 1979.

ROBBS, C.F.; VIEGAS, E. de C. I **Olerícolas**: Guia de controle às pragas e doenças das culturas econômicas do Estado do Rio de Janeiro. Secretaria de Estado de Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro. Departamento Geral de Agropecuária. Divisão de defesa sanitária vegetal. 1978.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2ª edição. Viçosa : UFV, 2005. 417 p.

SCHAAD, N.W. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. **Plant Disease**, Minnesota, v. 66, p. 885-890. 1982.

_____. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. Saint Paul: **Phytopathology**, Minnesota, v. 78, p. 872-875. 1988.

SHARON, E.; BASHAN, Y.; DENIS, Y. Detached leaf enrichment: a method for detecting small numbers of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in seed and symptom less leaves of tomato and pepper. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 53, p. 371-377. 1982.

SHEKHAWAT, P.S.; CHACKRAVARTI, B.P. Comparison of agar-plate and cotyledon method for the detection of *Xanthomonas vesicatoria* in chili seeds. **Phytopathology** v. 94, p. 80-83. 1979.

SILVA, A.M.S.; CARMO, M.G.F.; OLIVARES, F.L.; PEREIRA, A.J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 586-593. 2002.

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

STALL, R.E.; THAYER, P.L. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. **Plant Disease Reporter**, v. 46, p. 389-390. 1962.

SUDO-MARTELLETO, M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o tratamento de sementes de tomate visando a proteção contra patógenos de solo e de armazenamento e promoção de crescimento.** Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Dissertação de Mestrado, 2005. 112p.

WINDHAM, M.T.; ELAD, Y. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Minnesota, v. 76, n° 5, p. 518-521. 1986.

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

ZAMBOLIN, L; VALE, F.X.R. do; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas – hortaliças.** UFV. 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

O efeito da microbiolização de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp. é bastante variável e dependente de fatores como ambiente, genótipo e condições de realização do teste. Estes se expressaram de forma discreta sobre a proteção contra *Rhizoctonia solani*, pela redução da porcentagem de tombamento e manutenção da qualidade das mudas.

Dos isolados testados, o TENA33 foi o que se manteve mais estável em relação ao controle de tombamento em sementes e plântulas das cultivares Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho e manutenção da qualidade das mudas.

Existe interação entre isolados de *Trichoderma* e genótipo de tomate.

A medição da área radicular não revelou diferenças entre os tratamentos, efeito do patógeno ou dos tratamentos aplicados às sementes.

A associação entre tratamentos de erradicação em água aquecida a 50 °C por 30 minutos e com HCl a 5% por 10 minutos com inoculação com isolados de *Trichoderma* pode vir a ser uma técnica útil para tratamento de sementes necessitando, porém, ser melhor estudada e aperfeiçoada.

Testes em caixas tipo Gerbox para avaliação de tratamentos de microbiolização com isolados de *Trichoderma* são úteis apenas para a aferição da eficiência do procedimento de inoculação aplicado às sementes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos testes de patogenicidade realizados antes de cada experimento, pôde-se observar melhor o comportamento dos diferentes isolados de *Rhizoctonia*, ao longo do tempo, sobre as sementes de tomate. Por exemplo, o isolado RhF, obtido de batata, em geral, apresentou baixa virulência ao tomate. O isolado RhG, obtido de batata, apresentou ação danosa na fase de pré-emergência das sementes de tomate, com pouco efeito sobre o tombamento pós-emergência, na fase de plântulas. É interessante observar tais comportamentos, em função do direcionamento que se irá dar para os trabalhos seguintes. Ainda nos testes com isolados de *Rhizoctonia*, observou-se certo efeito na velocidade de emergência das plântulas de tomate ocasionado por alguns dos isolados, especialmente quando se utilizou sementes de maior poder germinativo, independente dos seus efeitos sobre a porcentagem de tombamento pós-emergência. Este resultado, porém, precisa ser melhor investigado, pois não existem relatos de investigação deste efeito na literatura.

O processo de inoculação de sementes foi mais prático do que o processo de inoculação por molhamento das sementes (ensaio de controle biológico II), não só pelo tempo que se levou, mas também porque os isolados prontamente se estabeleceram no tegumento da semente, sendo mais preciso.

O processo de inoculação dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre as sementes mostrou-se um procedimento prático e eficaz, necessitando apenas de condições assépticas do ambiente e dos devidos cuidados inerentes ao manuseio de qualquer organismo biológico, como o uso de materiais devidamente esterilizados, laboratório limpo e organizado, ausência de ventilação (principalmente quando for manusear fungos formadores de esporos). Para as condições experimentais foi um bom método, que garantiu a presença dos isolados sobre as sementes, na concentração determinada, não envolvendo qualquer outro parâmetro a mais, o que aconteceria se usássemos peletização, peliculização, ou veículo substrato, mais usualmente utilizados na prática. Porém, foi possível observar que ao longo do desenvolvimento das mudas, a concentração de inóculo diminuiu apesar dos isolados estarem presentes, sendo recomendável, após a uniformização da emergência uma segunda adição de inóculo, seja por meio de rega seja por meio de veículo substrato. É um estudo que poderia ser feito. Primeiro com o uso simples de rega ou pulverização de suspensão de inóculo com água, e segundo com o uso de diferentes veículos substratos como farelo de trigo, farelo de mamona, arroz triturado, qualquer outra matéria orgânica que favorecesse as ações de *Trichoderma* spp., e ainda disponibilizasse nutrientes. Estudo para determinar qual veículo substrato seria mais adequado para diferentes isolados selecionados seria oportuno para dar continuidade a uma prática de controle biológico mais consistente, pois independente da quantidade de inóculo de patógeno que se encontra no ambiente, o controle da doença deve ser efetivo e eficiente.

Com os resultados da associação das sementes tratadas com os isolados de *Trichoderma*, foi possível observar o efeito protetor conferido a eles durante o período de pré-emergência e certo favorecimento às plântulas com a diminuição do tempo de emergência.

ANEXOS

Anexo I: Análise de variância para efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp.(tratamento), de substrato e ambiente sobre a emergência aos cinco e aos 14 dias, e tombamento em mudas de tomate até os 14 dias, em bandejas de alumínio, dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Emergência (%)		Tombamento
		5 DAS	14 DAS	14 DAS (%)
QUADRADO MÉDIO				
Tratamento	6	2,10 ^{ns}	2,23 ^{ns}	0,356**
Substrato	1	0,94 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,259 ^{ns}
Ambiente	1	17,63***	61,60**	1,162**
Bloco	3	27,93***	27,78**	0,421 ^{ns}
Substrato x Isolado	6	0,44 ^{ns}	1,61 ^{ns}	0,128 ^{ns}
Ambiente x Isolado	6	3,20 ^{ns}	1,91 ^{ns}	0,517**
Ambiente x Substrato	1	0,93 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,259 ^{ns}
Ambiente x Substrato x Isolado	6	1,99 ^{ns}	2,94 ^{ns}	0,128 ^{ns}
Resíduo	82	1,52	3,20	0,176
CV (%)		55,10	31,01	38,10

ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.***P<0,001; **P<0,01. Dados transformados em $(x+1)^{1/2}$

Anexo II: Análise de variância para efeito de concentração de inóculo de isolado de *Rhizoctonia* spp., sobre a porcentagem de emergência aos cinco e 28 dias após semeadura, e tombamento em mudas de tomate até 28 dias, em bandejas de polipropileno com substrato comercial, em casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Emergência (%)		Tombamento (%)
		5 dias	28 dias	28 dias
QUADRADO MÉDIO				
Concentração de inóculo	4	7,57***	0,065 ^{ns}	3,754**
Bloco	3	0,07 ^{ns}	0,567 ^{ns}	2,956**
Resíduo	12	1,276	0,176	0,702
C.V.		29,5	4,57	32,62

ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.***P<0,001; **P<0,01. Dados transformados em $(x+1)^{1/2}$

Anexo III: Análise de variância para efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp. (tratamento), em cultivares de tomate Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, sobre a emergência aos 4, 5, 6, 7 e 8 dias após semeadura (DAS), e tombamento em mudas de tomate até os 14 DAS, semeados em bandejas de alumínio, dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Emergência (%)					Tombamento aos 14 DAS
		4 DAS	5 DAS	6 DAS	7 DAS	8 DAS	
		QUADRADO MÉDIO					
Tratamento	6	0,66**	4,67***	1,73***	0,811***	0,61***	9,39***
Cultivar	1	0,01 ^{ns}	6,09**	0,40 ^{ns}	0,008 ^{ns}	0,04 ^{ns}	8,48***
Bloco	3	0,62*	1,00 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,546 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,53
Isolados x Cultivar	6	0,20 ^{ns}	2,35**	1,05***	0,489**	0,46**	0,75
Resíduo	39	0,20	0,90	0,30	0,208	0,15	0,56
C.V. (%)		27,74	11,54	5,91	4,74	4,08	34,67

ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. ***P<0,001; **P<0,01. Dados transformados em $(x+1)^{1/2}$

Anexo IV: Análise de variância para efeito dos isolados de *Rhizoctonia* spp., em cultivar de tomate Santa Clara Miss Brasil, sobre a emergência total aos 20 dias, e tombamento em mudas de tomate até os 20 dias, semeados em bandejas de alumínio dentro de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Emergência total (%)		Tombamento total (%)	
		QUADRADO MÉDIO			
Tratamento	6	2,03***		11,07***	
Bloco	3	0,71 ^{ns}		0,46 ^{ns}	
Resíduo	18	0,43		0,46	
C.V.(%)		11,36		21,63	

ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. ***P<0,001; **P<0,01. Dados transformados em $(x+1)^{1/2}$

Anexo V: Análise de variância para efeito de isolado de *Trichoderma*, de *Rhizoctonia* e de meio de cultura sobre o crescimento das colônias de *Trichoderma* spp., expresso em mm.disco⁻¹, avaliados aos quatro e oito dias após o pareamento das colônias em placas de Petri. Seropédica, 2008.

Fonte de variação	G.L.	Raio de crescimento da colônia de <i>Trichoderma</i> (mm.disco ⁻¹)	
		4º DIA	8º DIA
		QUADRADO MÉDIO	
<i>Trichoderma</i>	4	219,45***	173,44***
<i>Rhizoctonia</i>	5	2,99 ^{ns}	10,11**
Meio de cultura	1	3,60 ^{ns}	8,71 ^{ns}
Bloco	3	0,89 ^{ns}	5,10 ^{ns}
<i>Trichoderma</i> x <i>Rhizoctonia</i>	20	5,31***	8,91***
<i>Trichoderma</i> x meio de cultura	4	4,90 ^{ns}	9,24**
<i>Rhizoctonia</i> x meio de cultura	5	8,92***	15,96***
<i>Trichoderma</i> x <i>Rhizoctonia</i> x Meio de cultura	20	6,42***	10,36***
Resíduo	177	2,29	3,93
C.V.(%)		28,66	32,01

ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.***P<0,001; **P<0,01. Dados transformados em (x+1)^{1/2}

Anexo VI: Análise de variância para efeito de isolado de *Trichoderma*, de *Rhizoctonia* e de meio de cultura sobre o raio de crescimento das colônias de *Rhizoctonia* spp., expresso em mm.disco⁻¹, avaliados aos quatro e oito dias após o pareamento das colônias em placas de Petri. Seropédica, 2008.

Fonte de variação	G.L.	Raio de crescimento da colônia de <i>Rhizoctonia</i> (mm.disco ⁻¹)	
		4º DIA	8º DIA
		QUADRADO MÉDIO	
<i>Trichoderma</i>	4	16,97***	41,48***
<i>Rhizoctonia</i>	5	16,21***	24,57***
Meio de cultura	1	65,04***	63,79***
Bloco	3	1,58 ^{ns}	0,73 ^{ns}
<i>Trichoderma</i> x <i>Rhizoctonia</i>	20	4,32 ^{ns}	9,19**
<i>Trichoderma</i> x meio de cultura	4	4,06 ^{ns}	6,27 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x meio de cultura	5	10,45***	16,32***
<i>Trichoderma</i> x <i>Rhizoctonia</i> x Meio de cultura	20	3,81 ^{ns}	6,99 ^{ns}
Resíduo	177	3,20	4,64
C.V.(%)		64,43	65,96

ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.***P<0,001; **P<0,01. Dados transformados em (x+1)^{1/2}

Anexo VII: Análise de variância para efeito de isolados de *Trichoderma* spp., cultivar e presença de *Rhizoctonia* sobre a porcentagem de emergência de mudas de tomate em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 4, 5, 6, 7 e 21 dias após semeadura (DAS) e de tombamento, avaliado aos 21 DAS. Seropédica, 2008.

		Emergência %					Tombamento %
		4 DAS	5 DAS	6 DAS	7 DAS	21 DAS	
Tratamento	6	2,945***	19,91***	1,84***	0,45**	0,3746**	0,7926 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	1,318 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,0598 ^{ns}	130,9148***
Cultivar	1	0,000001 ^{ns}	65,54***	73,11***	65,99***	61,6642***	1,7521 ^{ns}
Bloco	3	49,28***	25,08***	1,42***	1,95***	1,2898***	4,4897**
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	6	0,167 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,0742 ^{ns}	0,7926 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	6	0,117 ^{ns}	0,95 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,1658 ^{ns}	0,6177 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	0,001 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,2221 ^{ns}	1,7521 ^{ns}
Tratamento x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	6	0,042 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,0376 ^{ns}	0,6177 ^{ns}
Resíduo	81	0,755	0,93	0,19	0,14	0,1597	0,9999
CV%		49,87	14,78	5,10	4,40	4,48	48,05

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados transformados em $(x+1)^{1/2}$.

Anexo VIII: Análise de variância para efeito de isolados de *Trichoderma* spp., cultivar e presença de *Rhizoctonia* sobre o comprimento da raiz e altura de mudas (mm.plântula⁻¹) avaliados aos seis dias após a semeadura. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Comprimento de Raiz (mm.plântula ⁻¹)	Altura de mudas (mm.plântula ⁻¹)
Tratamento	6	15,15 ^{ns}	17,35 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	88,82 ^{ns}	68,15**
Cultivar	1	231,87***	158,99***
Bloco	3	364,55***	284,22***
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	6	36,46 ^{ns}	19,06 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	6	20,72 ^{ns}	9,29 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	0,00 ^{ns}	0,54 ^{ns}
Tratam. x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	6	19,09 ^{ns}	8,91 ^{ns}
Resíduo	81	29,34 ^{ns}	12,43
C.V. (%)		23,67	12,07

***P<0,001; **P<0,01, ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados

Anexo IX: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma* spp., presença ou não de inóculo de *Rhizoctonia* e de cultivar sobre o comprimento de raiz (mm.planta⁻¹) e altura de mudas de tomate (mm.planta⁻¹), avaliado aos 14 dias após semeadura, sob condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Comprimento de Raiz (mm.planta ⁻¹)	Altura de mudas (mm.planta ⁻¹)
Tratamento	6	120,20***	60,11**
<i>Rhizoctonia</i>	1	667,22***	357,87***
Cultivar	1	2060,38***	11,80 ^{ns}
Bloco	3	389,79***	1216,57***
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	6	256,89***	99,49***
Tratamento x Cultivar	6	235,34***	37,22*
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	1047,99***	15,44***
<i>Trichod.</i> x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	6	179,82***	75,04***
Resíduo	81	22,8	20,77
C.V. (%)		6,76	9,61

***P<0,001; **P<0,01, ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados

Anexo X: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma* spp., de cultivar e presença ou não de inóculo de *Rhizoctonia*, sobre o comprimento da raiz (cm.planta⁻¹) e a área radicular (cm².planta⁻¹) aos 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Comprimento de Raiz (cm.planta ⁻¹)	Área Radicular (cm ² .planta ⁻¹)
		21 DAS	
		QUADRADO MÉDIO	
Tratamento	6	11,231 ^{ns}	0,161*
<i>Rhizoctonia</i>	1	0,202 ^{ns}	0,218 ^{ns}
Cultivar	1	1,746 ^{ns}	0,106 ^{ns}
Bloco	3	66,112***	0,675***
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	6	8,482 ^{ns}	0,106 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	6	8,758 ^{ns}	0,134 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	7,394 ^{ns}	0,001 ^{ns}
Tratamento x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	6	5,513 ^{ns}	0,183**
Resíduo	79	8,353	0,081
C.V. (%)		23,56	12,13

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados transformados em (x+1)^{1/2}.

Anexo XI: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp, da presença ou não de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre a emergência das plântulas em bandejas em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 5, 6, 7 e 8 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Fonte de Variação	GL	Emergência de Plântulas (%)			
		5 DAS	6 DAS	7 DAS	8 DAS
		QUADRADO MÉDIO			
Tratamento	4	59,29 ^{ns}	322,26***	812,66***	249,26**
<i>Rhizoctonia</i>	1	120,05**	127,51 ^{ns}	48,05 ^{ns}	296,45 ^{ns}
Cultivar	1	8201,25***	82497,01***	63281,25***	2376,20***
Bloco	3	217,25***	319,31***	388,95 ^{ns}	53,66 ^{ns}
Tratam. x <i>Rhizoctonia</i>	4	16,76 ^{ns}	65,10 ^{ns}	223,70 ^{ns}	327,91**
Tratamento x Cultivar	4	26,03 ^{ns}	49,79 ^{ns}	498,59**	131,41 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	140,45**	391,61**	48,05 ^{ns}	11,25 ^{ns}
Trat x Cultivar x <i>Rhizoc.</i>	4	31,85**	55,20 ^{ns}	78,83 ^{ns}	63,34 ^{ns}
Resíduo	57	29,12	71,66	171,16	90,35
CV%		51,04	23,06	23,39	12,09

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados.

Anexo XII: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp, da presença ou não de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre a emergência das plântulas em bandejas em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 24 dias após sementeira. (Seropédica, 2008).

Fonte de Variação	GL	Emergência final	Tombamento total
		(%)	(%)
		24 DAS	
		QUADRADO MÉDIO ⁽⁴⁾	
Tratamento	4	20,98 ^{ns}	64,71 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	135,20 ^{ns}	36337,81 ^{***}
Cultivar	1	1656,20 ^{***}	90,31 ^{ns}
Bloco	3	1572,75 ^{***}	732,04 ^{***}
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	4	77,85 ^{ns}	64,71 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	4	14,60 ^{ns}	34,03 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	18,05 ^{ns}	90,31 ^{ns}
Tratamento x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	4	17,33 ^{ns}	34,03 ^{ns}
Resíduo	57	43,69	81,37
CV%		7,35	42,33

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados.

Anexo XIII: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp, da presença ou não de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre a altura de mudas (mm.planta⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 10, 17 e 24 dias após a sementeira. Seropédica, 2008.

	GL	Altura de mudas (mm.planta ⁻¹)		
		10 DAS	17 DAS	24 DAS
		QUADRADO MÉDIO ⁽⁴⁾		
Tratamento	4	47,52 ^{**} (2)	162,80 ^{**}	297,35 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	0,79 ^{ns}	130,20 ^{ns} (3)	73,77 ^{ns}
Cultivar	1	4026,14 ^{***} (1)	13966,10 ^{***}	13720,25 ^{***}
Bloco	3	15,65 ^{ns}	312,85 ^{***}	1861,16 ^{***}
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	4	15,68 ^{ns}	106,35 ^{ns}	99,62 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	4	31,80 ^{ns}	58,21 ^{ns}	118,79 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	22,22 ^{ns}	0,25 ^{ns}	488,51 ^{ns}
Tratam. x Cultivarx <i>Rhizoctonia</i>	4	16,04 ^{ns}	38,92 ^{ns}	85,97 ^{ns}
Resíduo	57	14,36	46,14	139,15
CV%		11,60	13,57	11,73

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados.

Anexo XIV: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma* sp., da presença ou não de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre a área radicular ($\text{cm}^2.\text{planta}^{-1}$) avaliada aos 17 dias após semeadura e o comprimento radicular ($\text{mm}.\text{planta}^{-1}$) de mudas de tomate em condições de casa-de-vegetação avaliado aos 10 e 17 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Fonte de Variação	GL	Comprimento	Área	Comprimento
		de Raiz	Radicular	de Raiz
		($\text{mm}.\text{planta}^{-1}$)	($\text{cm}^2.\text{planta}^{-1}$)	($\text{mm}.\text{planta}^{-1}$)
		10 DAS		17 DAS
QUADRADO MÉDIO				
Tratamento	4	2,90 ^{ns}	0,052 ^{ns}	0,5021 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	1,33 ^{ns}	0,022 ^{ns}	0,2092 ^{ns}
Cultivar	1	13,64**	0,139 ^{ns}	0,2036 ^{ns}
Bloco	3	140,36***	2,441***	1,4242***
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	4	1,53 ^{ns}	0,035 ^{ns}	0,4398 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	4	0,66 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,0787 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	2,25 ^{ns}	0,139 ^{ns}	0,0413 ^{ns}
Tratamento x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	4	1,26 ^{ns}	0,006 ^{ns}	0,0978
Resíduo	57	2,39	0,044	0,2452
C.V. (%)		29,29	15,24	7,37

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados transformados em $(x+1)^{1/2}$.

Anexo XV: Análise de variância para efeito de isolados de *Trichoderma* spp., cultivar e presença de *Rhizoctonia* sobre a massa seca das plântulas ($\text{mg}.\text{plântula}^{-1}$) avaliada aos seis dias após a semeadura. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Massa seca x 10^{-6} ($\text{mg}.\text{plântula}^{-1}$) aos 6 DAS
Tratamento	6	0,149**
<i>Rhizoctonia</i>	1	0,136 ^{ns}
Cultivar	1	0,400***
Bloco	3	0,741***
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	6	0,020 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	6	0,033 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	0,002 ^{ns}
Tratam. x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	6	0,082 ^{ns}
Resíduo	81	0,049
C.V. (%)		14,25

***P<0,001; **P<0,01, ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados

Anexo XVI: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma* spp., presença ou não de inóculo de *Rhizoctonia* e de cultivar sobre a massa seca (mg.planta⁻¹) de mudas de tomate cultivares Santa Clara Miss Brasil e Garrafinha Vermelho, avaliada aos 14 dias após semeadura, sob condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Massa seca (mg.planta ⁻¹) aos 14 DAS	
		Raiz (x10 ⁻⁵)	Parte Aérea (x 10 ⁻⁴)
Tratamento	6	0,057***	0,03 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	0,012 ^{ns}	1,39***
Cultivar	1	0,040***	2,01***
Bloco	3	0,120***	0,85***
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	6	0,058***	0,19***
Tratamento x Cultivar	6	0,004 ^{ns}	0,07 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	0,017 ^{ns}	0,01 ^{ns}
<i>Trichod.</i> x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	6	0,036 ^{ns}	0,05 ^{ns}
Resíduo	81	0,013	0,05
C.V. (%)		18,13	17,12

***P<0,001; **P<0,01, ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados

Anexo XVII: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma* spp., de cultivar e presença ou não de inóculo de *Rhizoctonia*, sobre a massa seca de raiz e de parte aérea (mg.planta⁻¹) aos 21 dias após semeadura em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2007.

Fonte de Variação	GL	Massa Seca aos 21 DAS (mg.planta ⁻¹)	
		QUADRADO MÉDIO	
		Raiz (x10 ⁻³)	Parte Aérea (x10 ⁻³)
Tratamento	6	0,009 ^{ns}	0,075 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	0,060 ^{ns}	0,008 ^{ns}
Cultivar	1	0,040 ^{ns}	14,80***
Bloco	3	0,420***	0,557***
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	6	0,030 ^{ns}	0,151**
Tratamento x Variedade	6	0,010 ^{ns}	0,065 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	0,001 ^{ns}	0,321***
Tratamento x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	6	0,006 ^{ns}	0,021 ^{ns}
Resíduo	81	0,02	0,075
C.V. (%)		19,16	23,91

***P<0,001; **P<0,01, ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados

Anexo XVIII: Análise de variância para o efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp. e testemunhas, de cultivar e da presença ou não de *Rhizoctonia* sobre o teor (mg.g massa seca⁻¹) e conteúdo (mg.planta⁻¹) de nitrogênio, fósforo e potássio das mudas, avaliadas aos 21 dias após semeadura, em condições de casa-de-vegetação. Seropédica, 2008.

Fonte de Variação	GL	Macronutrientes					
		Teor (%)			Conteúdo (mg.planta ⁻¹)		
		N (x10 ⁻²)	P	K	N (x10 ⁻³)	P (x 10 ⁻³)	K (x10 ⁻²)
		QUADRADO MÉDIO					
Tratamento	6	2,496***	0,018 ^{ns}	0,062 ^{ns}	0,271***	0,613**	0,060 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	0,150 ^{ns}	0,203***	0,373**	0,009 ^{ns}	0,139 ^{ns}	0,048 ^{ns}
Cultivar	1	0,172 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,152 ^{ns}	0,427**	6,597***	0,030 ^{ns}
Bloco	2	0,604 ^{ns}	0,638***	2,797***	0,008 ^{ns}	6,555***	1,752***
Tratam. x <i>Rhizoctonia</i>	6	0,100 ^{ns}	0,024 ^{ns}	0,109 ^{ns}	0,053 ^{ns}	0,775**	0,054 ^{ns}
Tratam. x Cultivar	6	0,982 ^{ns}	0,008 ^{ns}	0,052 ^{ns}	0,033 ^{ns}	0,219 ^{ns}	0,050 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	1,079 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,058 ^{ns}	0,213 ^{ns}	1,543**	0,003 ^{ns}
Tratam. x <i>Rhizoct.</i> x Cult.	6	0,771 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,034 ^{ns}	0,072 ^{ns}	0,251 ^{ns}	0,020 ^{ns}
Resíduo	54	0,777	0,022	0,080	0,076	0,269	0,045
C.V. (%)		5,77	6,56	15,55	0,85	1,52	2,03

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados transformados em (x+1)^{1/2}.

Anexo XIX: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp, da presença ou não de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre a massa seca de parte aérea das mudas (mg.planta⁻¹), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 10 e 17 dias após semeadura. Seropédica, 2008.

Fonte de Variação	GL	Massa Seca (mg.planta ⁻¹)	
		10 DAS (x10 ⁻⁴)	17 DAS (x10 ⁻⁴)
		QUADRADO MÉDIO	
Tratamento	4	0,0010 ^{ns}	0,015 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	0,0040**	0,226***
Cultivar	1	0,0840***	0,588***
Bloco	3	0,0040***	0,012 ^{ns}
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	4	0,0008 ^{ns}	0,016 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	4	0,0010**	0,010 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	0,0020 ^{ns}	0,045**
Tratamento x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	4	0,0006 ^{ns}	0,017 ^{ns}
Resíduo	57	0,0004	0,011
CV%		25,59	34,49

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados.

Anexo XX: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp, da presença ou não de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre a massa seca de parte aérea das mudas (mg.planta^{-1}), em condições de casa-de-vegetação, avaliadas aos 10, 17 e 24 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Fonte de Variação	GL	MASSA SECA aos 24DAS (mg.planta^{-1})		
		Raiz ($\times 10^{-4}$)	Parte Aérea ($\times 10^{-3}$)	Planta Total ($\times 10^{-4}$)
		QUADRADO MÉDIO ⁽⁴⁾		
Tratamento	4	0,0007 ^{ns}	0,117**	0,130**
<i>Rhizoctonia</i>	1	0,022***	1,015***	1,339***
Cultivar	1	0,065***	5,872***	7,174***
Bloco	3	0,003 ^{ns}	0,094**	0,106 ^{ns}
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	4	0,002 ^{ns}	0,044 ^{ns}	0,062 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	4	0,002 ^{ns}	0,061 ^{ns}	0,068 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	0,0006 ^{ns}	0,518***	0,556***
Tratamento x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	4	0,001 ^{ns}	0,035 ^{ns}	0,048 ^{ns}
Resíduo	57	0,002	0,032	0,035
CV%		38,35	14,40	13,77

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados não transformados.

Anexo XXI: Análise de variância do efeito de tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma* spp, da presença ou não de *Rhizoctonia* sp. e de cultivar sobre o teor (%) e conteúdo (mg.planta⁻¹) de macronutrientes N, P e K de parte aérea das mudas, semeadas em bandejas de polipropileno contendo substrato inoculado com *Rhizoctonia*, conduzidos dentro de casa-de-vegetação, avaliadas aos 24 dias após semeadura (DAS). Seropédica, 2008.

Fonte de Variação	GL	MACRONUTRIENTES aos 24DAS					
		TEOR (%)			CONTEÚDO (mg.planta ⁻¹)		
		QUADRADO MÉDIO ⁽⁴⁾					
	N	P (x10 ⁻²)	K	N (x10 ⁻²)	P (x10 ⁻³)	K (x10 ⁻²)	
Tratamento	4	0,051 ^{ns}	0,142 ^{ns}	0,019 ^{ns}	0,006 ^{ns}	0,021 ^{ns}	0,024 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i>	1	0,020 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,358**	0,141 ^{ns}	0,093**	1,220***
Cultivar	1	0,098 ^{ns}	0,277 ^{ns}	0,143 ^{ns}	1,000***	0,435***	1,788***
Bloco	3	0,112 ^{ns}	3,627 ^{ns}	0,230**	0,013 ^{ns}	0,093***	0,369**
Tratamento x <i>Rhizoctonia</i>	4	0,036 ^{ns}	0,270 ^{ns}	0,050 ^{ns}	0,017 ^{ns}	0,011 ^{ns}	0,083 ^{ns}
Tratamento x Cultivar	4	0,016 ^{ns}	0,550 ^{ns}	0,014 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,016 ^{ns}	0,015 ^{ns}
<i>Rhizoctonia</i> x Cultivar	1	0,080 ^{ns}	1,385 ^{ns}	0,571***	0,035 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,007 ^{ns}
Tratamento x Cultivar x <i>Rhizoctonia</i>	4	0,023 ^{ns}	0,311 ^{ns}	0,010 ^{ns}	0,016 ^{ns}	0,010 ^{ns}	0,021 ^{ns}
Resíduo	57	0,049	0,569	0,070	0,038	0,017	0,089
CV%		10,35	5,92	11,21	1,85	0,41	2,75

***P<0,001; **P<0,01; ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados transformados em (x+1)^{1/2}.

Anexo XXII: Resumo da análise de variância para efeito de tratamento de sementes e microbiolização com isolados de *Trichoderma* spp. sobre a emergência de tomate cultivar Perinha Água Branca, semeadas em bandejas contendo substrato. Seropédica, 2009.

Fonte de Variação	GL	Gerbox		Substrato	
		Germinação (%)		Emergência (%)	
		5 DAS	14 DAS	5 DAS	14 DAS
		QUADRADO MÉDIO			
Tratamento	3	0,97**	2213,73***	98,35***	77,35***
Protetor	4	2,61***	22663,00***	10,67***	6,70***
Bloco	3	0,43 ^{ns}	94,00 ^{ns}	2,31**	0,80 ^{ns}
Tratamento x Protetor	12	0,84***	584,23***	2,11***	2,09**
Resíduo	57	0,23	111,26	0,68	0,89
C.V. (%)		39,26	24,53	17,68	15,50

***P<0,001, *P<0,01, ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados transformados para $(x + 1)^{-1/2}$.

Anexo XXIII: Análise de variância para efeito de tratamento de sementes e microbiolização com isolados de *Trichoderma* spp. sobre a massa seca aos 30 dias após semeadura de tomate cultivar Perinha Água Branca aos 30 dias, em bandejas contendo substrato. Seropédica, 2009.

Fonte de Variação	GL	Massa Seca (mg.planta ⁻¹)	
		Raiz (x 10 ⁻⁶)	Parte Aérea (x 10 ⁻⁴)
		QUADRADO MÉDIO	
Tratamento	3	1,9601 ^{ns}	9,37 ^{ns}
Protetor	4	1,0199 ^{ns}	104,38 ^{ns}
Bloco	3	20,7234***	1084,48***
Tratamento x Protetor	12	2,7298**	91,10 ^{ns}
Resíduo	57	1,3982	60,98
C.V. (%)		98,03	78,68

***P<0,001, *P<0,01, ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Dados sem transformação.