



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Patogenicidade de fungos de solo em alface, controle biológico e
compatibilidade de *Trichoderma* spp. com produtos químicos**

REJAYNE BARBOSA LIMA

**BRASÍLIA – DF
2019**

REJAYNE BARBOSA LIMA

**Patogenicidade de fungos de solo em alface, controle biológico e compatibilidade de
Trichoderma spp. com produtos químicos**

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Fitopatologia pelo
Programa de Pós-graduação
em Fitopatologia.

Orientadora: Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello

**BRASÍLIA - DF
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Rejayne Barbosa.

Patogenicidade de fungos de solo em alface, controle biológico e compatibilidade de *Trichoderma* spp. com produtos químicos./Rejayne Barbosa Lima. Brasília, 2019. p. 167.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Fungos para biocontrole – Controle Biológico.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Patogenicidade de fungos de solo em alface, controle biológico e compatibilidade de *Trichoderma* spp. com produtos químicos.

Aos meus pais Elzite e Reginaldo, minha irmã Elisa, meus avós Mirinha e Clarindo, pelo apoio em transformar em realidade meu sonho...

Dedico!

"Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes."

Paulo Freire

"Os dois grandes males que debilitam o ensino e restringem seu rendimento são: a rotina, sem inspiração nem objetivo; a improvisação dispersiva, confusa e sem ordem. O melhor remédio contra esses dois grandes males é o planejamento."

Luiz Alves de Mattos

AGRADECIMENTOS

À Deus dedico tudo que tenho realizado e alcançado em minha vida

A Federação Espírita Brasileira (FEB) pelo acompanhamento espiritual na casa de orações.

A toda a minha família pela fé em mim depositada, pelos conselhos e ajuda financeira para proporcionar sempre o que eu sonhei em especial aos meus pais Elzite e Reginaldo, a minha irmã Elisa e sobrinhos Alice e Davi.

Aos meus avós Mirinha e Clarindo que juntos financiaram minha vinda a Brasília para que eu não ficasse desamparada e não desistisse do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de auxílio financeiro (bolsa de mestrado) e tornar possível o início e conclusão do mestrado.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de cursar o mestrado, pela concessão de auxílios que contribuíram para a conclusão deste mestrado.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por proporcionar estrutura e tecnologia para o meu aprendizado.

À minha orientadora e professora Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello, pelo apoio e direcionamento para minha vida acadêmica.

Ao Luís Palhares pelo apoio nas análises estatísticas.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, em especial aos professores Dr. Carlos Uesugi, Dr. Juvenil Cares, Dra. Marisa Ferreira, Dr. Maurício Rossato, Dr. Justino Dias e Dr. Adalberto Café Filho por acreditarem no meu potencial e confiarem no meu desempenho.

Ao Dr. Ailton Reis da Embrapa Hortaliças e Dra. Cléia Cabral Santos por cederem os isolados dos fungos fitopatogênicos e sementes de alface utilizadas neste trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos e colaboradores do Departamento de Fitopatologia da UnB, Alexandre, Aline, Caio Augusto, Carina, César, Cristiano, Débora, Elenice, Érica, Jefferson, Jennifer, João Gilberto, Geane, Letícia, Lincon Rafael, Lincoln Vicente, Pollyane, Raycenne, Ramon, Samuel e Vitória, pelos dias, tardes e noites de estudos, companhia, aprendizado e diversão.

Aos colegas e colaboradores do Cenargen, Irene Martins, Vanessinha, Marcilene, Dr. João Batista, Dra. Maria Cléria, Dr. José Eustáquio, Aline, Carlos, Franciele, Jéssyca, Gustavo, Kamilla, Kelvin, Sheila e Teseu, por compartilharem seus conhecimentos, dicas e orientações de experimento.

Aos professores Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum, Dr. Eder Marques e a Dra. Bárbara Eckstein por aceitarem compor a banca examinadora e pelas sugestões durante as correções.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da professora Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**Patogenicidade de fungos de solo em alface, controle biológico e compatibilidade de
Trichoderma spp. com produtos químicos**

REJAYNE BARBOSA LIMA

DISSERTAÇÃO APROVADA em: 21 / 06 / 2019 por:

Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello
(Presidente - Orientadora)

Dra. Bárbara Eckstein – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Examinador Externo)

Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum - Universidade de Brasília
(Examinador Interno)

Dr. Eder Marques - UPIS Faculdades integradas
(Suplente)

BRASÍLIA – DF

2019

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	5
Objetivo Geral.....	5
Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO 1. Revisão de literatura	
1.1. A cultura da alface.....	8
1.2. Principais doenças de solo e medidas de controle.....	12
1.3. Controle químico e produtos fitossanitários registrados no Brasil para a cultura da alface.....	21
1.4. Controle biológico e produtos de biocontrole registrados no Brasil	25
1.5. O gênero <i>Trichoderma</i> : diversidade, importância e aplicações no biocontrole de doenças causadas por fungos de solo	27
1.6. <i>Trichoderma</i> na promoção de crescimento de plantas cultiváveis	30
1.7. Compatibilidade de <i>Trichoderma</i> spp. com fungicidas e inseticidas químicos.....	32
1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 2. Patogenicidade e influência na germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) induzidas por fungos de solo	
2.1. INTRODUÇÃO.....	53
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.2.1. Obtenção dos fungos fitopatogênicos.....	54
2.2.2. Produção de culturas-estoque dos fungos.....	55
2.2.3. Obtenção das cultivares de alface.....	55
2.2.4. Germinação de sementes das cultivares por diferentes métodos.....	56
2.2.5. Determinação da patogenicidade de fungos de solo a alface, <i>in vitro</i>	57
2.2.6. Delineamento experimental e análise estatística	58
2.3. RESULTADOS	59
2.3.1 Germinação de sementes de cultivares de alface.....	59
2.3.2. Testes de patogenicidade <i>in vitro</i>	60
2.4. DISCUSSÃO.....	63
2.4.1 Germinação de sementes de cultivares de alface.....	63
2.4.2. Testes de patogenicidade <i>in vitro</i>	66
2.5. CONCLUSÕES.....	73
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO 3. Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao potencial de biocontrole de fungos habitantes de solo patogênicos à alface	
3.1. INTRODUÇÃO.....	82
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	84
3.2.1. Local de realização dos ensaios.....	84
3.2.2. Isolados de <i>Trichoderma</i> utilizados.....	84

3.2.3. Testes de pareamento de culturas	85
3.2.4. Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. na supressão da podridão de raízes em casa de vegetação	86
3.2.5. Delineamento experimental e análise dos dados	87
3.3. RESULTADOS	88
3.3.1. Teste de pareamento de culturas.....	88
3.3.2. Supressão da murcha-de-esclerócio (<i>S. rolfsii</i>) por <i>T. asperelloides</i> e <i>T. koningiopsis</i> em casa de vegetação	96
3.4. DISCUSSÃO.....	97
3.4.1. Teste de pareamento de culturas.....	97
3.4.2. Supressão da murcha-de-esclerócio (<i>S. rolfsii</i>) por <i>T. asperelloides</i> e <i>T. koningiopsis</i> em casa de vegetação	101
3.5. CONCLUSÕES.....	103
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
CAPÍTULO 4. Avaliação da morfologia de colônias de <i>Trichoderma</i> spp. observadas em diferentes meios, compatibilidade e sensibilidade a produtos químicos registrados para a cultura da alface	
4.1. INTRODUÇÃO.....	111
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	112
4.2.1. Meios de cultura utilizados para multiplicação dos fungos.....	112
4.2.2. Avaliação da compatibilidade de <i>Trichoderma</i> com fungicidas e inseticidas recomendados para a cultura da alface	113
4.2.3. Delineamento experimental e análise estatística	116
4.3. RESULTADOS	116
4.3.1. Morfologia das colônias de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes meios.....	116
4.3.2. Compatibilidade de espécies de <i>Trichoderma</i> a fungicidas e inseticidas recomendados a cultura da alface.....	121
4.4. DISCUSSÃO.....	128
4.4.1. Morfologia das colônias de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes meios.....	128
4.4.2. Compatibilidade de espécies de <i>Trichoderma</i> a fungicidas e inseticidas recomendados a cultura da alface.....	131
4.5. CONCLUSÕES.....	136
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
CAPÍTULO 5. Reação de cultivares de alface à aplicação de <i>Trichoderma</i> spp. visando à promoção de crescimento	
5.1. INTRODUÇÃO.....	142
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	143
5.2.1. Cultivares de alface e isolados de <i>Trichoderma</i> utilizados	143
5.2.2. Testes de promoção de crescimento <i>in vivo</i>	144
5.2.3. Delineamento experimental e Análise estatística	144
5.3. RESULTADOS	145
5.4. DISCUSSÃO	148
5.5. CONCLUSÕES.....	151
5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
CONSIDERAÇÕES FINAIS	155
CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO	158

ANEXOS

ANEXO 1..... 163
ANEXO 2..... 165
ANEXO 3..... 166

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Revisão de literatura

Tabela 1. Cultivares de alface de diferentes grupos varietais com resistência a murcha de fusário, queima da saia, *damping-off*, mofo-branco e murcha-de-esclerócio, disponíveis no Brasi.....20

CAPÍTULO 2: Patogenicidade e influência na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) induzidas por fungos de solo

Tabela 2. Descrição com origem e ano de isolamento dos fungos fitopatogênicos.....55

Tabela 3. Germinação (%) de sementes seis cultivares de alface pelos métodos: ágar-água, Germitest e papel filtro.....60

Tabela 4. Percentual de sementes de diferentes cultivares de alface germinadas e incidência (plântulas sintomáticas e sementes mortas), quando inoculadas artificialmente com os fungos: *Sclerotinia sclerotiorum* (isolados CEN1147 e CEN1530), *Sclerotium rolfsii* (isolados CEN216 e CEN1531), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (isolados FOLac raça 1 – 206 e FOLac raça 1 – 240), *Rhizoctonia solani* (isolado RHI 23) e *Pythium ultimum* (isolado PYT 555).....62

Tabela 5. Percentagem de germinação (%) das cultivares BRS Leila, BRS Lélia, Mauren, BRS Mediterrânea e Vitória de Santo Antão, inoculadas artificialmente com fungos fitopatogênicos de solo.....63

CAPÍTULO 3: Avaliação de *Trichoderma* spp. quanto ao potencial de biocontrole de fungos habitantes de solo patogênicos à alface

Tabela 6. . Descrição dos isolados de *Trichoderma* com origem, hospedeira/substrato e ano de isolamento.....84

Tabela 7. Crescimento micelial (cm) dos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum* em confronto direto com *Trichoderma* spp., utilizando o método de pareamento de culturas, após 10 dias de cultivo.....90

Tabela 8. Crescimento micelial (cm) por espécie de fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Fusarium oxysporum*, obtidos no pareamento com *Trichoderma* após 10 dias de cultivo.....91

Tabela 9. Inibição do crescimento micelial (%) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Pythium ultimum</i> por espécies <i>Trichoderma</i> ao final de 10 dias de cultivo.....	93
Tabela 10. Sobrevivência de plantas de alface (cultivar BRS Leila) tratadas com 10, 15, 20 e 25 mL das suspensões de <i>Trichoderma asperelloides</i> (CEN1433) e <i>Trichoderma koningiopsis</i> (CEN1452) na concentração de $1,5 \times 10^7$ / conídios por mL e incidência da murcha-de-esclerócios nas plantas em substrato infestado com <i>Sclerotium rolfsii</i> isolado CEN1531, após 10 dias de instalação do experimento.....	97
CAPÍTULO 4: Avaliação da morfologia de colônias de <i>Trichoderma spp.</i> observadas em diferentes meios, compatibilidade e sensibilidade a produtos químicos registrados para a cultura da alface	
Tabela 11. . Doses (g/mL) dos ingredientes ativos utilizadas nos testes de compatibilidade por 500 mL de BDA.....	114
Tabela 12. Doses comerciais (mL/L) referências recomendadas, utilizadas para os ensaios de compatibilidade dos fungicidas e inseticidas.....	114
Tabela 13. Quantidade (g/L ou kg) de ingrediente ativo (i.a) em 500 mL de BDA.....	115
Tabela 14. Concentração (ppm) de ingrediente ativo (i.a) em 500mL de BDA.....	115
Tabela 15. Crescimento (cm) e porcentagem de inibição micelial (%) de <i>Trichoderma spp.</i> em meio BDA suplementado com boscalida, iprodiona, imidacloprido e tiabendazol.....	121
Tabela 16. Inibição do crescimento micelial (%) de <i>Trichoderma spp.</i> , em meio BDA suplementado com o fungicida procimidona a diferentes concentrações.....	127
CAPÍTULO 5: Reação de cultivares de alface à aplicação de <i>Trichoderma spp.</i> visando à promoção de crescimento	
Tabela 17. Massa fresca de raiz (M.F.R) (g) de diferentes cultivares de alface aos 30 dias após inoculação (DAI) com <i>Trichoderma spp.</i> (Brasília, Distrito Federal, 2018).....	145
Tabela 18. Massa fresca da parte aérea (M.F.P.A) (g) de diferentes cultivares de alface aos 30 dias após inoculação (DAI) com <i>Trichoderma spp.</i> (Brasília, Distrito Federal, 2018).....	146
Tabela 19. Altura de planta (A.P) (cm) de diferentes cultivares de alface aos 30 dias após inoculação (DAI) com <i>Trichoderma spp.</i> (Brasília, Distrito Federal, 2018).....	147

Tabela 20. Comprimento de raiz (C.R.) (cm) de diferentes cultivares de alface aos 30 dias após inoculação (DAI) com *Trichoderma* spp. (Brasília, Distrito Federal, 2018).....148

ANEXO 1

Tabela 21. Componentes e modo de produção dos meios de cultura utilizados nos ensaios do Capítulo 4.....163

ANEXO 2

Tabela 22. Dados gerais, composição, classificação e indicação dos produtos fitossanitários utilizados neste estudo.....165

ANEXO 3

Tabela 23. Dados gerais das cultivares de alfaces utilizadas nos ensaios de germinação por diferentes métodos (Ágar-água, papel filtro e papel Germitest), patogenicidade *in vitro* (Capítulo 2), na avaliação de *Trichoderma* spp. na supressão da podridão de raízes em casa de vegetação (Capítulo 3) e na aplicação de *Trichoderma* spp. visando à promoção de crescimento (Capítulo 5).....166

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2: Patogenicidade e influência na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) induzidas por fungos de solo

Figura 1. Ilustração dos testes de germinação, em ágar-água de sementes de alface das cultivares: ‘BRS Mediterrânea’ (A); ‘BRS Lélia’ (B); ‘BRS Leila’ (C); ‘Gizele’ (D); ‘Mauren’ (E).....65

CAPÍTULO 3: Avaliação de *Trichoderma* spp. quanto ao potencial de biocontrole de fungos habitantes de solo patogênicos à alface

Figura 2. Pareamento de culturas de *Trichoderma* spp. com fungos fitopatogênicos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfii*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*) em BDA.....95

CAPÍTULO 4: Avaliação da morfologia de colônias de *Trichoderma* spp. observadas em diferentes meios, compatibilidade e sensibilidade a produtos químicos registrados para a cultura da alface

Figura 3. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. nos meios: SNA – Sacarose nutriente ágar; MS – Murashige e Skoog; AA – Ágar-água; CZA – Czapec dox; ME – Malte e ágar; SDAY – Sabouraud dextrose ágar 4%; CMD – Corn meal dextrose; BDA – Batata dextrose ágar; V8 – Suco de vegetais 20%; MEA – Extrato de malte e ágar.....120

Figura 4. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. em meio BDA suplementado com iprodiona.....122

Figura 5. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. em meio BDA suplementado com boscalida.....123

Figura 6. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. em meio BDA suplementado com imidacloprido.....124

Figura 7. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. em meio BDA suplementado com procimidona.....125

RESUMO GERAL

LIMA, Rejayne Barbosa. **Patogenicidade de fungos de solo em alface, controle biológico e compatibilidade de *Trichoderma* spp. com produtos químicos.** 2019. (167 p). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

A alface (*Lactuca sativa* L.) é originária do sul da Europa e Ásia ocidental. Algumas cultivares são altamente sensíveis a condições do ambiente e estão sujeitas à ocorrência de diversas doenças, como aquelas causadas pelos fungos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* – raça 1 e o oomiceto *Pythium ultimum*, que juntos representam os principais agentes causadores de podridões radiculares e do colo de plantas jovens, bem como murcha generalizada. O manejo destes patógenos, veiculados pelo solo na cultura da alface deve ser baseado em um conjunto de medidas de controle, porque o solo é um ambiente complexo, envolvendo muitos microrganismos. Os fungicidas e inseticidas possuem diferentes modos de ação e atuam sobre diversos processos bioquímicos do alvo biológico. Fungos do gênero *Trichoderma* são os mais estudados e utilizados entre os agentes de controle biológico de doenças de plantas. Eles são reconhecidos em nível de gênero por suas características macroscópicas, tais como aparência das colônias, taxa de crescimento em meios de cultivos, agregação de conídios, produção de pigmentos difusíveis. Entretanto, em raríssimos casos, tais características são consideradas úteis na distinção de espécies. Esses fungos podem atuar como agentes de biocontrole, por diversos mecanismos, como o parasitismo, competição, antibiose, indução de resistência e promoção de crescimento. Além de constituírem importante recurso para uso na agricultura orgânica, esses agentes de biocontrole vêm atraindo atenção para uso na agricultura convencional, em combinação com o controle químico. O objetivo deste trabalho foi estudar a patogenicidade de fungos fitopatogênicos habitantes do solo advindos de cultivos de alface e feijão, às sementes de distintas cultivares de alface, o potencial de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *S. rolfsii*, causador da murcha-de-esclerócios em mudas de alface, bem como a compatibilidade destes agentes a produtos químicos registrados para a cultura. De 16 cultivares disponíveis para estudo, foram selecionadas as cultivares Gizele, BRS Lélia, Vitória de Santo Antão, BRS Mediterrânea, Mauren e BRS Leila em testes de germinação por diferentes métodos, previamente conduzidos. Dentre estas cultivares selecionadas, as melhores são representantes do tipo varietal crespa, BRS Mediterrânea, ‘BRS Lélia’ e ‘BRS Leila’, que demonstraram entre 97 e 100% de germinação de sementes pelos métodos papel-filtro, ágar-água e papel Germitest, como também, nos testes de patogenicidade conduzidos em laboratório, utilizando sementes inoculadas artificialmente com os patógenos *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* – raça 1, *R. solani* e *P. ultimum*. Todos os isolados dos fungos de solo utilizados, foram patogênicos a cultura da alface. Porém, causaram danos diferentes. O fungo *S. rolfsii* foi o que mais afetou a germinação das sementes de todas as cultivares testadas, comprometendo a germinação em 100% dos casos. Além disso, as cultivares Mauren e Vitória de Santo Antão foram as mais afetadas pela presença dos fungos *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *P. ultimum*, com incidência de até 100%. As cultivares melhores sobreviventes diante do agrupamento com todas as cultivares e patógenos, foram mais uma vez, as do tipo varietal crespa (BRS Mediterrânea, BRS Lélia e BRS Leila) com 86, 79 e 92% de probabilidade de germinação, respectivamente. Nos testes subsequentes, foram utilizados seis isolados de *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. koningiopsis* e uma espécie não identificada. A maioria dos isolados de *Trichoderma* testados foram superiores em crescimento micelial no pareamento com os fitopatógenos. Entretanto, *R. solani* e *P. ultimum* atingiram 4,7 e 4,8 cm de crescimento micelial contra os antagonistas *T. virens* e *T. koningiopsis*,

respectivamente. Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* também demonstraram baixas médias de crescimento micelial nos confrontos, apenas 3,03 e 2,71 cm. Os isolados de *Trichoderma* demonstraram potencial de inibição micelial acima de 50% contra todos os fitopatógenos, com exceção de *T. virens* (47%) e *T. harzianum* (49%) contra *R. solani*, e *T. harzianum* (43%) e *T. koningiopsis* (45%) contra *P. ultimum*. Ainda sim, estes índices variaram entre 43 a 76% para os fungos fitopatogênicos. O isolado *T. asperellum* foi o destaque na inibição micelial contra os patógenos, sendo consequentemente o responsável pelos maiores percentuais de inibição. Os resultados preliminares obtidos em casa de vegetação na inoculação de mudas de alface com 10, 15, 20 e 25 mL da suspensão de esporos de *T. asperelloides* e *T. koningiopsis* no substrato infestado com *S. rolfsii* (CEN1531), não mostraram evidência de que alguma combinação, antagonista + dose crescente, seja de alguma forma eficaz para o controle da doença nas condições testadas. Todavia, nos tratamentos com doses de 20 e 25 mL de *T. asperelloides* contribuíram para a sobrevivência de 50% das mudas ao final de 10 dias de experimentação. O meio BDA foi o escolhido para os estudos de compatibilidades *in vitro*. Todos os isolados de *Trichoderma* foram compatíveis em todas as doses testadas dos ingredientes ativo: iprodiona, boscalida e os inseticidas à base de imidacloprido e atingiram crescimento micelial total de 90 mm em placas de Petri. Nos ensaios com procimidona e iprodiona, todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram a morfologia da colônia diferentes das testemunhas, exceto o isolado *Trichoderma* sp. – CEN1441. Este mesmo isolado foi o único compatível ao ingrediente ativo procimidona em todas as doses. Contudo, nenhum dos isolados testados foi compatível com o fungicida tiabendazol. Ao ser avaliado o potencial dos seis isolados de *Trichoderma* como promotores de crescimento, todos contribuíram para a promoção de crescimento das mudas no final de 30 dias de experimento. Os incrementos de massa fresca de raiz e de parte aérea, altura de planta e comprimento de raiz, foram variáveis de 15 a 45% na cultivar BRS Leila com os isolados de *T. virens*, *T. koningiopsis* e *T. harzianum*, de 13 a 36% na cultivar Lélia com os isolados *T. asperellum*, *T. asperelloides* e de 44 a 78% na cultivar BRS Mediterrânea com os isolados *T. virens*, *T. asperellum* e *T. asperelloides*. O isolado *T. virens* foi o que mais contribuiu para o incremento das variáveis e a cultivar BRS Mediterrânea respondeu melhor às inoculações dos isolados de *Trichoderma*, enquanto ‘BRS Lélia’ apresentou o menor desempenho nas condições testadas. Perante os resultados alcançados ao longo de todos os capítulos desta dissertação, foi possível constatar que os testes de germinação utilizando diferentes métodos e a patogenicidade *in vitro*, pode apresentar potencial de uso em estudos preliminares na prospecção de genótipos de alface com potenciais germinativos e resistentes às doenças causadas pelos patógenos de solo e ainda, que a utilização de fungos do gênero *Trichoderma* contribui para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável em várias vertentes, como: prospecção *in vitro* de agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos, compatibilidade com moléculas químicas de fungicidas e inseticidas e na promoção de crescimento de plantas cultivadas.

Palavras-chave: biocontrole, fitopatógenos, fungicida, *Lactuca sativa*, qualidade de sementes.

Orientadora: Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

GENERAL ABSTRACT

LIMA, Rejayne Barbosa. **Pathogenicity of soil fungi on lettuce, biological control and compatibility of *Trichoderma* spp. with chemicals.** 2019. (167 p). Dissertation (Masters in Plant Pathology) - University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) originates from southern Europe and western Asia. Some cultivars are highly sensitive to environmental conditions and are subject to the occurrence of various diseases, such as those caused by the fungi *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* - race 1 and the oomycete *Pythium ultimum*, which together represent the main root and root rot agents of young plants, as well as widespread wilting. The management of these soil-borne pathogens in lettuce should be based on a set of control measures, because soil is a complex environment involving many microorganisms. Fungicides and insecticides have different modes of action and act on various biochemical processes of the biological target. *Trichoderma* fungi are the most studied and used among biological control agents of plant diseases. They are recognized at the gender level for their macroscopic characteristics such as colony appearance, growth rate in culture media, conidia aggregation and diffusible pigment production. However, in very rare cases such features are considered useful in distinguishing species. These fungi can act as biocontrol agents by various mechanisms such as parasitism, competition, antibiosis, resistance induction and growth promotion. In addition to being an important resource for use in organic agriculture, these biocontrol agents have attracted attention for use in conventional agriculture in combination with chemical control. The objective of this work was to study the pathogenicity of soil-dwelling phytopathogenic fungi from lettuce and bean crops, to the seeds of different lettuce cultivars, the potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *S. rolfsii*, which causes sclerotium wilt in lettuce seedlings, as well as the compatibility of these agents with chemicals registered for this crop. From 16 cultivars available for study, the cultivars Gizele, BRS Lélia, Vitória de Santo Antão, BRS Mediterranea, Mauren and BRS Leila were selected for germination tests by different methods previously conducted. Among these selected cultivars, the best are varietal curly variety, BRS Mediterranea, 'BRS Lélia' and 'BRS Leila', which demonstrated between 97 and 100% seed germination by paper-filter, water-agar and Gemitest paper methods, as well as in pathogenicity tests conducted in the laboratory using seeds artificially inoculated with the pathogens *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* – raça 1, *R. solani* and *P. ultimum*. All isolates of the soil fungi used were pathogenic to lettuce crop. However, they caused different damage. The fungus *S. rolfsii* was the one that most affected seed germination of all cultivars tested, affecting germination in 100% of the cases. In addition, the cultivars Mauren and Vitória de Santo Antão were the most affected by the presence of *S. sclerotiorum*, *R. solani* and *P. ultimum* fungi, with an incidence of up to 100%. The best surviving cultivars in the grouping with all cultivars and pathogens were, once again, the curly varietal type (BRS Mediterranean, BRS Lélia and BRS Leila) with 86, 79 and 92% probability of germination, respectively. In subsequent tests, six *Trichoderma* isolates were used: *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. koningiopsis* and one unidentified species. Most *Trichoderma* isolates tested were higher in mycelial growth in pairing with phytopathogens. However, *R. solani* and *P. ultimum* reached

4.7 and 4.8 cm of mycelial growth against *T. virens* and *T. koningiopsis* antagonists, respectively. The isolates of *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* also showed low average mycelial growth in the clashes, only 3.03 and 2.71 cm. *Trichoderma* isolates showed mycelial inhibition potential above 50% against all phytopathogens except *T. virens* (47%) and *T. harzianum* (49%) against *R. solani*, and *T. harzianum* (43%) and *T. koningiopsis* (45%) against *P. ultimum*. However, these rates ranged from 43 to 76% for plant pathogenic fungi. The *T. asperellum* isolate was the highlight in the mycelial inhibition against the pathogens, being therefore responsible for the highest inhibition percentages. Preliminary results obtained in a greenhouse on the inoculation of lettuce seedlings with 10, 15, 20 and 25 mL of the *T. asperelloides* and *T. koningiopsis* spore suspension in the *S. rolfsii* (CEN1531) infested substrate, showed no evidence of that some combination, antagonist + increasing dose, is in any way effective for disease control under the conditions tested. However, treatments with doses of 20 and 25 mL of *T. asperelloides* contributed to the survival of 50% of the seedlings after 10 days of experimentation. BDA medium was chosen for *in vitro* compatibility studies. All *Trichoderma* isolates were compatible at all tested doses of the active ingredients: iprodione, boscalide and imidaclopride-based insecticides and achieved total mycelial growth of 90 mm in petri dishes. In the trials with procimidone and iprodione, all *Trichoderma* isolates presented colony morphology different from the controls except the *Trichoderma* sp. - CEN1441. This same isolate alone was compatible with the active ingredient procymidone at all doses. However, none of the isolates tested were compatible with the thiabendazole fungicide. By evaluating the potential of the six *Trichoderma* isolates as growth promoters, all contributed to seedling growth promotion at the end of 30 days of experiment. Increments of fresh root and aerial part, plant height and root length varied from 15 to 45% in the cultivar BRS Leila with *T. virens*, *T. koningiopsis* and *T. harzianum* isolates, from 13 to 36% in cultivar Lélia with *T. asperellum*, *T. asperelloides* isolates and from 44 to 78% in cultivar BRS Mediterranean with *T. virens*, *T. asperellum* and *T. asperelloides* isolates. The *T. virens* isolate contributed the most to the increase of the variables and the cultivar BRS Mediterranean responded better to the inoculations of *Trichoderma* isolates, while 'BRS Lélia' presented the lowest performance under the tested conditions. Based on the results obtained throughout the chapters of this dissertation, it was found that the germination tests using different methods and *in vitro* pathogenicity may have potential for use in preliminary studies in the prospecting of lettuce genotypes with germinative potential and resistant to diseases caused by soil pathogens and the use of *Trichoderma* fungi contributes to the development of sustainable agriculture in several aspects, such as: *in vitro* prospection of phytopathogenic fungi biocontrol agents, compatibility with chemical molecules of fungicides and insecticides and promoting growth of cultivated plants.

Keywords: biocontrol, fungicide, *Lactuca sativa*, phytopathogens, seeds quality.

Guidance committee: Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello – Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (Advisor).

INTRODUÇÃO GERAL

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família botânica *Asteracea*, subfamília *Cichorioidea* e tribo *Lactucae* (Ryder, 1999). Esta planta é uma hortaliça folhosa, que possui porte herbáceo, com folhas alternas presas a um caule curto, de grande importância e consumo mundial. O melhoramento genético desta hortaliça adicionou características à espécie. Assim, a alface pode apresentar folhas lisas ou crespas, soltas ou formando uma cabeça; suas cultivares podem apresentar variações na coloração do verde-amarelo ao verde-escuro ou roxo, sendo denominadas e comercializadas de acordo com o tipo varietal de cada cultivar (Azevedo Filho, 2017).

A possibilidade de cultivos sucessivos no mesmo ano, o consolidado hábito de consumo alimentar pela população com demanda sempre crescente do produto, são fatores que fazem da alface a hortaliça folhosa mais produzida no Brasil, fato que confere a essa cultura uma grande importância econômica e social. A preferência do brasileiro é pelo tipo varietal crespa, seguido da americana (Sala & Costa, 2016). A produção de alface, que se concentra em áreas próximas a centros metropolitanos e hortas domésticas, é feita por meio do transplântio de mudas para canteiros, estufas e campos definitivos. A colheita ocorre entre 50 e 70 dias após o transplântio, com média de 60 a 80 mil plantas/ha em campo (Azevedo Filho, 2017).

Fatores bióticos e abióticos podem interferir na germinação das sementes e na produção desta hortaliça (Menezes *et al*, 2000). Dentre esses fatores, citam-se a influência da luz e baixas temperaturas, quando a semente entra em estado de termodormência (ausência da germinação após redução da temperatura), termoinibição (processo reversível quando as sementes são submetidas em temperaturas adequadas), dormência (quando mesmo diante de fatores favoráveis a semente não germina ou atrasa a germinação). Franzin *et al*. (2005) concluiu, em um estudo para o efeito da qualidade das sementes sobre a formação de mudas

de alface, que sementes de alta qualidade fisiológica produzem uma maior percentagem de mudas vigorosas. O ataque de uma diversidade de agentes fitopatogênicos como vírus, nematoides, bactérias, fungos e insetos-praga também podem reduzir ou até mesmo impedir a produção da alface (Lopes *et al.*, 2010).

Dentre as doenças da alface, citam-se as viroses que estão representadas pelos gêneros *Potyvirus*, *Tospovirus*, *Varicosavirus*, *Ophiovirus*, *Sequivirus* e *Cucumovirus*, como relevantes (Lim *et al.*, 2014; Colariccio *et al.*, 2005; Czajkowski, 2016); os nematoides, destacando-se *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* e, entre as bactérias, principalmente aquelas dos gêneros *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Pseudomonas* (Amorim *et al.*, 2016). Entretanto, no reino Fungi, encontra-se a maioria dos microrganismos causadores de doenças em plantas cultivadas (Carris *et al.*, 2012). Entre estes, os gêneros *Bremia*, *Septoria*, *Cercospora*, *Golovinomyces*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Sclerotinia* e *Phytophthora* são os de maior ocorrência em alface (Qiu *et al.*, 2018; Pintore *et al.*, 2017). Juntos ou individualmente, estes últimos causam perdas na qualidade e produtividade da cultura, em diferentes níveis de produção. As perdas decorrentes de infecções por esses fungos podem ser totais, inviabilizando áreas de cultivo (Amorim *et al.*, 2016).

Patógenos habitantes do solo podem causar sintomas em raízes e partes aéreas de plantas de alface, caracterizados por tombamento ou "damping-off", podridões-de-raízes, murchas e rizoctonioses ou queima-da-saia. Alguns destes são os fungos: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor*, *Sclerotium rolfsii* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Além do oomiceto do gênero *Pythium* spp. Para o controle de tais doenças de causa fúngica, são necessárias medidas de controle baseadas nos princípios de Whetzel (Amorim *et al.*, 2016), tais como: quarentena de material vegetal, para impedir a entrada/estabelecimento de patógenos; erradicação de plantas infectadas; medidas regulatórias na comercialização de

sementes e mudas, bem como a aplicação de produtos fitossanitários. Atualmente o controle biológico vem sendo incentivado como medida alternativa ou complementar ao controle químico (Bergamin Filho & Amorim, 2018).

O modelo de cultivo adotado pelos produtores desta hortaliça, durante anos, alicerçado no uso de fungicidas químicos sem rotatividade de ingredientes ativos e/ou utilizados de maneira inadequada, aumenta os riscos de ocorrência de epidemias e resistência de fungos a esses produtos. Além disso, as características inerentes aos monocultivos contribuem para o desequilíbrio populacional da microflora benéfica existente nos solos (Krendics *et al.*, 2003). Em face disso, há hoje um crescente interesse pelo controle biológico, pelo uso, principalmente, de fungos agentes de controle biológico, dentro do contexto de manejo de doenças em culturas. Em regra, várias espécies precisam ser controladas ao mesmo tempo e isso requer a integração do agente de biocontrole com outras práticas de manejo, inclusive com produtos químicos, não só aqueles utilizados no controle das doenças (fungicidas, bactericidas e nematicidas), mas também os que são aplicados contra outros organismos prejudiciais à cultura (inseticidas e acaricidas). Entretanto, existem relatos demonstrando a sensibilidade de agentes de controle biológico a diferentes moléculas químicas componentes dos fungicidas e inseticidas (Gampala & Pinnamaneni, 2010).

Os fungos antagonistas mais estudados e utilizados no desenvolvimento de biofungicidas são do gênero *Trichoderma*, (fase imperfeita de *Hypocrea*), o qual pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae. O gênero *Trichoderma* foi proposto por Persoon (1974) com base em um conjunto de características bem definidas. Porém, as espécies são pouco delimitadas por caracteres morfológicos. Por isso, atribuiu-se o termo "agregado de espécies" para se referir a um grupo de fungos com características morfológicas comuns dentro do gênero (Rifai, 1969; Samuels, 1996).

Para se determinar gêneros, consideram-se as seguintes características: crescimento rápido, atingindo 90 mm diâmetro, após quatro dias em meio de cultura (Esposito & Silva, 1998); colônias dispersas, flocosas, ou compactadas em tufo; tamanho e formato dos conídios variados; clamidósporos, às vezes presentes; coloração de conídios variando de verde a amarelo, ou até mesmo hialino; conidióforos bem definidos, de forma piramidal e conídios formados nas extremidades de fiáides de hifas diferenciadas. Os conídios tendem a se agregar em massas e, em algumas espécies, há dependência da luz para a esporulação. A designação e a identificação de espécies atualmente são realizadas, principalmente, utilizando técnicas de sequenciamento e comparação de sequências de regiões específicas do DNA ribossomal (Samuels, 1996; Kullnig *et al.*, 2000; Kullnig *et al.*, 2002; Valadares-Inglis *et al.*, 2018).

Trichoderma spp. são fungos oportunistas, simbioses de plantas e fortes competidores em seu habitat natural (solos); produzem um arsenal de enzimas capazes de degradar parede celular de outros fungos. A importância deste gênero de fungo no controle biológico de doenças de plantas reside, também entre outros mecanismos, na sua capacidade de produzir metabólitos secundários com propriedades antibióticas (Kumar *et al.*, 2012). Entre estes, incluem-se antibióticos e reguladores de crescimento, (auxinas, citocininas, giberilinas e etileno); ácidos cítrico, glutâmico, láctico, fumárico, málico e tartárico, a maioria dos quais, envolvidos na solubilização de minerais e disponibilização de nutrientes para as plantas, desse modo, atuando na promoção de crescimento de plantas. Acrescenta-se a estes os sideróforos, ou compostos que formam complexos férricos assimiláveis pelas plantas (Glick *et al.*, 2012). Tais características são fundamentais para o sucesso do agente de controle biológico na agricultura (Lorito *et al.*, 1993), pois a planta bem nutrida resiste melhor a infecções (Gravel *et al.*, 2007). Friedl & Druzhinina (2012a), sugeriram que certos isolados de *Trichoderma*

colonizam raízes, estabelecendo uma comunicação química que altera sistematicamente a expressão de vários genes de plantas.

O controle biológico tem se tornado indispensável para a agricultura moderna, devido à crescente demanda por alimentos orgânicos, em especial frutas e vegetais frescos, entre os quais, a alface. Alia-se a este fato, a ineficácia de produtos químicos em controlar sozinhos os fitopatógenos (Elad *et al.*, 1982; Coley-Smith *et al.*, 1991; Cavero *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2017; Smolinska & Kowalska, 2018). A prospecção e identificação de novas linhagens permite atender à demanda por matéria-prima para uso biotecnológico, visando à produção de biofungicidas mais efetivos e adaptados a regiões específicas.

No manejo integrado de pragas e doenças da alface, além da agricultura orgânica, há uma nova vertente agregando os controles químicos e biológicos de forma integrada. Essa integração depende muito da capacidade do agente de biocontrole em sobreviver a determinados ingredientes ativos que controlam o fitopatógeno, pois este agente de biocontrole pode sofrer problemas em sua eficácia na presença de produtos químicos (Silva *et al.*, 2018).

Tendo em conta o que foi dito, estes estudos se baseiam nas seguintes hipóteses científicas: 1) isolados de fungos fitopatogênicos de solo são patogênicos a sementes de alface, desde que acondicionados em temperatura de 26 °C; 2) isolados de *Trichoderma* apresentam diversidade no antagonismo *in vitro* a patógenos de solos patogênicos à cultura da alface; 3) o agente de biocontrole pode ser compatível com diferentes ingredientes ativos e doses de fungicidas e inseticidas recomendados à cultura da alface; 4) *Trichoderma* spp. inoculados a sementes, podem promover o desenvolvimento de plantas de alface.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Conhecer a patogenicidade de fungos de solo em sementes de diferentes cultivares de alface, avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle das doenças causadas por esses fungos fitopatogênicos e a compatibilidade do agente de biocontrole com produtos químicos (fungicidas e inseticidas) usualmente utilizados na cultura, e, por fim, avaliar o efeito da inoculação de *Trichoderma* spp. em sementes de alface, em casa de vegetação.

Objetivos específicos

- Avaliar, por diferentes métodos (ágar-água, papel Germitest e papel filtro) a influência na germinação de sementes de cultivares de alface recém-lançadas ('BRS Leila', 'BRS Lélia' e 'BRS Mediterrânea' (Agrocinco[®]), além de outras já comercializadas (Mauren, 'Gizele', 'Vanda', 'Veronica', 'Vitória de Santo Antão', 'Rubi', 'Elisa', 'Regina', 'Raider Plus', 'Laurel', 'Donna', 'Hanson' e 'Veneza') e selecionar as que apresentarem melhor poder de germinação para uso nos ensaios subseqüentes.
- Testar *in vitro* a patogenicidade e influência dos isolados de *S. sclerotiorum* (CEN1147 e CEN1530), *S. rolfsii* (CEN216 e CEN1531), *R. solani* (RHI23), *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac raça 1 - 240 e FOLac raça 1 - 206) e *P. ultimum* (PYT555), na germinação das sementes das cultivares selecionadas.
- Selecionar isolados de *Trichoderma* com potencial antagônico contra os fungos de solo patogênicos à alface, pela técnica do pareamento de cultura.
- Avaliar, em casa de vegetação, a capacidade de isolados de *Trichoderma* de suprimir da podridão de esclerócios causada por *S. rolfsii*, em mudas de alface.
- Observar o aspecto de colônias dos isolados de *Trichoderma* em diferentes meios, determinando o meio mais propício para a visualização de crescimento e esporulação de *Trichoderma* spp.

- Avaliar a compatibilidade dos isolados de *Trichoderma* em meio suplementado com diferentes doses dos ingredientes ativos: boscalida, procimidona, tiabendazol, imidacloprido e iprodiona. Todos recomendados para o controle de fitopatógenos de solo na cultura da alface.
- Com base no ensaio de compatibilidade, investigar o efeito das moléculas químicas na morfologia das colônias de *Trichoderma* spp.
- Avaliar o efeito dos isolados de *Trichoderma* como promotores de crescimento de plantas de alface.

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura

1.1. A cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta originária do Sul da Europa (região Mediterrânea) e Ásia ocidental, onde se incluem 17 países, dentre os quais, a Arábia Saudita, Irã e Turquia. Como quase tudo que se é consumido no Brasil, acredita-se que a planta foi aqui introduzida pelos portugueses no século XVI. Esta hortaliça folhosa vem sendo cultivada desde a civilização Egípcia, há 3.000 anos e é apreciada pelas suas propriedades diuréticas, laxativas, analgésicas, anti-inflamatórias e também como fonte de vitaminas A, B1, B2, B6, C, sais de cálcio e de ferro (Davis *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2006).

De acordo com um levantamento realizado pela FAO (Faostrat, 2017), foi registrada a produção mundial de alface ao longo de 23 anos (1994-2017). Nos anos 1990, essa produção se manteve entre 14.261.120 e 17.191.619 toneladas (t), aumentando entre 2000 e 2017 para 26.866.557 t. Os maiores produtores são a China e os Estados Unidos. A alface está presente na mesa dos consumidores brasileiros, figurando entre as cinco principais hortaliças mais consumidas no país.

Trata-se também de uma cultura atrativa para os agricultores, pelo seu ciclo curto, alta produtividade, possibilidade de ser cultivada durante todo o ano, próxima aos centros metropolitanos, utilizando os mais diversos sistemas de produção, em hortas domésticas, hidroponia, campo aberto e cultivo protegido (Sala & Costa, 2016). Devido possibilitar a antecipação do ciclo da cultura, à elevada qualidade, à homogeneidade, à maior durabilidade em pós-colheita e à programação da produção, o cultivo hidropônico da alface vem crescendo entre os produtores de hortaliças (Yañez, 2000). Apesar de oferecer inúmeras vantagens, esse sistema de cultivo exige cuidado especial quanto à sanidade das plantas por parte dos produtores (Paulitz, 1997; Lopes *et al.*, 2010).

O gênero *Lactuca* possui, cerca de 100 espécies, considerando os grupos de espécies domesticadas e selvagens, ao todo mais de 100 espécies. A planta é diploide, com um genoma

de 2,7 Gb, porte herbáceo com folhas alternadas presas a um caule curto, inflorescência do tipo capítulo composta de 10-25 flores (Lebeda *et al.*, 2014). O termo cultivar está relacionado ao melhoramento genético vegetal, no qual ocorre a alteração ou introdução, pelo homem, de características que anteriormente a planta não possuía. As cultivares se distinguem das variedades originais dentro da espécie, por sua homogeneidade, estabilidade e novidade (Barrière *et al.*, 2014). Elas estão classificadas conforme se apresentam ao consumidor, de acordo com a formação da cabeça, tipo de folha, coloração e grau de crocância. As folhas podem ser lisas ou crespas, formando ou não "cabeça" e com colorações em tons de verde ou roxa. As cultivares de alface são agrupadas em seis tipos varietais: repolhuda-crespa (americana), repolhuda-manteiga (lisa, cabeça compacta), solta-lisa (sem formação de cabeça), solta-crespa (folhas tipicamente onduladas e sem formação de cabeça), mimosa (aspecto recortado) e romana (folhas alongadas, cabeça pouco densa). A preferência do brasileiro, segundo Sala & Costa (2012) são as dos tipos crespas e americanas.

A tecnologia de melhoramento das espécies de alface possibilitou e viabilizou seu cultivo nos diferentes climas brasileiro, mesmo onde ocorrem temperaturas mais elevadas e regiões mais chuvosas. Temperaturas ideais para a produção de folhas e a formação da cabeça de alface estão entre 12 e 22°C. Temperaturas acima desse limite favorecem o florescimento (pendoamento) precoce das plantas, provocando o alongamento do caule e estimulando a produção de látex, que confere sabor amargo às folhas, além de reduzir o número de folhas e afetar a formação de cabeça. Altas temperaturas também podem inibir a germinação das sementes (Silva *et al.*, 2000; Sala & Costa, 2016).

As sementes de alface apresentam grande sensibilidade às condições do ambiente, resultando na germinação em atraso e desuniforme, bem como má qualidade na produção de mudas. Os limites extremos de temperatura de germinação fornecem informações de interesse biológico e ecológico, principalmente pela diversidade de cultivares existentes no mercado

(Menezes *et al.*, 2000). Diferentes cultivares apresentam diferentes faixas de temperatura ideais para a germinação, mas a suspensão da germinação em temperaturas do verão pode ocorrer.

A interação entre os fatores que afetam a germinação pode determinar estandes desuniformes, variando em até 80% (Cantliffe & Perkins-Veazie, 1984). Conforme Castro *et al.* (2005) a germinação de sementes de alface é influenciada pela interação entre os fatores temperatura e luminosidade, sendo altamente dependentes da luz, o que significa que elas são fotoblásticas positivas. Porém, devido à domesticação e a produção em larga escala, algumas cultivares passaram a atuar como fotoblásticas neutras.

No Brasil, a condução do teste de germinação baseia-se nas instruções determinadas pelo Ministério da Agricultura através do Manual de Regra de Análises de Sementes (2009). Estes testes visam a obter subsídios para determinar o potencial máximo de uma amostra de sementes germinarem nas condições ótimas de ambiente e comparar diferentes lotes de sementes quanto ao poder germinativo (Marcos Filho, 2005). Para testes em laboratório com as sementes de alface, os tipos de papel comumente utilizados como suporte são: o mata-borrão, o papel toalha (Germitest) e o papel filtro. Além destes, também é recomendada a germinação em areia. Teste biológico para substâncias nocivas é recomendado, comparando papel de qualidade desconhecida com o papel em estoque, de qualidade conhecida e aceitável. Para isto, sementes de certas espécies são reconhecidamente sensíveis a determinadas substâncias reconhecidamente prejudiciais a espécies vegetais, entre as quais a alface.

A qualidade fisiológica das sementes é avaliada rotineiramente pelo teste de germinação, entretanto, este resultado nem sempre corresponde à emergência em campo (Bhering *et al.*, 2000). Nos últimos anos, várias empresas, entre as quais, Sakata, TopSeed, Horticeres, Feltrin, Takii, Sakama, Hortec, Eagle e Enza Zaden, desenvolveram e validaram cultivares de alface com tolerância a diversas faixas de temperaturas e adaptadas à diferentes

regiões do Brasil, com resistência a fitopatógenos e alta produtividade, com vistas a atender à necessidade de um fluxo contínuo de seleção de materiais genéticos em razão das demandas futuras do setor (Cabral, 2016).

1.2. Principais doenças de solo e medidas de controle

A alface está sujeita à ocorrência de diversas doenças em todos os modelos de produção, seja em larga ou em menor escala, em todos os sistemas de produção. Na hidroponia, a atenção deve ser redobrada, por causa da baixa diversidade biológica, elevada densidade e uniformidade genética de plantas, características que favorecem o desenvolvimento de epidemias. Além disso, devido à solução nutritiva circular por todo o sistema, a disseminação dos patógenos é eficiente (Paulitz, 1997).

Nos grupos II, III e IV de classificação de doenças, de acordo com a interferência nos processos fisiológicos da planta induzidos pelo patógeno, estão as doenças de raiz e caule (*damping-off* ou tombamento, podridões de raiz e do colo e as murchas vasculares) causados por fungos habitantes do solo (Bedendo, 1995). Os fungos e oomicetos (fungos não verdadeiros), responsáveis por esse quadro sintomatológico, podem reduzir significativamente a produção e a qualidade do produto final, pois as principais exigências do mercado consumidor é a aparência da planta colhida, principalmente devido ao consumo ser *in natura* (Amorim *et al.*, 2016).

Entre os agentes causais de *damping-off* na cultura da alface estão espécies de *Pythium* spp. Estes fungos não verdadeiros pertencem ao Reino Chromista, classe dos Oomycetes, subclasse Peronosporidae, dentro da ordem Pythiales, família Pythiaceae, gênero *Pythium*, com destaque para a espécie *P. ultimum*. Este gênero possui hifas não septadas, finas e delicadas, que se ramificam intensamente, formando um micélio branco e esparso; engloba espécies fitopatogênicas relacionadas aos sistemas de cultivo em hidroponia, devido aos seus

oósporos dotados de flagelos e fragmentos de hifas, que auxiliam na dispersão entre plantas (Stanghellini & Rasmussen, 1994; Martin & Loper, 1999; Owen-Going *et al.*, 2003; Sutton *et al.*, 2006). *Pythium* spp. podem ser facilmente disseminados por sementes, mudas, substratos, água, bandejas, ferramentas contaminadas e através de vetores como "fungus gnats" (*Bradysia* spp.) e "shore flies" (*Scatella stagnalis* Fallen.), que se alimentam das raízes infectadas com o fungo (Goldberg & Stanghellini, 1990; Stanghellini & Rasmussen, 1994).

Contudo, em *P. ultimum* ou *Globisporangium ultimum* (Trow) Uzuhashi, é rara a produção de zoósporo, o que ocorre mais na espécie *P. aphanidermatum* (Uzuhashi, 2010). Este oomiceto é considerado como um dos gêneros de organismos zoospóricos de maior relevância causando apodrecimento de raízes, caules e frutos, a podridão de sementes na pré-emergência e o tombamento de plântulas na pós-emergência (*damping-off*), (Nzungize *et al.*, 2012).

Isolados de *Pythium* são frequentemente destrutivos na maioria das culturas produzidas em sistemas hidropônicos, principalmente nas épocas em que ocorre a elevação da temperatura da solução nutritiva e do ambiente das casas de vegetação (Sutton *et al.*, 2006). Muitas espécies podem parasitar uma ampla variedade de hospedeiros, enquanto outras são restritas à apenas uma espécie de hospedeiro (Plaats-Niterink, 1981).

Patekoski & Zottarelli (2009) realizaram um estudo para investigar a patogenicidade *in vitro* de *P. aphanidermatum* e *P. dissotocum* em variedades de alface, sendo Vera e Tainá menos suscetíveis e Elisa, como mais suscetível, nas temperaturas de 20 °C e 31 °C. Pinto *et al.* (2005) estudaram a suscetibilidade de variedades de alface a *P. helicoides*, verificando que variedades crespas foram mais suscetíveis, quando comparadas com as do tipo mimosa e lisa. Pinto *et al.* (2011) realizaram ensaios de patogenicidade *in vitro* e *in vivo* envolvendo *P. aphanidermatum* com as cultivares de alface crespa 'Vera' e 'Verônica', e lisa 'Regina' e 'Elisa'. Todas as cultivares foram suscetíveis à podridão de raízes em ambos os experimentos.

Rhizoctonia solani Kuhn é outro importante fitopatógeno de solo que causa perdas em diversas culturas de importância econômica, inclusive hortaliças (Faltrin *et al.*, 2004). Este fungo pertence ao Reino Fungi, filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Cantharellales, família Ceratobasidiaceae, gênero *Rhizoctonia* e espécie *R. solani*; que possui hifas septadas, micélio pardacento a marrom, com presença de ramificação lateral em ângulo reto, ausência de conídios e produção de estruturas de resistência denominadas microescleródios (Adams, 1988). O fungo pode ser introduzido em solos ou substratos em qualquer etapa do plantio, tanto via sementes como por meio de substratos contaminados (Lewis & Lumsden, 2001).

A doença causada por *R. solani* em áreas sob intenso cultivo é conhecida por queima-da-saia, devido aos sintomas típicos nas folhas mais velhas, no baixeiro das plantas, com escurecimento vascular que evolui para lesões marrom-claras nas nervuras que aumentam de tamanho, necrosando e causando a queima total. Na base da planta de alface doente é característico o crescimento micelial vigoroso, branco no início e pardo num estágio avançado da infecção do patógeno. Em solos infestados podem ocorrer perdas de 100% da produção (Bedendo, 2018).

De acordo com Tofoli & Domingues (2017), em plantas de alface, *R. solani* pode causar perdas elevadas em solos infestados e em condições favoráveis, ou seja, umidade elevada e temperaturas entre 15 e 25 °C. Grosch *et al.* (2004) constataram que *R. solani* é mais agressivo à temperatura ótima para o seu desenvolvimento, que é de 25 °C. Silva & Lima Neto (2007) constataram que a queima-da-saia em alface hidropônica em cinco municípios da região metropolitana de Curitiba/PR foi prevalente nos meses mais frescos do ano, sem distinção de variedades (Elisa, Isabele, Lídia, Roxane, Vera e Verônica), em plantas próximas ao ponto de colheita.

Em um levantamento realizado por Pacifico (2017), em propriedades produtoras de alface no sul de Minas Gerais, observou-se a ocorrência de 67,6% das plantas, quando a temperatura foi de 25 °C, precipitação em torno de 300 mm e a umidade relativa maior que 80%. No entanto, a queima-da-saia não ocorreu nos meses com temperaturas mais amenas, em torno de 15 °C e precipitação de 70 mm.

Outra doença importante na cultura da alface é a podridão-de-esclerotínia ou mofo-branco. A doença é conhecida por mais de 60 nomes e o mais comumente utilizado para sua designação é mofo-branco (Gorgen, 2009). Esta doença tem como agente causal o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, que pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero *Sclerotinia*. Nesta ordem (Helotiales) estão várias espécies de fungos capazes de produzir escleródios bem desenvolvidos e melanizados, cuja função é a sobrevivência em períodos desfavoráveis, tem crescimento micelial branco, cottonoso, vigoroso, e produz esporos no ciclo sexual. Os ascósporos são projetados e disseminados pelo vento (Bolton *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2016).

Sclerotinia sclerotiorum é mundialmente distribuído e tido como um dos fitopatógenos mais agressivos. No desenvolvimento inicial da doença em alface, a planta apresenta murcha progressiva, seguida de amarelecimento, colapso generalizado e morte. Devido ao crescimento micelial rápido e a alta capacidade de colonização dos tecidos vegetais, as lesões nas plantas se apresentam com aspecto úmido, coloração castanho-clara ou escura, onde ocorre a formação de grande número de escleródios (Amorim *et al.*, 2016). O ataque deste patógeno pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, principalmente próxima à colheita. Os escleródios permanecem por vários anos no solo, o que torna a doença difícil de ser controlada (Pavan & Kurozawa, 1997).

A epidemia pode ser iniciada com o uso de sementes infectadas, internamente por micélio dormente do fungo ou, infestadas por escleródios transportados junto ao lote de sementes (Pereira *et al.*, 2015). O micélio presente nos cotilédones das sementes pode permanecer viável por vários anos. Muitas sementes assim infectadas podem não germinar, porém, produzir micélio e esclerócios (Tu, 1998).

Cultivos sucessivos de alface propiciam o acúmulo crescente de inóculo do patógeno. Isso leva a perdas de produção de aproximadamente 75% e em casos mais severos podendo chegar a 100% (Pereira *et al.*, 2015), quando em condições de alta umidade do solo (Homechin, 1982; Ferraz *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 1999; Pavan *et al.*, 2005).

A ampla variabilidade de isolados de *S. sclerotiorum* em áreas de cultivo pode dificultar o manejo da doença, principalmente no que diz respeito a tratamento de sementes. O elevado nível de variabilidade genética estimado em populações de *S. sclerotiorum* é algo característico da espécie, como relatado em populações estudadas em outras regiões do Brasil e de outros países com uso de marcadores moleculares (Gomes *et al.*, 2011; Sexton & Howllet, 2004).

O gênero *Sclerotium* pode ser citado, na sua fase perfeita, como *Athelia* (Curzi) C.C. Tu & Kimbr, contudo, será citado como *Sclerotium* nesta dissertação. A espécie *S. rolfsii* é causadora da murcha-de-esclerócio ou podridão de raízes na alface e pertence ao Reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Atheliales, família Typhulaceae, gênero *Sclerotium*. Esse fungo apresenta hifas septadas, finas, brancas e intensamente ramificadas, formando um micélio abundante, cotonoso e solto. Possui duas características comuns com *Sclerotium* spp: formação de escleródios como estruturas de resistência e presença de micélio estéril (Bedendo, 2018).

O fungo *S. rolfsii* ocorre predominantemente em regiões de clima tropical e subtropical do mundo, onde o patógeno pode causar perdas de 100% (Martins *et al.*, 2003).

Especificamente em alfaces, a infecção se dá na fase adulta da planta, quando a folhagem compacta mantém a umidade (Lopes *et al.*, 2010). A doença distribuiu-se por todas as regiões agrícolas, onde predominam condições de alta umidade e temperatura elevada, já que este fungo tem o seu desenvolvimento ótimo na faixa de 27-30 °C (Aycock, 1966; Punja, 1985). A transmissão por meio de sementes não depende apenas da constatação de sua presença, mas também de fatores bióticos e abióticos, relacionados ao fungo e à hospedeira envolvida (Henneberg *et al.*, 2012). Lima *et al.* (1997) realizaram ensaios de patogenicidade de *S. rolfsii* usando sementes de mamoneira, tendo observado germinação baixa, em torno de 50%. Ventura *et al.* (2018) relataram a ocorrência, em cultivos de batata-baroa, da murcha ou podridão-de-esclerócio tanto em condições de campo e como na pós-colheita.

Além dos fungos causadores de podridões radiculares já abordadas (Grupos II e III), também podem ser citados os do complexo *Fusarium oxysporum* (anamorfo de *Giberella*) em especial *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* Matuo e Motohashi, que também está inserido no grupo de patógenos causadores de murchas vasculares e deterioração de sementes de alface (Grupo IV). Este fungo pertence ao Reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Sordariomycetes*, subclasse *Hypocreomycetidae*, ordem *Hypocreales*, família *Nectriaceae*, gênero *Fusarium* e espécie *F. oxysporum*. Esse gênero é amplamente discutido e estudado taxonomicamente, devido à importância para a cultura e por apresentar, além de *formae specialis*, raças fisiológicas como I, II e III (Cabral, 2016).

Fusarium oxysporum f. sp. *lactucae* possui micélio vigoroso, podendo variar de branco ao arroxeadado; as hifas são septadas e produzem macro e microconídios curvos, fusiformes, septados ou não; também produz estruturas de resistência denominadas de clamidósporos (Leslie *et al.*, 2006).

Segundo Ventura & Costa (2008), a doença em alface foi reportada pela primeira vez no estado do Espírito Santo e logo depois se disseminou pelas regiões Sudeste e Sul do país. Os

isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, além de comporem três grupos, são separados de acordo com a reação diferencial de raças, nas distintas cultivares de alface (Fujinaga *et al.*, 2003). As plantas infectadas pelo fungo apresentam folhas basais amareladas, atrofia generalizada, sem formação de cabeça, listras marrons ou enegrecidas no sistema vascular (obstrução do xilema da planta), com o córtex de coloração avermelhada ou castanha, murcha seguida de atrofia e morte da planta. Este fungo sobrevive em restos de cultura e por vários anos no solo (Ventura & Costa, 2008).

A disseminação da doença é principalmente pelo uso de sementes infectadas, mas o patógeno pode propagar-se através do plantio de mudas infectadas e, uma vez introduzido em áreas livres da presença do patógeno, este sobrevive por vários anos no solo. A fusariose ou murcha de fusário causada pelo fungo, afeta de forma significativa o estande, a produtividade e, em especial, a qualidade das alfaces, podendo causar perdas superiores a 70% (Pasquali *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2009).

No campo, a fusariose afeta plantas ao acaso e pode ocorrer associada a outras doenças como a queima-da-saia (*R. solani*) e a murchadeira (*Thielaviopsis basicola*). Matheron (2015) explica que as plantas de alface adultas podem sobreviver ao ataque do patógeno, mas geralmente se apresentam com tamanho reduzido e os campos infestados com este patógeno podem aumentar significativamente em pouco tempo. A ocorrência da fusariose é mais frequente no verão, quando prevalecem períodos com altas temperaturas e umidade (Fujinaga *et al.*, 2003).

O controle das doenças radiculares é difícil, por se tratar de patógenos que coevoluiram com as plantas por milhões de anos, adaptados ao ambiente subterrâneo em associação com o hospedeiro (Michereff *et al.*, 2005). Os gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* e *Sclerotinia* juntamente com *Fusarium oxysporum*, representam os principais agentes causadores de podridões radiculares de plantas, e murcha generalizada (Tofoli & Domingues,

2017; Lopes *et al.*, 2010). O manejo destes patógenos veiculados por sementes e outros mecanismos de dispersão deve contemplar um conjunto de medidas de controle, porque o solo é um ambiente complexo, habitado por muitos microrganismos, interagindo entre si e com as plantas (Michereff *et al.*, 2005; Tofoli *et al.*, 2012).

Como o modo de plantio se dá por meio de transplântio de mudas de 25-30 dias (dependendo da cultivar), a utilização de substrato esterilizado ou solarizado, bandejas limpas e sementes sadias, livres de qualquer patógeno ou estruturas de sobrevivências desses fungos é essencial e preventiva. Deve-se evitar solo com excesso de umidade, o local de plantio deve ser bem ventilado e com boa luminosidade. Adubações equilibradas também contribuem para o controle destes patógenos (Pavan & Kurozawa, 1997).

Rotação de culturas com espécies não hospedeiras dos patógenos, não apresenta importância significativa no controle das doenças em questão, uma vez que tais organismos se mantêm por vários anos no solo, como estruturas de sobrevivência (Reis *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2010). Contudo, visando o manejo integrado de doenças, é preciso que a rotação de culturas em áreas sob a infestação seja bem programada, devido à ampla gama de hospedeiras desses patógenos entre as espécies cultivadas, como feijão, soja, tomate e outras hortaliças (Melzer *et al.*, 1997; Blancard *et al.*, 2003; Bolton *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2007; Goulart, 2018).

No preparo do solo, é importante eliminar as possíveis compactações na camada subsuperficial, causadas pelo uso inadequado de implementos agrícolas, como o arado e grade. Nos cultivos em campo aberto, a população de plantas indicada fica em torno de 80.000 plantas/hectare, sendo que o espaçamento entre plantas deve promover boa ventilação; irrigações por aspersão devem ser evitadas, e os restos culturais eliminados, assim como qualquer possível fonte de inóculo primário (Amorim *et al.*, 2016). Em alguns casos,

cultivares resistentes ou tolerantes podem ser empregadas, caso haja sementes disponíveis no mercado, com tal característica, conforme listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Cultivares de alface de diferentes grupos varietais com resistência à murcha de fusário, queima da saia, *damping-off*, mofo-branco e murcha-de-esclerócio, disponíveis no Brasil.

Doença	Grupos	Cultivares
Murcha de fusário (<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>)	Crespa	Valentina, Marisa, Vanda, ‘BRS Leila’, ‘BRS Mediterrânea’ e ‘BRS Lélia’
Queima da saia (<i>R. solani</i>)	Americana	Laurel e Delícia
<i>Damping off</i> (<i>Pythium</i> spp.)	Lisa	Regina e Carolina – AG 576
Mofo-branco (<i>S. sclerotiorum</i>)	Não relatado	Não relatado
Murcha de esclerócio (<i>S. rolfsii</i>)	Não relatado	Não relatado

Fonte: Cabral, 2016; Tofoli & Domingues, 2017.

A suscetibilidade das cultivares de alface aos patógenos de solo pode variar em função das condições climáticas, genótipos do patógeno existente na área, pressão de doença, época de plantio, espaçamento e nutrição das plantas. Um levantamento realizado por Cabral & Reis (2013) com 77 cultivares e 25 linhas de melhoramento genético de alface da Embrapa Hortaliças, revelou duas cultivares extremamente suscetíveis a *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 (Regina e Elisa) e 47 acessos considerados fontes de resistência promissoras, das quais 19 são pertencentes ao grupo alface manteiga "Butterhead". O estudo também concluiu que cultivares do grupo Mimosa, Green Salad Bowl, Oak Leaf Saladin, Red Salad Bowl, Salad Bowl Roxo, Red Salad Bowl Ultra Rosso, Red Mimosa Vermelha e Roxane são, via de regra, altamente resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*. Outras cultivares como Donna, Grand, Elba, Pira Roxo, Hanson, Lucy Brown, Saia Veia, Cubana, Vanessa, Vanda, Cinderela, Mimosa, Simpson, Red Salad Bowl Ultra Rosso, Sabrina, Angelica e Lavínia

também demonstraram alta resistência aos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* utilizados no estudo.

É relevante lembrar que, a patogenicidade e virulência de um fitopatógeno são termos utilizados por profissionais de diferentes áreas de forma confusa e muitas vezes imprecisa. Shaner *et al.* (1992) reúne algumas definições utilizadas por diversos autores, sugerindo algumas recomendações na sua utilização. Neste estudo, assim como Shaner *et al.* (1992) e Idnum *et al.* (2001), será utilizado o termo patogenicidade como a capacidade de um patógeno causar doença numa determinada espécie hospedeira. Dessa forma, a patogenicidade pode ser entendida como um caráter qualitativo. Os genes de patogenicidade não devem ser essenciais para o patógeno completar seu ciclo de vida *in vitro* (Idnum & Howllett, 2001), mas necessários para a compatibilidade básica entre patógeno e hospedeiro, resultando na colonização e incitação da doença numa determinada espécie hospedeira.

A resistência a diferentes isolados do mesmo patógeno, observadas em algumas cultivares e linhagens de resistência, é provavelmente, quantitativa. Tal resistência é influenciada por fatores ambientais e pela concentração de inóculo na área de cultivo (Scott *et al.*, 2010). Nas discussões de interações patógeno-hospedeiro é comum a utilização do termo virulência. Esse termo seria um componente importante da patogenicidade e, portanto, de caráter quantitativo (Shaner *et al.*, 1992). Quando são utilizados patógenos mutantes nos hospedeiros e são observados sintomas reduzidos, é dito que a linhagem é menos virulenta, pois um gene de virulência foi afetado, mas esta linhagem continua patogênica. Essa distinção é possível quando se utilizam variáveis quantitativas, tais como quantidade e/ou tamanho das lesões, produção de esporos e dispersão (Soares, 2007).

1.3. Controle químico e produtos fitossanitários registrados no Brasil para a cultura da alface

Para doenças do sistema radicular, é importante a adoção de estratégias de manejo, pois no solo os patógenos são bem adaptados e os fungicidas têm baixa eficiência, além do potencial efeito residual ao ambiente. O controle químico se baseia no uso de moléculas orgânicas e inorgânicas, obtidas naturalmente ou sintetizadas, para a proteção das plantas contra patógenos (Michereff *et al.*, 2005). No entanto, para evitar problemas de resistência dos fungos à ação dos fungicidas, os mesmos devem ser utilizados com critérios, tais como: dosagem recomendada, frequência de aplicações adequadas, misturas e rodízio de ingrediente ativo (protetores + sistêmicos) e aplicações dos fungicidas, se possível, embasadas em sistema de previsão e estação de aviso (Bueno & Fisher, 2006).

Os fungicidas têm diferentes mecanismos de ação, sendo classificados de acordo com a natureza química de seus princípios ativos. Fungicidas com mecanismos de ação específicos devem ser utilizados de forma alternada com outros produtos inespecíficos. O uso continuado de fungicidas de mesmo mecanismo de ação no decorrer de uma mesma safra deve ser evitado, visando a reduzir o risco de ocorrência de resistência aos produtos (Zambolim *et al.*, 2007).

A aplicação de fungicidas, tanto no tratamento de sementes quanto em pulverizações foliares nos estádios iniciais do desenvolvimento das plantas ou aplicação no sulco de plantio, pode ser realizada dentro de programas de manejo integrado de doenças da alface. Alguns princípios gerais de controle dos fungicidas são: erradicante, protetor e quanto à sua mobilidade na planta podem ser imóveis, mesostêmicos e sistêmicos. Fungicidas e inseticidas de diversos grupos químicos, como dicarboximida, anilida, neocotinóides, feniluréia e benzimidazol estão entre os produtos químicos registrados para a cultura da alface no site Agrofit/MAPA (2019). Os fungicidas protetores atuam na germinação dos propágulos e tem efeito preventivo, enquanto sistêmicos e mesostêmicos atuam desde a germinação até a

esporulação do fungo e possuem ação curativa e erradicante, além da ação preventiva (Frac, 2018; Agrofit, 2019).

Fungicidas sistêmicos podem ser mais caros, menos fitotóxicos, mais específicos e exigirem um menor número de aplicações. Em contrapartida, podem ser mais caros e apresentar efeito residual longo, além do maior risco de desenvolvimento de resistência. Fungicidas não sistêmicos, em geral mais baratos, apresentam amplo mecanismo de ação, efeito residual curto e casos raros de resistência. Entretanto, estes exigem um maior número de aplicações e doses mais altas, conseqüentemente, apresentando mais problemas com fitotoxidez associado às aplicações (Brent & Whollomon, 2007).

Existe apenas um fungicida a base de tiabendazol registrado para o controle da fusariose e outro a base de pencicuirom para o controle da queima-da-saia. Não existem fungicidas registrados para o controle da murcha-de-esclerócio (*S. rolfsii*) e *damping-off* (*P. ultimum*) no Brasil (Amorim *et al.*, 2016; Agrofit, 2019). Os fungicidas aplicados diretamente ao solo acabam sendo diluídos, fazendo com que as doses que realmente alcançam o patógeno sejam baixas. Além disso, algumas características que seriam desejáveis para a maior eficácia do fungicida no controle de patógenos radiculares, como a sua persistência e distribuição no solo, são características desfavoráveis do ponto de vista ambiental (Oliver & Hewitt, 2014).

Outros fungicidas efetivos para o controle de oomicetos, como os pertencentes ao grupo das fenilamidas (metalaxil-M, metalaxil, benalaxil) e fosfanatos (Fosetil-Al), não são recomendados para fungos, por não possuírem eficácia (Leite & Lopes, 2018). Contudo, o controle químico do *damping-off* causado por *P. ultimum* não é recomendado. Além disso, estudos demonstraram que a aplicação de fungicidas causam fitotoxidez, redução de peso da parte aérea e radicular em plantas de alface (Utkhede *et al.*, 2000; Paulitz & Belanger, 2001). Vale mencionar que, em plantas de pepino, Delevati *et al.* (2017) alcançaram bons resultados com o tratamento químico de sementes com fungicidas a base de metalaxil + fludioxonil.

Para o controle do mofo-branco (*S. sclerotiorum*), estão registrados diversos fungicidas para a cultura da alface. Dentre, citam-se os ingredientes ativos: boscalida, iprodiona, procimidona e ciprodinil + fludioxonil e estão disponíveis no mercado e que podem ser utilizados de forma alternada. A eficiência do controle químico da doença pode ser influenciada pela densidade do inóculo no solo (Costa & Costa, 1998), tendo-se em conta, ainda, que a eficiência do controle químico reside, prioritariamente, em seu caráter preventivo (Ethur *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2010). Em trabalhos conduzidos com sementes de soja infectadas artificialmente e em condições controladas, o inóculo de *S. sclerotiorum* foi reduzido por alguns fungicidas, como tiofanato metílico, fludioxonil entre outros, alguns aplicados de forma isolada e outros em mistura (Ribeiro, 2010).

Gilardi *et al.* (2005) relataram bons resultados no tratamento de sementes infestadas artificialmente com *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, utilizando carbendazim e prochloraz, entre outros fungicidas. Porém, nenhum tratamento eliminou completamente o patógeno das sementes. Tiabendazol, do grupo químico dos benzimidazóis, utilizados no controle da fusariose, caracteriza-se pela alta seletividade, atuando em poucos processos do metabolismo dos fungos. O uso contínuo desses produtos na agricultura tem resultado em uma pressão de seleção na população dos fitopatógenos com subsequente surgimento de linhagens extremamente resistentes (Picinini, 1994). Entre os benzimidazóis, o primeiro composto desenvolvido foi exatamente o tiabendazol, introduzido em 1961 como um vermífugo, na medicina humana e veterinária (Davidse, 1982).

Quanto aos inseticidas, estes constituem insumos necessários ao controle de insetos-praga nas áreas de produção. Trata-se de produtos letais a insetos e ácaros, classificados em orgânicos naturais, biológicos, orgânicos sintéticos e inorgânicos; possuem diferentes modos de ação, podendo atuar no sistema nervoso, muscular e digestivo, no crescimento e na respiração celular (Irac, 2018). É importante mencionar que as pragas que acometem a cultura

da alface também são comuns em outras olerícolas, culturas perenes e anuais (Agrofit, 2019). Muitas delas induzem disfunções de caráter sistêmico como o enfezamento das plantas, onde folíolos apresentam-se enrolados ou arqueados devido à introdução de substâncias tóxicas durante a alimentação do inseto, podendo gerar o descarte do produto final (Gallo *et al.*, 2002).

Para a agricultura orgânica, a alternativa viável para o controle microbiano de pragas é o controle biológico (Morandi & Bettiol, 2009). Existem ainda, a serem considerados, os desafios e limitações relacionados ao risco do uso de produto fitossanitário na agricultura urbana, devido ao trânsito de pessoas junto às áreas de produção e a proximidade de residências, cursos d'água e áreas de recarga dos mananciais hídricos. Neste último caso, a produção é basicamente de produtos para consumo *in natura*, o que aumenta os riscos de contaminação pelo alimento (Castelo Branco *et al.*, 2007). As regulamentações são rigorosas sobre o uso de produtos fitossanitários e há pressão política para remover moléculas químicas mais perigosas do mercado. Consequentemente, esforços vêm sendo realizados para o desenvolvimento de insumos alternativos aos produtos químicos sintéticos com vistas ao controle de pragas e doenças. Entre essas alternativas estão os agentes de controle biológico (Pal & Gardener, 2006).

1.4. Controle biológico e produtos de biocontrole registrados no Brasil

O controle biológico se caracteriza pelo emprego de microrganismos de forma a limitar a ação de patógenos e/ou aumentar a resistência do hospedeiro (Morandi & Bettiol, 2009). Devido ao modelo de agricultura extensiva mundial, buscando a atender à necessidade de produção de *commodities* e alimentos para a população, o controle biológico se tornou um campo de estudos envolvendo diferentes áreas, tais como a ecologia de populações, biosistemática, comportamento, fisiologia e genética, para agregar conhecimentos e atuar não

somente no microclima que a produção se encontra, mas também no equilíbrio da microfauna do solo (Cook & Baker, 1983).

Para o controle de doenças, buscam-se por microrganismos de vida livre (saprofitos), ou colonizadores de superfícies vegetais e hiperparasitas (fungos que parasitam outros fungos) ou, ainda, colonizadores de tecidos internos das plantas (endofíticos). Agentes de biocontrole podem atuar por mecanismos de ação diretos (competição, parasitismo e antibiose), ou indiretos (promoção de crescimento e indução de resistência). Existem na literatura especializada, relatos de uma diversidade de microrganismos, principalmente fungos e bactérias, utilizados no controle de fungos fitopatogênicos (Pal & Gardener, 2006; Morandi & Bettiol, 2009).

Para avaliação da capacidade do antagonista em suprimir o patógeno, são necessários testes *in vitro* e *in vivo*, de forma a determinar os mecanismos inerentes aos agentes de biocontrole, bem como os efeitos ecológicos que interferem no controle da doença (Lumsden & Locke, 1989). As linhagens ou isolados devem ser selecionados para determinados patógenos e ambientes (Howell, 2003).

Em harmonia com estes fatos, o mercado de biodefensivos cresceu mais de 70% só no último ano. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a indústria brasileira atuante no controle biológico soma 61 fábricas produtoras destes agentes de controle biológico movimentando mais de 400 milhões de reais em 2018. Ainda, de acordo com o MAPA, calcula-se que o Brasil tenha cerca de 170 produtos biológicos registrados e a crescente demanda para estes produtos formulados vem aumentando desde 2015. As estimativas são positivas, de modo que o faturamento no setor de biológicos poderá igualar-se ao dos produtos químicos, já em 2020 (Brasil, 2019).

Entre os agentes de biocontrole, destacam-se os fungos do gênero *Trichoderma*, por sua grande diversidade e por atuarem por diferentes mecanismos de ação, seguidos pelas bactérias

que atuam contra patógenos causadores de *damping-off* e podridões de raízes (Choudhary & Johri, 2009), como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* e *P. aureofaciens*. Há inúmeros relatos na literatura de *Trichoderma* spp. antagonista a *R. solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp. (Harman, 2005), *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* e *Phytophthora palmivora*, entre outros fitopatógenos (Carvalho *et al.*, 2011). Existe também o microrganismo *Coniothyrium minitans*, que é um micoparasita aplicado contra *Sclerotinia* spp. (Moretini & Melo, 2007).

Os estudos com *Trichoderma* spp. envolvem produtos formulados e isolados de solo e/ou plantas e raízes. Baptista (2007) avaliaram a eficiência do produto Biotrich[®], formulado com *Trichoderma* sp. no controle de *P. dissotocum* em cultivares de alface cultivadas em kits hidropônicos caseiros e em condições de laboratório, verificando-se que o produto apresentou eficiência no controle do patógeno. Silva *et al.* (2015) testaram diversos isolados de *Trichoderma* para o controle de *S. sclerotiorum* na alface e 75% destes contribuíram para aumentar a sobrevivência das plântulas na presença do patógeno. Dias *et al.* (2013) avaliaram a eficiência de biopreparado a base de *Trichoderma* spp. e o isolado T-03 foi o mais eficiente no controle de *R. solani* em plantas de alface da cultivar Regina, por ter reduzido a incidência de *damping-off* de pós-emergência. Por outro lado, de acordo com esses mesmos autores, nenhum dos biopreparados apresentaram efeito antagonista satisfatório contra *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* em plantas de feijão-vagem.

Fungicidas biológicos são registrados por patógeno-alvo. Para uso contra patógenos da cultura da alface citados anteriormente, existem três fungicidas biológicos registrados no Brasil: Ecotrich[®] e Predatox[®] (*T. harzianum*) para o controle de *S. sclerotiorum* e Sonata[®] (*Bacillus pumilus*), recomendado para o controle de *Botrytis cinerea* (Agrofit, 2019).

1.5. O gênero *Trichoderma*: diversidade, importância e aplicações no biocontrole de doenças causadas por fungos de solo

Conforme comentado anteriormente, os fungos e oomicetos constituem o maior grupo de patógenos radiculares, ocorrendo em todos os tipos de sistemas agrícolas e causando doenças nas principais espécies cultivadas, com uma variada gama de sintomas. Muitos fungos habitantes do solo possuem elevada capacidade de competição saprofítica e podem contribuir para o controle biológico, com a vantagem de não serem nocivos às plantas. Este é o caso de isolados de várias espécies do gênero *Trichoderma* spp. (Harman *et al.*, 2004; Michereff *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2012).

O gênero *Trichoderma* foi descrito por Persoon há mais de 200 anos (Persoon, 1974). Isolados desse fungo podem ser facilmente identificados em nível de gênero, por algumas de suas características culturais, como crescimento rápido, micélio aéreo esparso, pústulas conidiogênicas verdes ou brancas (Ramirez, 1995) e, principalmente, por suas características morfológicas, conforme estabelecido por Rifai (1969), considerando as características microscópicas. De acordo com esse autor, o conidióforo geralmente apresenta-se ramificado em diferentes níveis, podendo, a depender da espécie, apresentar ramificações primárias, secundárias, terciárias e assim por diante. Os conidióforos podem apresentar apêndices estéreis, em algumas espécies. As células conidiogênicas (fiálides) variam de ampuliforme a lageniforme, geralmente com constrição na base e afunilamento abrupto no ápice e podem aparecer dispostas em verticilos ou penicilos terminais nas ramificações do conidióforo. Os conídios podem ser hialinos ou mais frequentemente verdes, com parede lisa, rugosa ou estriada, de acordo com a espécie. Clamidósporos normalmente estão presentes, podendo ser intercalares ou terminais (Rifai, 1969; Gams & Bissett, 2002). O gênero *Trichoderma* é considerado um fungo cosmopolita, habitante de diferentes nichos ecológicos e atualmente comporta mais de 400 espécies aceitas (Bissett *et. al.*, 2015; Mycobank, 2019).

Por serem exímios degradadores de xenobióticos, graças à produção das enzimas, além da capacidade de metabolizar uma grande diversidade de substratos, esses fungos são

facilmente cultivados em laboratório, em meios gerais e semi-seletivos. Os meios semi-seletivos são referidos como aqueles empregados para prevenir o crescimento de um grupo de organismos, enquanto permite o crescimento de outro grupo, quando presentes na mesma amostra. Devido a grande diversidade dos fungos e morfologias de colônia, meios semi-seletivo para isolamento ou plaqueamento, apresentam vantagens de uso, pela capacidade de inibir outros organismos considerados contaminantes no meio de cultura (Alfenas & Mafia, 2007).

A utilização de *Trichoderma* spp. como agentes de controle é ancorada em inúmeras estratégias de sobrevivência desenvolvidas por esses fungos, as quais os tornam altamente competitivos no ambiente. Além da competição por espaço físico, água, luz e nutrientes, fungos do gênero *Trichoderma* podem atuar contra fitopatógenos por contato físico (hiperparasitismo), ou pela síntese de compostos antimicrobianos, tais como enzimas hidrolíticas e antibióticos. O arsenal de substâncias excretadas por *Trichoderma* é amplamente conhecido podendo ser citados: gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina, dermadina, enzimas hidrolíticas extracelulares, proteases, quitinases, glucanases, peroxidases (Machado *et al.*, 2012).

Cardoza *et al.* (2005) refere-se a três componentes produzidos por diferentes espécies de *Trichoderma*, entre os quais, peptídeos (*T. harzianum* e *T. virens*), policetídeos (*T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* e *Trichoderma* spp.) e terpenos (*T. virens*, *T. lignorum*, *T. reesei*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. polysporum*, *T. harzianum* e *T. viride*). Isolados pertencentes à essas espécies tem sido relatadas como antagonistas de organismos fitopatogênicos como *Phoma* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tricitis*, *Phytophthora* sp., *Bipolaris* sp., *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Pythium* sp, *Penicillium* sp. (Keswani *et al.*, 2017).

Outro tipo de interação (indireta) pode vir como resultado da resistência induzida na planta hospedeira ou da disponibilização de nutrientes no solo (Kaewchai *et al.*, 2009). Tais características podem variar intraespecificamente. Esses mecanismos citados podem atuar de forma sinérgica, fato que aumenta a importância de *Trichoderma* nos programas de controle biológico de doenças de plantas. Entretanto, o sucesso na seleção do agente candidato depende das características inerentes ao isolado, das suas interações com o patógeno e com a espécie cultivada, da disponibilidade de matéria orgânica no solo, pH, temperatura e umidade (Benítez *et al.*, 2004; Friedl & Druzhinina, 2012b).

Nas pesquisas sobre o papel do fungo *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas cultivadas, consideram-se de suma importância avaliar a capacidade dos isolados de produzirem metabólitos primários e secundários. Metabólitos primários têm função no metabolismo energético, estrutura das hifas, na regulação do metabolismo e atuam de forma intermediária na biossíntese de compostos. Os metabólitos secundários são normalmente produzidos após a paralisação do crescimento do fungo e têm a ocorrência restrita a poucas espécies (Iwashita, 2002), variando também dentro da espécie. A produção destes não é exigida para o crescimento vegetativo em cultura pura (Mapari & Meyer, 2008).

O genoma de fungos filamentosos disponível em bancos de dados, juntamente com o avanço de novas técnicas de extração e separação de proteínas por espectrometria de massas, vem inserindo conhecimento sobre a expressão de proteínas destes fungos com relevância biotecnológica (Gómes-Mendoza *et al.* 2014). Isso contribui para uma melhor compreensão das interações entre *Trichoderma* spp. e fungos fitopatogênicos em contato com a planta hospedeira, possibilitando identificar proteínas relacionadas ao estresse, micoparasitismo e indução de defesa e resistência na planta (Pereira *et al.*, 2014; Ramada *et al.*, 2016).

1.6. *Trichoderma* na promoção de crescimento de plantas cultiváveis

A promoção e/ou indução de crescimento de plantas promovido por *Trichoderma* spp. tem sido objeto de estudos nos últimos anos em resposta à demanda por desenvolvimento de produtos de biocontrole e bioestimulantes. Promoção de crescimento de plantas é resultante da interação indireta "fungo-planta", cujo efeito é verificado na germinação de sementes, enraizamento, brotação de estacas, crescimento de ramos, incremento de área foliar, atraso da senescência e incremento no rendimento das culturas (Jardin, 2015).

Esse mecanismo pode resultar de um aumento na solubilização e disponibilização de fosfatos e outros micronutrientes e minerais, tais como ferro, manganês e magnésio, os quais possuem importante papel no desenvolvimento das plantas (Altomare *et al.*, 1999), ou da produção de reguladores de crescimento, como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (Shoresh, *et al.* 2010; Glick *et al.*, 2012; López-Bucio *et al.*, 2015; Garnica-Vergara *et al.*, 2016; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2017). Também tem sido relatada a habilidade do fungo em promover, nas plantas, resistência ao estresse abiótico (Zachow *et al.*, 2016).

Vários autores estudaram o efeito da aplicação de isolados de *Trichoderma* na cultura da alface. Diniz *et al.* (2006) encontraram efeito positivo na aplicação de *T. viride*, expresso em aumento na emergência das plântulas de alface, enquanto Bal & Altintas (2008) relataram incremento de peso fresco de mudas da cultivar Yedikule. A promoção de crescimento atribuída a isolados de diferentes espécies de *Trichoderma* também foi constatada em termos de peso de matéria seca da parte aérea em plantas de alface cultivar Regina (Silva *et al.*, 2015). Já Barroso *et al.* (2017) avaliou o efeito de quatro produtos comerciais a base de *Trichoderma* em sementes da cultivar de alface Astra e concluíram que os mesmos contribuíram para o aumento da germinação das plântulas. Fiorentino *et al.* (2018) comparou o efeito da inoculação de plantas de alface com *T. harzianum* e de *T. virens*, concluindo que o melhor efeito na promoção de crescimento ocorreu com o isolado desta última espécie.

O uso bem sucedido do agente de biocontrole requer a escolha de estratégias adequadas de integração do organismo nos diferentes agroecossistemas. Ainda, a mistura destes agentes, quando os mesmos são compatíveis, é esperada ser mais efetiva na supressão de doenças, do que formulações contendo um único organismo. Adicionalmente aos efeitos aditivos ou sinérgicos, mais de um agente aplicado ao mesmo tempo possibilita combinações de agentes com diferentes requerimentos ambientais em diferentes tempos ou fases do ciclo da cultura, concomitantemente ao início do surgimento dos distintos micronichos (Berg, 2010).

Entretanto, mesmo frente aos relatos de sucesso na aplicação dos microrganismos considerados promotores do crescimento das plantas, existem alguns relatos de insucesso na cultura aqui estudada. Amler *et al.* (2014) observaram que sementes de alface inoculadas com isolados de distintas espécies de *Trichoderma* não se beneficiaram de forma significativa, considerando as variáveis percentagem de emergência e altura das plantas, aos 28 dias pós-semeadura. Chaves (2015) avaliou o efeito da aplicação de *Trichoderma* na qualidade de mudas de alface ('Elba' e 'Solaris'), concluindo que a presença do fungo não resultou em mudas de melhor qualidade, quando comparados à testemunha.

A busca pela integração de microrganismos utilizados como agentes de biocontrole e a compreensão do manejo integrado, combinando o uso de controle biológico e químico, tem sido temas de pesquisa. Esses estudos prometem melhoria na eficiência do controle de doenças de plantas (Silva *et al.*, 1999; Ramarethinam *et al.*, 2001; Ribas, 2010; Bhai & Thomas, 2010; Khirallah *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Acredita-se que, desse modo, podem-se obter efeitos sinérgicos ou aditivos no controle de patógenos de solo causadores de doenças em plantas cultivadas (Bhale & Rajkonda, 2015; Manjunath *et al.*, 2017).

1.7. Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com fungicidas e inseticidas químicos

A consorciação de fungicidas químicos e biológicos tem sido uma alternativa para os agricultores, principalmente porque fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos como fortes supressores de fitopatógenos de solo como *Macrophomina phaseolina*, *R. solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, entre outros (Vyas, 1994; Malathi *et al.*, 2002; Bagwan *et al.*, 2010; Arunasri *et al.*, 2011; Ishizuka, 2016). Por outro lado, o uso individualmente de um produto químico ou do agente de biocontrole, pode não ser suficientemente capaz de controlar a doença (Goudar *et al.*, 1998; Bhale & Rajkonda, 2015; Kumar *et al.*, 2018). Todavia, existem estudos indicando que certos isolados de *Trichoderma* não podem ser aplicados juntamente com produtos químicos (Gampala & Rajasekhar, 2010), sob o risco de perderem a eficiência.

Formulações químicas podem afetar a germinação de conídios, o crescimento vegetativo e a esporulação de agentes microbianos de controle biológico em diferentes níveis, da mesma forma que nos fungos fitopatogênicos. Ghini & Kimati (2000) descreveram bloqueios metabólicos em fungos fitopatogênicos devido ao acúmulo de íons na superfície da membrana celular, sendo este, portanto, um dos mecanismos de ação de tais produtos químicos. Os mesmos autores também enfatizam o fato de compostos organofosforados interferirem diretamente na formação da parede celular devido à inibição da enzima que converte a fosfatidiletanolamina em quitina. De acordo com Papavizas (1985) conídios e micélio de isolados de *Trichoderma* resistentes aos princípios ativos, podem ser usados em conjunto com fungicidas para o tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo.

Isolados de *Trichoderma* tem comportamento variável em relação a fungicidas e geralmente são tolerantes a captan, iprodiona, etheridiazol, PCNB, thiram, propiconazol, carboxina, tiofanato metílico, mas não são tolerantes aos benzimidazóis, carbendazim, tebuconazol, trifloxistrobina, piraclostrobina e metconazol (Abd-el Moity *et al.*, 1982; Allen

et al., 1980; Chang *et al.*, 1986; Papavizas, 1980; Strashnow *et al.*, 1985; Cassiolato *et al.*, 1996; Pandolfo, 2007; Ribas, 2010).

Divya *et al.* (2011) demonstraram que isolados selvagens de *T. harzianum* foram insensíveis à metade da dose recomendada do princípio ativo piraclostrobina, do grupo químico estrobilurina. Estudos apontam que ação sinérgica de *T. harzianum* e boscalida para o controle de *Botrytis cinerea* levou à dissolução parcial do micélio do patógeno, o que beneficiou o antagonista na competição por espaço e nutrientes, contribuindo para a atividade antifúngica, pela ação de metabólitos voláteis (Fangsheng *et al.*, 2013).

Bhale & Rajkonda (2015) investigaram concentrações dos fungicidas mancozeb e captan quanto à compatibilidade com isolados de *Trichoderma* spp e constataram que, em baixas concentrações, esses fungicidas não afetaram o crescimento micelial do agente de biocontrole. Khirallah *et al.* (2016), sugeriu que os produtos químicos podem atuar como fungistáticos, sobre o antagonista. Esses autores avaliaram a compatibilidade de isolados de *T. harzianum* e um *T. viride* com diversos fungicidas recomendados para o controle de patógenos de sementes e doenças foliares ao longo de 30 dias.

Do mesmo modo, podem ser citados vários casos de sucesso envolvendo a compatibilidade de *Trichoderma* com inseticidas. Jebakumar *et al.* (2000) reportaram que doses entre 6-36 ppm de clorpirifós e forato, não afetaram o crescimento micelial e a esporulação de *T. harzianum*. Kumar *et al.* (2009) também observaram resultados positivos com os mesmos inseticidas, em combinação com *T. viride*. Singh *et al.* (2012) observou compatibilidade de *T. harzianum* com imidacloprido e inibição do crescimento micelial com o carbofuram. Outros princípios ativos, como tiametoxan, acetamiprido, clorantraniliprole e malationa não apresentaram toxicidade a crescimento micelial de isolados de *Trichoderma* (Saravanan *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2014; Vasundara *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2018).

O controle biológico de doenças de plantas deve ser pensado dentro do contexto de um programa de manejo de culturas, onde uma série de espécies, incluindo fitopatógenos e insetos-praga, deve ser combatida ao mesmo tempo, exigindo estudos detalhados, o que o torna bem mais complexo do que o uso do controle químico tradicional.

1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL MOITY, T. H; PAPAVIDAS, G. L; SHATLA, M. N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. *Phytopathology*, v. 72, p. 394-400, 1982.
- ADAMS, G.C. *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), a species complex of wide host range. *Advances in Plant Pathology*, London, v. 6, p. 535-552, 1988.
- ADAMS, J. P. Drug and pesticide resistance in fungi. In: HAYES, J. D.; WOLT, C. R. (eds.). *Molecular genetics of drug resistance*. Amsterdam, Hawood Academic Publishers, p. 31-79, 1997.
- AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2019. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>, Acesso em: 05 jan, 2019.
- ALLEN, R. N.; PEGG, K. G.; FORSBERG, L. I. & FIRTH, D.J. Fungicidal control in pineapple and avocado of diseases caused by *Phytophthora cinamoni*. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, v. 20, p. 119-124, 1980.
- ALFENAS, A. C; MAFIA, R. G. Métodos em fitopatologia. Ed. UFV, 384p., 2007.
- ALTOMARE, C., NOVELL, W. A., BJORKMAN, T. & HARMAN, G. E. Solubilization of phosphate and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295–22. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 2926-2933, 1999.
- AMLER, D. A.; HEINZ, E. & HARTHMANN, O. E. L. Efeito da inoculação de sementes com *Trichoderma* na emergência e no vigor de mudas de alface. *Anais da XV FETEC, Feira de Conhecimento Tecnológico e Científico*, 2014.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L. E. A. (Ed). *Manual de Fitopatologia, Volume 2, Doenças das Plantas Cultivadas, 5ª Edição*, Editora Agronômica Ceres Ltda, São Paulo, 810p, 2016.
- ARAUJO, L. Brasil é o país que mais consome agrotóxico. Edição do Brasil, 2018. Disponível em: < <http://edicaodobrasil.com.br/2018/03/15/brasil-e-o-pais-que-mais-consome-agrotoxico/>> Acesso em: 05 fev. 2019.
- ARUNASRI, P.; CHALAM, T. V.; REDDY, N. P. E.; REDDY, S. T. & REDDY, B. R. Investigations on fungicidal sensitivity of *Trichoderma* spp. and *Sclerotium rolfsii* (

- Collar rot pathogen) in *Crossandra*. *Internacional Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, v. 2, n. 2, p. 290-293, 2011.
- AYCOCK, R. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. North Caroline: Agricultural Experiment Station Tech. Bull, p.174, 1966.
- AZEVEDO FILHO, J. A. 2017. A cultura da alface, In: COLLARICCIO, A; CHAVES, A. L. R. Boletim Técnico Aspectos fitossanitários da cultura da alface, Instituto Biológico, n. 29, p. 9-14, 2017.
- BAGWAN, N. B. Evaluation of *Trichoderma* compatibility with fungicides, pesticides, organic cakes and botanicals for integrated management of soil borne diseases of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *International Journal of Plant Protection*, v. 3, n. 2, p. 206-209, 2010.
- BAL, U.; ALTINTAS, S. Effects of *Trichoderma harzianum* on lettuce in protected cultivation. *Journal Central European Agriculture*, v. 9, n. 1, p. 63-70, 2008.
- BARBOSA, R. N. T.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; SOUZA, G. R. Método para inoculação de *Sclerotium rolfsii* em tomateiro. *Revista Agro@mbiente On-line*, v.4, n.1, 2010.
- BARRIÈRE, V.; LECOMPTE, F.; NICOT, P.; MAISONNEUVE, B.; TCHAMITCHIAN, M. & LESCORURET, F. Lettuce cropping with less pesticides, A review, *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, v. 34, n. 1, p.175-198, 2014.
- BARROSO, F. M.; PEREIRA, F. T.; MUNIZ, P. H. P. C.; PEIXOTO, G. H. S. & CARVALHO, D. D. C. Promoção de crescimento de plântulas de alface pelo emprego de *Trichoderma* spp. *Anais IV Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG, Ipameri*, 2017.
- BEDENDO, I. *Damping-off*. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, cap. 42, p. 820-828, 1995.
- BEDENDO, I. P. *Damping-off*. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. & BERGAMIN FILHO, A. *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, cap. 23. p. 323-327, 2018.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C. & CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, v.7, p. 249-260. 2004.
- BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.84, p.11-18, 2009.
- BERGAMIN FILHO, A; AMORIM, L, Princípios gerais de controle, In: AMORIM, L; REZENDE, J, A, M; BERGAMIN FILHO, A, *Manual de Fitopatologia*, vol, 1, princípios e conceitos 5ª ed, cap, 14, pág 215-220, Ouro Fino - MG, Agronômicas Ceres, v 1, p. 573, 2018.
- BHAI, R. S.; THOMAS, J. Compatibility of *Trichoderma harzianum* (Rifai.) with fungicides, insecticides and fertilizers. *Indian Phytopathology*, v. 63, n. 2, p. 145-148, 2010.

- BHERING, M. C.; DIAS, D. C. F. S.; GOMES, J. M. & BARROS, D. I. Métodos para avaliação do vigor de sementes de pepino. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 22, n. 2, p. 171-175, 2000.
- BISSETT, J.; GAMS, W.; JAKLITSCH, W. & SAMUELS, G. J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *Internacional Mycological Associated*, n. 2, vol. 6, p. 263-295, 2015.
- BHALE, U. N.; RAJKONDA, J. N.; Compatibility of fungicides and antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against plant pathogens. *Bioscience Methods*. v. 6, n. 3, p. 1-9, 2015.
- BLANCARD, D.; LOT, H.; MAISONNEUVE, B. *Maladies des salades: identifier, connaître et maîtriser*. INRA, 2003.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. & NELSON, B. D. Pathogen profile: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, v. 7, p. 1-6, 2006.
- BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Regras para análise de sementes, Brasília: MAPA/ACS, 399p, 2009.
- BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>> Acesso: 10 abr. 2019.
- BRENT, K.; WHOLLOMON, D. W. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? *Fungicide Resistance Action Committee (FRAC)*, 2nd ed., n. 1, 60p., 2007.
- BUENO, C. J.; FISCHER, I. H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. *Pesquisa e Tecnologia*, v. 3, n. 2, 2006.
- CABRAL, C. S.; BRUNELI, K. R.; CARVALHO, M. R. M.; SANTOS JUNIOR, W. N. & REIS, A. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em alface no Brasil, *Tropical Plant Pathology*, v. 34, p. 174, 2009.
- CABRAL, C. S.; REIS, A. Screening of lettuce accessions for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1. *Tropical Plant Pathology*, v. 38, n.4, p. 275-281, 2013.
- CABRAL, C. S. Análise genética da resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em alface: aplicação de marcadores do tipo RGA e de SNPs derivados de genotyping-by-sequencing. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, 182p., 2016.
- CANTLIFFE, D. J.; PERKINS-VEAZIE, P. Need for high quality seed for effective priming to overcome thermodormancy in lettuce. *Journal American Horticultural Science*, v. 109, n. 3, p. 368-372, 1984.
- CARDOZA, R. E.; HERMOSA, M. R.; VIZCAÍNO, J. A.; SANZ, L.; MONTE, E. & GUTIÉRREZ, S. Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. *Microorganisms for Industrial Enzymes and Biocontrol*. v.1, p. 22, 2005.
- CARRIS, L. M.; LITTLE, C. R. & STILES, C. M. *Introduction to Fungi, The Plant Health Instructor*, 2012, Disponível em:

<<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/introfungi.aspx>>,
Acesso em: 14 dez, 2018.

- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M. & GERALDINE, A.M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 46, p. 822-828, 2011.
- CASSIOLATO, A.M .R.; BACKER, R. & MELO, I. S. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* por mutantes de *Trichoderma harzianum* em sementes de aipo. Fitopatologia Brasileira, v. 21, p. 120-122, 1996.
- CASTELO BRANCO, M.; ALCÂNTARA, F. A. & MELO, P. E. O projeto horta urbana de Santo Antônio do Descoberto. Embrapa Hortaliças, v. 1, 160p. 2007.
- CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. & PERES, L. E. P. Manual de Fisiologia Vegetal: teoria e prática. Piracicaba: Editora Agronomica Ceres, 650p. 2005.
- CAVERO, P. A. S.; HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; COELHO NETO, R. A. & SOUZA, J. T. Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*, Ciência Rural, v. 45, n. 6, p. 951-957, 2015.
- CHANG, Y. C.; CHANG, Y. C.; BAKER, R.; KLEIFELD, O. & CHET, I. Increased growth of plants in presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease, v. 70, p. 145-148, 1986.
- CHAVES, P. P. N. Qualidade de mudas de alface inoculadas com *Trichoderma* e reação de plantas adultas de alface a nematoides de galhas na presença de *Trichoderma*. (Dissertação) Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 144p. 2015.
- CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiological Research, v. 164, n. 5, p. 493-513, 2009.
- COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R.; EIRAS, M.; CHAGAS, C. M. & ROGERRO, P. Detection of *Varicosavirus* and *Ophiovirus* in lettuce associated with big-vein symptoms in Brazil, Fitopatologia Brasileira, v. 30, n.4, p. 416-419, 2005.
- COLEY-SMITH, J. R.; RIDOUT, C. J.; MITCHELL, C. M. & LYNCH, J. M. Control of bottom rot disease of lettuce (*Rhizoctonia solani*) using preparations of *Trichoderma viride*, *T. harzianum* or tolclofos-methyl, Plant Pathology, v. 40, p. 359-366, 1991.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F.; The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: American Phytopathological Society, 539p, 1983.
- CZAJKOWSKI, R.; Bacteriophages of soft rot *Enterobacteriaceae* – A minireview, Microbiology Letters, v. 363, n. 2, p. 1-6, 2016.
- DAVIS, R. M. (Ed.); SUBBARAO, K. V.; RAID, R. N. & KURTZ, E. A. Compendium of lettuce diseases, St. Paul: The American Phytopathological Society, 79p. 1997.
- DAVIS, J. M. L.; GLADDERS, P.; YOUNG, C.; DYERA, C.; HIRON, L.; LOCKE, T.; LOCKLEY, D.; OTTWAY, C.; SMITH, J.; THORPE, G. & WATLING, M. Petal culturing to forecast *Sclerotinia* stem rot in winter oilseed rape; 1993-1998. Aspects of Applied Biology, v. 56, n. 2, p. 129-134. 1999.

- DAVIDSE, L. C. Benzimidazole compounds: selectivity and resistance. *In*: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G., eds. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p. 60-70, 1982.
- DELEVATI, H. F.; ZAMPOLI, J.; FREDDO, A. R. Controle químico e biológico de tombamento de plântulas de pepino causado por *Pythium* sp. *Biology & Health Journal*, v. 9, n. 1, 2017.
- DIAS, P. P.; BERBARA, R. L. L. & FERNANDES, M. C. A. Controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* por biopreparados de isolados de *Trichoderma* spp. *Summa Phytopathologica*, v. 39, n. 4, p. 258-262, 2013.
- DINIZ, K. A.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; CARVALHO, M. L. M. & MACHADO, J. C. Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica de peliculização. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 28, n. 3, p. 37-43, 2006.
- ELAD, Y.; CHET, I. & HENIS, Y.; Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*, *Canadian Journal Microbiology*, v. 28, p. 719-725, 1982.
- ESPOSITO, E. & SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Critic Rev Microbiol*, v. 24, p. 89-98, 1998.
- ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z. & SILVA, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. *Ciência Rural*, v. 31 n. 5, 2001.
- FAOSTRAT, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Food and agriculture data, Crops: Lettuce and Chicory, Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acesso em: 10 set, 2018.
- FALTIN, F.; LOTTMANN, J.; GROSCH, R. & BERG, G. Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50, p. 811-820, 2004.
- FANGSHENG, N.; ZHIGIANG, M. & QIUYAN, B. The synergism of *Trichoderma harzianum* interaction with Boscalid to Botritis cinerea. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, v. 12, p. 201-205, 2013.
- FERRAZ, L. C. L.; CAFÉ FILHO, A. C.; NASSER, L. C. B. & AZEVEDO, J. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, v. 48, p. 77-82, 1999.
- FIORENTINO, N.; VENTORINO, V.; WOO, S. L.; PEPE, O.; DE ROSA, A.; GIOIA, L.; ROMANO, I.; LOMBARDI, N.; NAPOLITANO, M.; COLLA, G. & ROUPHAEL, Y. *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. 743, 1-15, 2018.
- FRAC. Comitê de ação à resistência a fungicidas, Brasil. Folder modo de ação: fungicidas. Disponível em:<<http://andef.rds.land/modos-de-acao-fungicidas>> Acesso em 20 dez. 2018.

- FRANZIN, S.M.; MENEZES, N.L.; GARCIA, D.C. & SANTOS, O.S. Efeito da qualidade das sementes sobre a formação de mudas de alface. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.2, p.193-197, 2005.
- FRIEDL, M. A.; DRUZHININA, I. S.; *In situ* DNA barcoding of *Trichoderma* in soil reveals a narrow community of opportunistic species, *STAPFIA*, v. 96, p. 179-193, 2012a.
- FRIEDL, M. A, DRUZHININA I. S. Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*, v. 158, n. 1, p. 69-83, 2012b.
- FUJINAGA, M.; OGOSH, H.; TUCHIYA, N.; SAITO, H.; YAMANAKA, S.; NOZNE, M. & KOJIMA, M. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. *Journal of General Plant Pathology*, v. 69, p. 23-28, 2003.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S. & OMOTO, C. *Entomologia agrícola*. FEALQ, v. 10, 2002.
- GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, P. HARMAN, G. E. (Eds.) *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis, v. 1, p. 3-31, 2002.
- GAMPALA, K.; PINNAMANENI, R. Studies on the compatibility of *Trichoderma viride* with certain Agro-chemicals, *Current World Environment*, v. 5, n.1, p. 155-158, 2010.
- GARNICA-VERGARA, A.; BARRERA-ORTIZ, S.; MUÑOZ-PARRA, E.; RAYA-GONZÁLEZ, J.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; RUIZ-HERRERA, L. F. & LÓPEZ-BUCIO, J. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. *New Phytologist*, v. 209, n.4, p. 1496-1512. 2016.
- GILARDI, G.; TINIVELLA, F. & GULLINO, M.L. Seed dressing to control *Fusarium oxysporum*. f. sp. *lactucae*. *Journal Plant Disease Protection*, v. 112, p. 240 -246, 2005.
- GLICK, B.R.; *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica, Article ID 963401, 15p., 2012.
- GOLDBERG, N. P.; STANGHELLINI, M. E. Ingestion-egestion and aerial transmission of *Pythium aphanidermatum* by shore flies (Ephydrinae: *Scatella stagnalis*). *Phytopathology*, v. 90, n. 11, p. 1244-1246, 1990.
- GOMES, E. V.; NASCIMENTO, L. B.; FREITAS, M. A.; NASSER, L. C. B. & PETROFEZA, S. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 159, n. 2, p. 94-99, 2011.
- GÓMES-MENDOZA, D. P.; JUNQUEIRA, M.; DO VALE, L. H. F.; DOMONT, G. B.; FERREIRA-FILHO, E. X.; DE SOUZA, M. V. & RICART, C. A. O. Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. *Journal of Proteome Reseach*, v. 13, p. 1810-1822, 2014.

- GORGEN, C. A. Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* '1306'. (Dissertação). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 78p., 2009.
- GOULART, A. C. P. Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle. 2ª ed. Revista e ampliada, 71p., 2018.
- GOWDAR, S. B.; KULKARNI, S. Compatibility effect of antagonista and seed dressers against *Fusarium udum*, the causal agent of pigeon pea wilt. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, v. 12, p. 1-4, 1998.
- GRAVEL, V.; H. ANTOUN & R. J. TWEDDELL. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of Indole Acetic Acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry., v. 39, n. 8, p. 1968-1977, 2007.
- GROSCH, R.; SCHNEIDER, J. H. M. & KOFOET, A. Characterisation of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups causing bottom rot in field-grown lettuce in Germany. European Journal of Plant Pathology, v. 110, p. 53-62, 2004.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I. & LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology, v. 2, p. 43-56. 2004.
- HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD-FILHO, D. S. & PANOBIANCO, M. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 47, n. 6, p. 763-768, 2012.
- HOMECHIN, M. Tentativa de estabelecimento do fungo *Trichoderma* sp., para verificação do seu potencial antagonístico, sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*: resultado de pesquisa. Londrina: Embrapa Soja, 217 p., 1982.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease, v. 87, p. 4-10, 2003.
- IDNURM, A.; HOWLLETT, B. J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. Molecular Plant Pathology, v. 2, p. 241-255, 2001.
- IRAC. Comitê de ação à resistência a inseticidas, Brasil. Classificação de modo de ação de inseticidas: a chave para o manejo da resistência a inseticidas. Disponível em:< http://docs.wixstatic.com/ugd/2bed6c_202e105dd1c84254962c313dabe33cf7.pdf> Acesso em: 20 dez. 2018.
- ISHIZUKA, M. S. Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico de sementes de feijão para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. (Dissertação) Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 97p., 2016.
- IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 94 (6), p. 530-535, 2002.
- JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. Scientia Horticulturae, v. 196, p. 3-14, 2015.

- JEBAKUMAR, R. S.; ANANDARAJ, M.; SARMA, Y. R. Compatibility of phorate and chlorpyrifos with *Trichoderma harzianum* (Rifai) applied for integrated disease management in black pepper. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, v. 9, n. 2, p. 111-115, 2000.
- KAEWCHAI, S.; SOYTONG, K. & HYDE, K. D. Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Diversity. Reviews, Critiques and New Ideas*. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/19c6/a08118eb90eff7aa904e0eb36c8e5a542191.pdf?_ga=2.32652475.422760999.1557183224-1690914494.1548026546> Acesso: 20 abr. 2019.
- KESWANI, C.; BISEN, K.; CHITARA, M. K.; SARMA, B. K. & SINGH, H. B. Exploring the role of secondary metabolites of *Trichoderma* in tripartite interaction with plant and pathogens. *In: SINGH, J. S; SENEVIRATNE, G. (Eds.) Agro-Environmental sustainability*, vol. 1, Managing crop health, 1^a ed, cap 4, p. 63-79. Springer Internacional Publisher, v. 1, p. 332, 2017.
- KHIRALLAH, W.; MOUDEN, N.; SELMAOUI, K.; ACHBANI, EL H.; BENKIRANE, R.; TOUHANI, A. O. & DOUIRA, A. Compatibility of *Trichoderma* spp, with some fungicides under *in vitro* conditions. *International Journal of Recent Scientific Research*, v.7, p. 9060-9067, 2016.
- KULLNIG, C. M.; SZAKACS, G. & KUBICEK, C.P. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*, v. 104, n. 9, p. 1117-25, 2000.
- KULLNIG-GRANDINGER, C. M.; SZAKACS, G. & KUBICEK, C. P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*, v. 106, p. 757- 767, 2002.
- KUMAR, M.; SHARMA, D. K.; SHARMA, A. K. & SHARMA, P. K. Compatibility of biocontrol agent *Trichoderma viride* with some pesticides. *Journal of Plant Development Sciences*, v. 1, n. 1/2, p. 2122, 2009.
- KUMAR, K.; AMARESAN, N.; BHAGAT, S.; MADHURI, K. & SRIVASTAVA, R. C. Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens, *Indian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 137-144, 2012.
- KUMAR, G.; MAHARSHI, A.; PATEL, J.; MUKHERJEE, A.; SINGH, H. B. & SARMA, K; *Trichoderma*: A potential fungal antagonist to control plant diseases, SATSA Mukhapatra – Annual Technical, Issue 21, 2017.
- KUMAR, R; SINGH, S. K; YADAV, S; KUMAR, R; CHOUBEY, A. K & KUMARI, A. Compatibility of *Trichoderma viride* with diferente fungicide and organic cake. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 7, n. 2, p. 2398-2401, 2018.
- LEBEDA, A.; KŘÍSTKOVÁ, E.; KITNER, M.; MIESLEROVÁ, B.; JEMELKOVÁ, M. & PINK, D. A. Wild *Lactuca* species, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding, *European Journal of Plant Pathology*, v. 138, p. 597- 640, 2014.

- LEITE, I. C. H. L.; LOPES, U. P. Controle químico de patógenos radiculares. In. LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. (Eds). Editora Universitária da UFRPE, Cap. 11, p. 179-192, 2018.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. & BULLOCK, S. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, 1ª ed, 387p. 2006.
- LEWIS, J. A.; LUMSDEN, R. D. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. Crop Protection, v. 20, p. 49-56, 2001
- LIM, S.; ZHAO, F.; YOO, R. H.; IGORI, D.; LEE, S. H.; LIM, H. S. & MOON, J. S. Characteristics of a *Lettuce mosaic virus* infecting lettuce in Korea. Plant Pathology Journal, v. 30, n. 2, p. 183-187, 2014.
- LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. & SANTOS, J. W. Fungos causadores de tombamento transportados e transmitidos pela semente da mamoneira. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 32, n. 9, p. 915-918, 1997.
- LOPES, C. A.; QUEZADO DUVAL, A. M. & REIS, A. Doenças da alface. Embrapa, Brasília, 2010, 68p. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/hortalicas/busca-de-publicacoes/-/publicacao/866064/doencas-da-alface>> Acesso em: 10 out, 2018.
- LORITO, M.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; TRONSNO, A.; WOO, S. L. & DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitinase, Phytopathology, v. 83, p. 302-307, 1993.
- LÓPEZ-BUCIO, J.; FLORES, R. P. & ESTRELLA, A. H.; *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. Scientia Horticulturae, v. 196. p. 109-123, 2015.
- MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. & ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o biocontrole. Revista de Ciências Agrárias, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; PADMANABAN, P.; MOHANRAJ, D. & SUNDER, A. R. Compatibility of biocontrol agents with fungicides against red rot disease of sugarcane. Society for Sugar Research & Promotion, v. 4, Issue 3-4, p. 131-136, 2002.
- MANJUNATH, M.; SINGH, A.; TRIPATHI, A. N.; PRASANNA, R.; RAI, A. B. & SINGH, B. Bioprospecting the fungicides compatible *Trichoderma asperellum* isolate effective against multiple plant pathogens in vitro. Journal of Environmental Biology, v. 38, p. 553-560, 2017.
- MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium. Biotechnology Letters, v. 30, p. 2183-2190, 2008.
- MARTIN, F. N.; LOPER, J. E. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* sp.: ecology, epidemiology and prospects for biological control. Critical Reviews in Plant Sciences, v. 18, n. 2, p. 111-181, 1999.

- MARTINS, M. V. V.; SILVEIRA, S. F.; CARVALHO, A. J. C. & SOUZA, E. F. Erradicação de esclerócios de *Sclerotium rolfii* em substrato tratados em coletores solares, em Campos dos Goytacazes – RJ. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 25, n. 3, p. 421-424, 2003.
- MATHERON, M. E. Biology and Management of Fusarium Wilt of Lettuce. 2015. Disponível em: <https://desertagsolutions.org/sites/desertagsolutions.org/files/Fusarium%20wilt%20of%20lettuce%20-%20Coop%20Extension%20pub_MM.pdf> Acesso: 17 abr. 2019.
- MELZER, M. S.; SMITH, E. A. & BOLAND, G. J. Index of plant hosts of *Sclerotinia minor*. Canadian Journal Plant Pathology, v. 19, n. 3, p. 272-280, 1997.
- MENDOZA-MENDOZA, A.; NOGUEIRA-LÓPEZ, G.; ARIZMENDI, F. P.; CRIPPS-GUAZZONE, N.; NIETO-JACOBO, M. F.; LAWRY, R.; KANDULA, D.; SALAZAR-BADILLO, F. B.; SALAS-MUÑOZ, S.; MAURICIO-CASTILLO, J. A.; HILL, R.; STEWART, A. & STEYAERT, J. Mechanisms of growth promotion by members of the rhizosphere fungal genus *Trichoderma*. In: SINGH, H. B.; KESWANI, C.; SARMA, B. K. Advances in PGPR Research. Boston, Massachusetts, CAB Internacional, cap 1, p. 1-16, 2017.
- MENEZES, N. L.; SANTOS, O. S.; NUNES, E. P. & SCHMIDT, D. Physiological quality of lettuce seeds under different temperatures, in presence and absence of light, Ciência Rural, v. 30, n. 6, p.941-945, 2000.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T. & MENEZES, M. (Eds.) Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Imprensa Universitária da UFRPE, 398p. 2005.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil: marcos históricos do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Ed(s). Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, p. 08-14, 2009.
- MORETINI, A.; MELO, I. S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 42, n. 2, p. 155-161, 2007.
- MYCOBANK. Mycobank Database: Fungal Databases, Nomenclatures & Species Banks. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=39566&Fields=All>>. Acesso em: 17 abr. de 2019.
- NZUNGIZE, J. R.; LYUMUGABE, F.; BUSOGORO, J. P. & BAUDOIN, J. P. *Pythium* root rot of common bean: biology and control methods. A review. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, v. 16, n. 3, p. 405-413, 2012.
- OLIVER, R. P.; HEWITT, H. G. Fungicides in crop protection. 2 ed. CAB international, 200p. 2014.
- OLIVEIRA, M. D. L. S.; FIGUEIREDO, E. L.; LOURENÇO, L. D. F. H. & LOURENÇO, V. V. Análise microbiológica de alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate (*Solanum*

- lycopersicum* L.), comercializados em feiras-livres da cidade de Belém, Pará, Higiene alimentar, v. 20, p. 96-100, 2006.
- OWEN-GOING, N.; SUTTON, J. C. & GRODZINSKI, B. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant units. Canadian Journal of Plant Pathology, v. 25, n. 2, p. 155-167, 2003.
- PACHECO, K. R.; VISCARDI, B. S. M.; VASCONSELOS, T. M.; MOREIRA, G. A. M.; VALE, H. M. M. & BLUM, L. E. B. Eficácia de *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* e *T. reesei* contra *Sclerotium rolfsii*. Bioscience Journal, Uberlândia, v. 32, n. 2, p. 412-421, 2016.
- PACIFICO, M. G. Levantamento de doenças da alface americana em municípios do sul do estado de Minas Gerais. (Dissertação) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 64p. 2017.
- PAL, K. K.; GARDENER, B. M. Biological control of plant pathogens. The plant health Instructor. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/57c8/b8182119510f548c56be5f0496ac1924c484.pdf>> Acesso em: 20 abr. 2019.
- PANDOLFO, J. D. Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. (Dissertação) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 78p., 2007.
- PAPAVIZAS, G. C. Induced tolerance of *Trichoderma harzianum* to fungicides. Phytopathology, v. 70, p. 691-692, 1980.
- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, v. 23, p. 23-54. 1985.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. & GARIBALDI, A. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. Plant Disease, v. 89, p. 237-240, 2005.
- PATEKOSKI, K. S.; ZOTTARELLI, C. L. A. P. Patogenicidade *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.). Hoehmea, v. 36, n. 1, p. 161-172, 2009.
- PAULITZ, T. C. Biological controlo f root rot pathogens in soilless and hydroponic system. HortScience, v. 32, n. 2, p. 193-196, 1997.
- PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R. R. Biologicaal control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology, v. 39, p. 103-133, 2001.
- PAVAN, M. A.; KUROZAWA, C. Doenças da alface (*Lactuca sativa*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. & REZENDE, J. A. M. (Eds.) Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Ed. Agronômica Ceres, v. 2, Cap. 4, p. 18-25, 1997.
- PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. KUROZAWA, C. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 589-596, 2005.

- PEREIRA, J. L.; QUEIROZ, R. M. L.; CHARNEAU, S. O.; FELIX, C. R.; RICART, C. A. O.; SILVA, F. L.; STEINDORFF, A. S.; ULHOA, C. J. & NORONHA, E. F. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. PLoS ONE, v. 9, e98234, 2014.
- PEREIRA, R. B.; SILVA, P. P.; NASCIMENTO, W. M. & PINHEIRO, J. B. Tratamento de sementes de hortaliças. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Circular Técnica, v. 140, 2015.
- PERSOON, C. H. Dispositio methodica fungorum in classes, ordines, familias et genera. In: Neues Magazin fur Botanik (Romer J. J., ed.). Ziegler und Sohne, Zurich, p. 63-128, 1974. (in German).
- PICININI, E. C. Fungicidas benzimidazóis. Revisão Anual de Patologia Vegetal, v. 2, p. 357-409, 1994.
- PINTO, Z. V.; SOUSA, A. L. O. P.; SILVA, C. P.; DUARTE, D. G.; PATRICIO, F. R. A.; SANTOS, A. S. & TEIXEIRA-YAÑEZ, L. D. T. Reação de cultivares à podridão de raízes, causada por *Pythium helicoides*, em sistemas hidropônicos. Summa Phytopathologica, v. 31, 96p. 2005.
- PINTO, Z. V.; CIPRIANO, M. A. P.; GALVÃO, J. A. H.; BETTIOL, W.; PATRICIO, F. R. A. & SANTOS, A. S. Podridão de raízes causada por *Pythium aphanidermatum*, em cultivares de alface produzidas em sistema hidropônico. Summa Phytopathology, v. 37, n. 4, p. 180-186, 2011.
- PINTORE, I.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. & GARIBALDI, A. Analysis of vegetative compatibility groups of italian and dutch isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, Journal of Plant Pathology, v. 99, n. 2, p. 517-521, 2017.
- PLAATS-NITERINK, A. J. VAN DER.; Monograph of the genus *Pythium*. Study in Mycology, v. 21, n. 1, 1-242, 1981.
- PUNJA, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Review of Phytopathology, v.23, p. 97-127, 1985.
- QIU, P.; NGUYEN, V.; GUAN, G.; LI, Y.; TAKAMATSU, S. & LIU, S. Occurrence of powdery mildew caused by *Golovinomyces orontii* on *Lactuca sativa* var, ramosa (lettuce) in China, Crop Protection, v. 110, p. 108-111, 2018.
- RAMADA, M. H.; STEINDORFF, A. S.; BLOCH, C. JR. & ULHOA, C. J. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in diferente media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. Proteomics, v. 16 (3), p. 477-490. 2016.
- RAMARETHINAM, S.; MURUGESAN, N. V. & MARIMUTHU, S. Compatibility studies of fungicides with *Trichoderma viride* used in the commercial formulation – Bio-cure-F. Pestology, v. 25, n. 5, p. 2-6, 2001.
- RAMIREZ, I. S. *Trichoderma harzianum* (Cepa A34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomati y del pimiento. (CIDINISAV, Boletín técnico, v. 4, 36p., 1995.

- REIS, A.; COSTA, H. & LOPES, C. A. Epidemiologia e manejo do mofo-branco em hortaliças. Empresa Brasileira de Agropecuária, Comunicado Técnico, v. 45, 2007.
- RIBAS, P. P. Compatibilidade de *Trichoderma* spp. a princípios ativos de fungicidas comerciais aplicados na cultura do feijão. (Dissertação) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 104p., 2010.
- RIBEIRO, S. G. S. P. Tratamento de sementes de soja para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. (Monografia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 28p. 2010.
- RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*, Mycological Papers, v. 116, p. 47-56, 1969.
- ROSS, S. 4 Countries that produce the most food. Investopedia, 2018. Disponível em: <<https://www.investopedia.com/articles/investing/100615/4-countries-produce-most-food.asp>> Acesso em: 05 fev. 2019.
- RYDER, E. J. *Lettuce, Endive and Chicory*: crop production science in Horticulture, 9. 1 ed. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Salinas, California. CABI Publishing, New York, p. 224, 1999.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira, Horticultura Brasileira, v. 30, p. 187-194, 2012.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P. Melhoramento de alface, *In*: NICK, C.; BÓREM, A. Melhoramento de Hortaliças, (Eds.) UFV, Viçosa, MG, 464p., 2016.
- SAMUELS, G.; *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.
- SARAVANAN, L.; KALIDAS, P.; PHANIKUMAR, T.; DEEPHI, P. & BABU, K. R. *In vitro* compatibility of *Trichoderma viride* with Agrochemicals. Annual Plant Protection Science, v. 22, n. 1, p. 190-239, 2013.
- SAXENA, D.; TEWARI, A. K. & RAI, D. The *in vitro* effect of some commonly used fungicides, insecticides and herbicides for their compatibility with *Trichoderma harzianum* PBT23. World Applied Sciences Journal, v. 31, n. 4, p. 444-448, 2014.
- SCOTT, J. C.; KIRKPATRICK, S. C. & GORDON, T. R.; Variation in susceptibility of lettuce cultivars to *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Plant Pathology, v. 59, p. 139-146, 2010.
- SEXTON, A. C.; HOWLETT, B. J. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. Current Genetics, New York, v. 46, n. 6, p. 357- 365, 2004.
- SHANER, G.; STROMBERG, E. L.; LACY, G. H.; BARKER, K. R. & PIRONE, T. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. Annual Review Phytopathology, v. 30, p. 47-66, 1992.
- SHORESH, M.; HARMAN, G. E. & MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual Review of Phytopathology, v. 48, p. 21-43, 2010.

- SILVA, A. C. F.; ROSA, C. R. E. & MELO, I. S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. *Ciência Rural*, v. 29, n. 3, p. 395-399, 1999.
- SILVA, V. D.; BEZERRA NETO, F.; NEGREIROS, M. D. & PEDROSA, J. F. Comportamento de cultivares de alface em diferentes espaçamentos sob temperatura e luminosidade elevadas, *Horticultura Brasileira*, v. 18, p.183-187, 2000.
- SILVA, M. S. C.; LIMA NETO, V. C. Doenças em cultivos hidropônicos de alface na região metropolitana de Curitiba/PR. *Scientia Agraria*, v. 8, n. 3, p. 275-283, 2007.
- SILVA, V. N.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M. & HAKAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 46, n. 12, p. 1609-1618, 2011.
- SILVA, G. B. P.; HECKLER, L. I.; SANTOS, R. F.; DURIGON, M. R. & BLUME, E. Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 28, n. 4, p. 33-42, 2015.
- SILVA, M. A. F.; MOURA, K. E.; MOURA, K. E.; SALOMÃO, D. & PATRICIO, F. R. A. Compatibility of *Trichoderma* isolates with pesticides used in lettuce crop. *Summa Phytopathologica*, v. 44, n. 2, p. 137-142, 2018.
- SINGH, V. P.; SRIVASTAVA, S.; SHRIVASTAVA, S. K. & SINGH, H. B. Compatibility of different insecticide with *Trichoderma harzianum* under in vitro condition. *Plant Pathology Journal*, v. 11, n. 2, p. 73-76, 2012.
- SMOLINSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* – a review, *Journal of Plant Pathology*, v. 100, n. 100, p. 1-12, 2018.
- SOARES, M. A. Genes determinantes de patogenicidade e virulência e análise parcial do genoma mitocondrial de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro comum. (Tese) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 210p. 2007.
- STANGHELLINI, M. E.; RASMUSSEN, S. L. Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease*, v. 78, n. 12, p. 1129-1137, 1994.
- STRASHNOW, Y.; ELAD, Y.; SIVAN, A. & CHET, I. Integrated control of *Rhizoctonia* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology*, v. 34, p. 146-151, 1985.
- SUTTON, J. C.; SOPHER, C. R.; OWEN-GOING, T. N.; LIU, W.; GRODZINSKI, B.; HALL, J. C. & BENCHIMOL, R. L. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hidroponic crops: Current knowledge and perspective. *Summa Phytopathologica*, v. 32, n. 4, p. 307-321, 2006.
- TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. & NOGUEIRA, E. M. C. Fusariose da alface: agente causal, sintomas e manejo. 2012. Disponível:< http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=168>. Acesso em: 16 abr. 2019.
- TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Doenças causadas por fungos. *In: COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R. (Eds.) Aspectos fitossanitários da cultura da alface. Boletim Técnico, Instituto Biológico, São Paulo – SP, n. 29, 126p., 2017.*

- TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A. & MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotricum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. *Summa Phytopathologica*, v. 30, n. 1, p. 73-73, 2004.
- UTKHEDE, R. S.; LÉVESQUE, C. A.; DINH, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically-grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 22, n. 2, p. 138-144, 2000.
- UZUHASHI, S.; TOJO, M.; KAKISHIMA, M. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience*, v. 51, n. 5, p. 337-365, 2010.
- VALADARES-INGLIS, M. C.; MELLO, S. C. M.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; MACÊDO, K. B. & INGLIS, P. W. Identificação de espécies de *Trichoderma* isoladas de solos cultivados com alho e cebola e a descrição de duas novas espécies, *Revista RG News* v. 4, n. 3, 2018, Edição especial Anais V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, ISSN 2526-8074, Disponível em: <<http://www.recursosgeneticos.org/revista-atual>> Acesso em 08 jan, 2019.
- VASUNDARA, P.; RANGASWAMY, V. & JOHNSON, M. Compatibility studies with fungicides, insecticides and their combinations on *Trichoderma viridae* *in vitro* conditions. *Internacional Journal of Scientific & Engineering Research*, v. 6, n. 2, p. 310-316, 2015.
- VENTURA, J. A.; COSTA, H. *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* on lettuce in Espírito Santo, Brazil. *Plant Disease*, v. 92, n. 6, p. 976, 2008.
- VENTURA, J. A.; COSTA, H. & LIMA, I. M. Doenças da batata-baroa e estratégias de manejo. In: BALBINO, J. M. de S. (Org.). *Cultura da batata-baroa (mandioquinha-salsa): práticas da produção à pós-colheita*. Incaper, cap 6, p. 86-102, 2018.
- VYAS, S. C. Integrated biological and chemical control of dry root rot on soybean. *Indian Journal Mycology and Plant Pathology*, v. 24, n. 2, p. 132-134, 1994.
- ZACHOW, C.; BERG, C.; MULLER, H.; MONK, J. & BERG, G. Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. *Journal of Biotechnology*, v. 235, p. 162-170, 2016.
- YAÑEZ, L. D. T. Identificação, patogenicidade e sensibilidade a produtos químicos *in vitro* de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.). (Dissertação), Escola Superior "Luís de Queiroz", Piracicaba, 74p. 2000.
- ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S. & OLIVEIRA, S. H. F. Manejo da resistência de fungos a fungicidas. Viçosa, MG: UFV, DFP, 168p., 2007.

CAPÍTULO 2

Patogenicidade e influência na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) induzidas por fungos de solo

RESUMO

A viabilidade de um lote de sementes é expressa em termos de porcentagem de sementes fisiologicamente capazes de germinar. A infestação e/ou infecção de sementes por fungos e oomicetos pode influenciar na germinação e afetar os tecidos presentes e/ou oriundos da germinação. Esses patógenos de semente podem causar tombamento, murchas vasculares e podridões em plântulas. O objetivo deste estudo foi avaliar o índice germinativo de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), bem como a patogenicidade e a influência de isolados dos fungos fitopatogênicos: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium ultimum* e *Sclerotium rolfsii*, na germinação das sementes. Os métodos de germinação testados foram: ágar-água, papel filtro e em papel Germitest. Para avaliar a patogenicidade dos fungos às sementes, um disco de micélio de 5 mmø foi depositado no centro da placa e 10 sementes foram dispostas ao redor. Das 16 cultivares utilizadas, apenas 'Mauren', 'Vitória de Santo Antão', 'BRS Lélia', 'BRS Leila', 'Gizele' e 'BRS Mediterrânea' apresentaram poder germinativo acima de 50% nos métodos testados. Nos ensaios de patogenicidade *in vitro*, todos os isolados testados foram patogênicos a cultura da alface. A maior incidência foi verificada com *S. rolfsii*, o qual inibiu a germinação de 100% das sementes em todas as cultivares. Os isolados de *F. oxysporum* raça 1 foram os de menor incidência. As cultivares Mauren e Vitória de Santo Antão foram, ainda, bastante afetadas pela inoculação artificial com *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *P. ultimum*, com valores de 66 e 100% de incidência. A cultivar BRS Leila apresentou os maiores índices de germinação, com todos os patógenos testados.

Palavras-chave: inoculação, lotes de sementes, patógenos de solo, suscetibilidade de cultivares, transmissão.

ABSTRACT

The viability of batches of seeds is expressed in terms of percentage of physiologically germinating seeds. Infestation and/or infection of seeds by fungi and oomycetes may influence germination and affect tissues present and/or arising from germination. These seed pathogens can cause damping-off, vascular wilting and seedling rot. The objective of this study was to evaluate the germinative index of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds, as well as the pathogenicity and influence of phytopathogenic fungi isolates: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium ultimum* and *Sclerotium rolfsii*, on seeds germination. The germination methods tested were: water-agar, filter paper and Germitest paper. To evaluate the pathogenicity of the fungi to the seeds, a 5 mmø mycelium disc was deposited in the center of the plate and 10 seeds were arranged around it. All the 16 cultivars used, only 'Mauren', 'Vitória de Santo Antão', 'BRS Lélia', 'BRS Leila', 'Gizele' and 'BRS Mediterranea' showed germination power above 50% in the tested methods. In pathogenicity *in vitro* assays, all isolates of the tested fungi were pathogenic to lettuce culture. The highest incidence was observed with *S. rolfsii*, which inhibited 100% seed germination in all cultivars tested. The isolates of *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 were the ones with the lowest incidence. The cultivars Mauren and Vitória de Santo Antão were also greatly affected by artificial inoculation with *S. sclerotiorum*, *R. solani* and *P. ultimum*, with values of 66 and 100% of incidence. The cultivar BRS Leila presented the highest germination rates, with all pathogens tested.

Key words: batches of seeds, cultivar susceptibility, inoculation, soil pathogens, transmission.

2.1. INTRODUÇÃO

Semente de boa qualidade fisiológica e sanitária é considerada insumo da maior importância na produção de mudas, bem como para o manejo de doenças das culturas (Minami, 2010). O processo de germinação é o restabelecimento da atividade metabólica da semente e pode ser influenciado por fatores ambientais, tais como temperatura e luminosidade, afetando a taxa de absorção de água e reações bioquímicas (Carvalho & Nakagawa, 2012). A viabilidade de um lote de sementes é expressa em termos de percentagem de sementes fisiologicamente capazes de germinar (Brasil, 2009).

A alface (*Lactuca sativa*) é uma das hortaliças folhosas mais importantes e mais consumidas, sendo utilizada *in natura* em restaurantes (Oliveira *et al.*, 2006). O conhecimento do potencial fisiológico das sementes permite a produção de mudas com vigor, tamanho e qualidades uniformes, com vantagens no desenvolvimento das plantas, principalmente em espécies cuja condução da cultura comercial requer o transplante (Franzin *et al.*, 2005).

A alface é uma planta suscetível a diversos organismos fitopatogênicos, entre os quais, destacam-se fungos fitopatogênicos que habitam o solo (Lopes *et al.*, 2010). Estes podem causar sintomas de encharcamento da raiz, obstrução dos vasos devido à colonização do xilema e morte da plântula; deterioração das sementes, evidenciada pelo escurecimento dos tecidos das sementes, manchas com aspecto encharcado em plântulas e perda de rigidez dos tecidos; escurecimento e apodrecimento de raízes, acompanhado pela decomposição dos tecidos e o enfraquecimento do caulículo, levando ao tombamento da plântula colonizada e decomposta pelo fungo (Amorim *et al.*, 2018).

Existem diferentes gêneros de fungos, causadores de doenças no início do ciclo da cultura, que podem ser veiculados pelas sementes de alface. Esses fungos afetam as sementes e tecidos vegetais jovens oriundos da germinação das sementes, levando ao tombamento ou *damping-off*, murchas vasculares e podridões em plântulas. Entre os fungos de solo

causadores de doenças em alface, citam-se: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, entre outros (Pereira *et al.*, 2015).

A patogenicidade dos fungos *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, *P. ultimum*, *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* e *R. solani*, em distintas cultivares de alface não está plenamente esclarecida. Devido à importância de se estabelecer o nível de influência na germinação das sementes e o potencial de dano desses fungos de solo em alface, foram conduzidos experimentos objetivando avaliar os efeitos desses patógenos na germinação desta olerícola.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF.

2.2.1. Obtenção dos fungos fitopatogênicos

Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac raça 1 - 206 e FOLac raça 1 - 240) e *P. ultimum* (PYT555), juntamente com os isolados de *R. solani* (RHI23), *S. sclerotiorum* (CEN1530) e *S. rolfsii* (CEN1531), foram cedidos pela Coleção de Fungos Fitopatogênicos da Embrapa Hortaliças, Brasília – DF. Também foram incluídos, um isolado de *S. sclerotiorum* (CEN1147) e um de *S. rolfsii* (CEN216) pertencentes à Coleção de Microrganismos para o Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF (Tabela 2). As culturas fúngicas foram reativadas em placas de Petri utilizando o meio BDA (Merk KGaA®). Das culturas obtidas, foram produzidas novas colônias, transferindo-se discos de micélio (5 mm \varnothing) de cada placa matriz para outras placas, contendo o mesmo meio. As culturas foram incubadas em estufa regulada para 26 °C e fotoperíodo de 12 horas, por sete dias.

Tabela 2. Descrição com origem e ano de isolamento dos fungos fitopatogênicos.

Isolado	Município	Hospedeiro/ Substrato	Ano de isolamento
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> (FOLac raça 1 - 206)	Paulínia (SP)	Alface	2009
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> (FOLac raça 1 - 240)	Pelotas (RS)	Alface	2011
<i>R. solani</i> (RHI23)	Samambaia (DF)	Solo/Alface	2017
<i>P. ultimum</i> (PYT555)	Mogi das Cruzes (SP)	Alface	2015
<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1530)	Embrapa Hortaliças (DF)	Solo/Alface	2018
<i>S. rolfsii</i> (CEN1531)	Embrapa Hortaliças (DF)	Solo/Alface	2018
<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1147)	Formosa (GO)	Feijoeiro	2012
<i>S. rolfsii</i> (CEN216)	Brasília (DF)	Feijoeiro	2002

2.2.2. Produção de culturas-estoque dos fungos

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas culturas puras, monospóricas originárias das colônias crescidas em tubos de ensaio com o mesmo meio e incubadas nas condições de incubação descritas anteriormente. Após o desenvolvimento das colônias, os tubos foram fechados com tampões de algodão, recobertos com papel alumínio e vedados com filme de parafina plástica e papel (Parafilm M[®]). As culturas foram guardadas em refrigerador (4 °C), para uso oportunamente.

2.2.3. Obtenção das cultivares de alface

As sementes de alface ‘Rubi’, ‘Veneza’, ‘Laurel’, ‘Donna’, ‘Veronica’, ‘Raider Plus’, ‘Vanda’, ‘Vitória de Santo Antão’, ‘Regina’, ‘Gizele’, ‘Elisa’ e ‘Mauren’ foram obtidas da coleção da Embrapa Hortaliças. A cultivar Hanson foi adquirida no mercado de Brasília. As novas cultivares comerciais BRS Lélia, BRS Mediterrânea e BRS Leila, lançadas para

comercialização em 2018 pela empresa de sementes de hortaliças Agrocinco Seeds of Value (Anexo 3).

2.2.4. Germinação de sementes das cultivares por diferentes métodos

Amostras dos lotes de sementes de alface foram homogeneizadas, e desinfestadas superficialmente, a fim de coibir a germinação de fungos oportunistas no meio e mascarar os resultados dos outros testes e embaladas individualmente. As sementes foram posteriormente armazenadas em refrigerador (4 °C) durante todo o período de condução dos experimentos. Um primeiro ensaio foi conduzido para avaliar o potencial germinativo dos diferentes lotes de sementes de alface. O objetivo inicial foi de selecionar as cultivares que apresentassem melhor índice de germinação, adaptado de Maguire (1962), dado pela fórmula: $G = (N/90) \times 100$, onde: G= germinação%; N= nº de sementes germinadas ao final do teste; 90= nº de sementes utilizado por tratamento.

O experimento foi estabelecido com três repetições e com 30 sementes por tratamento. As sementes foram submetidas à desinfestação superficial por imersão em solução de etanol 70%, seguida de hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto e três lavagens em água destilada e esterilizada (conforme de adaptado Kikuti & Marcos Filho, 2012). Uma pequena porção de cada amostra foi semeada em placas de Petri forradas com duas folhas papel filtro e outra, em papel para germinação Germitest (28 x 38 cm), umedecidas com água destilada na proporção de duas vezes e meia o peso do papel. Os testes de germinação em placa de Petri foram conduzidos em estufa incubadora BOD (Nova Técnica[®]) a 26 °C, no escuro durante as primeiras 48 horas, para simular as primeiras horas cobertas pelo solo/substrato, quando semeadas em sementeira. Após esse período, as sementes foram submetidas ao regime claro/escuro de 12 horas. A avaliação do potencial germinativo foi realizada sete dias após a instalação do experimento. Considerou-se um valor mínimo de germinação aceitável de 50%

em cada repetição para cada cultivar (conforme adaptado de Pinheiro *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2015).

Com base nesses testes preliminares, seis das cultivares foram selecionadas: ‘Vitória de Santo Antão’, ‘BRS Mediterrânea’, ‘BRS Lélia’, ‘Gizele’ e ‘BRS Leila’. Estas cultivares foram empregadas nos testes subsequentes nas mesmas condições pré-estabelecidas no ensaio preliminar conduzido em laboratório: três repetições, com 30 sementes cada, em papel Germitest, papel filtro e em placas contendo ágar-água (AA) 2%. As sementes germinadas foram contabilizadas no décimo dia de germinação.

2.2.5. Determinação da patogenicidade de fungos de solo a alface, *in vitro*

Os fitopatógenos foram escolhidos devido à ocorrência dos mesmos em plantas de alface com sintomas em campos de cultivo de diferentes regiões do país, com exceção dos isolados *S. sclerotiorum* - CEN1147 e *S. rolfsii* - CEN216, obtidos de plantas de feijão (Tabela 2). Amostras de micélio das culturas-estoque foram transferidas para meio de cultura BDA sintético (Merk KGaA[®]) e incubadas por sete dias, em estufa incubadora BOD (Nova Técnica[®]) a 26 °C, com fotoperíodo de 12 horas. As cultivares escolhidas foram: ‘BRS Mediterrânea’, ‘Vitória de Santo Antão’, ‘BRS Lélia’, ‘Mauren’ e ‘BRS Leila’. Discos de micélio (5mm \otimes) provenientes das novas culturas foram depositados no centro das placas e 10 sementes de cada cultivar foram distribuídas nas bordas. Incubaram-se as culturas por 48 horas em estufa incubadora BOD no escuro. Após este procedimento, todos os tratamentos foram transferidos para outra estufa incubadora BOD (Nova Técnica[®]) com temperatura regulada para 26 °C e fotoperíodo de 12 horas, permanecendo nestas condições por 10 dias.

A patogenicidade dos fungos foi analisada no décimo dia após a instalação do experimento, para todas as cultivares, usando os seguintes critérios de avaliação: sementes germinadas e plântulas sintomáticas e sementes mortas. A metodologia utilizada para a

avaliação patogênica *in vitro* foi a descrita por Teixeira *et al.* (2006), porém adaptada, pois neste estudo não foi realizada a pré-germinação das sementes.

2.2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (D.I.C.), composto por 18 tratamentos, três repetições com 30 sementes cada, em esquema fatorial 6 x 3. Neste primeiro experimento, foi avaliado o evento germinação ou não germinação da semente em função da cultivar e do método. Este experimento foi conduzido três vezes. O teste utilizado para avaliar a germinação foi análise de regressão logística, seguida da comparação de médias, pelo teste de Tukey, ao nível de 0,05. O experimento subsequente, para estudo da patogenicidade *in vitro* dos fungos em sementes das cinco cultivares selecionada, também foi conduzido em D.I.C. Este foi constituído de 40 tratamentos (combinações cultivar x fitopatógeno), três repetições com 10 sementes cada, em esquema fatorial 5 x 8 (cultivar x fitopatógeno). Devido ao tamanho do ensaio, optou-se, neste experimento, por considerar apenas dois níveis de resposta: **(1)** germinação normal e **(2)** germinação anormal + não germinação. Nos tratamentos com o fungo *S. rolfsii*, não houve germinação de sementes, por isso esses tratamentos não foram considerados para a análise. Todas as análises foram realizadas por regressão logística, com o modelo de “família” quasibinomial. Em seguida foram realizadas as comparações entre cada cultivar usando o método de Tukey 5% no software R (Burnham & Anderson, 2002).

A média de sementes germinadas, plântulas sintomáticas e sementes mortas para cada tratamento em: *S. sclerotiorum* CEN1147 (T1), *S. sclerotiorum* CEN1530 (T2), *S. rolfsii* CEN216 (T3), *S. rolfsii* CEN1531 (T4), *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* FOLac-raça 1-206 (T5), *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* FOLac raça 1 - 240 (T6), *R. solani* RHI23 (T7) e *P. ultimum* PYT555 (T8), foram obtidas (conforme descrito no item 2.2.5) e transformadas em valores de

porcentagens. Plântulas classificadas como sintomáticas apresentaram podridão, necrose ou atrofia da radícula, caulículo e cotilédones. A semente foi considerada germinada quando demonstrou aptidão em produzir uma plântula normal (Brasil, 2009).

2.3. RESULTADOS

2.3.1 Germinação de sementes de cultivares de alface

Os testes preliminares realizados apontaram baixo índice de germinação, abaixo do requerido ($G < 50\%$), para as cultivares Rubi, Veneza, Laurel, Donna, Veronica, Hanson, Raider Plus, Vanda e Elisa e por isso, estas cultivares foram descartadas. Os resultados da germinação pelos três métodos utilizados estão expostos na Tabela 3. As cultivares Gizele e Vitória de Santo Antão foram as únicas para as quais se observou diferença significativa nos valores médio de percentagem de germinação entre os métodos. Para a cultivar Gizele, a germinação foi mais baixa no papel Germitest (77%), que diferiu dos métodos ágar-água e papel filtro, com 97% e 99% de germinação, respectivamente. Já para a cultivar Vitória de Santo Antão, diferença foi verificada entre os três métodos, com percentagens de germinação de 84%, 97% e 44%, em ágar-água, papel filtro e Germitest, respectivamente.

Tabela 3. Germinação (%) de sementes de seis cultivares de alface pelos métodos: ágar-água, Germitest e papel filtro.

Cultivar	Métodos		
	Ágar-água	Germitest	Papel filtro
‘Gizele’	97 ± 0.02a	77 ± 0.04b	99 ± 0.01a
‘BRS Leila’	100 ± 0.00a	100 ± 0.00a	99 ± 0.01a
‘BRS Lélia’	98 ± 0.02a	97 ± 0.02a	98 ± 0.02a
‘Mauren’	91 ± 0.02a	84 ± 0.03a	90 ± 0.03a
‘BRS Mediterrânea’	98 ± 0.02a	97 ± 0.02a	100 ± 0.00a
‘Vitória de Santo Antão’	84 ± 0.04b	44 ± 0.05c	97 ± 0.02a

Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa ao nível de 5%, pelo teste Tukey.

2.3.2. Testes de patogenicidade *in vitro*

Todos os fungos foram patogênicos à cultura da alface. Algumas dessas cultivares apresentaram variação nos ensaios de patogenicidade realizados (Tabela 4). Os isolados do fungo *S. rolfsii* (CEN216 e CEN1531) foi patogênico as sementes de todas as cultivares, a ponto de nenhuma das amostras germinar. O fungo, ainda foi capaz de formar estruturas de resistência conhecidas por esclerócios em todas as placas-teste. Os isolados de *S. sclerotiorum* (CEN1147 e CEN1530) apresentaram variação na porcentagem de sementes germinadas e plântulas sintomáticas. Não houve germinação das sementes inoculadas com o isolado CEN1147 nos ensaios com a cultivar Mauren e, para a cultivar Vitória de Santo Antão, apenas 0,3% das sementes germinaram. Este fato demonstra que as sementes que germinaram na presença do patógeno foram infectadas após a germinação. Já nos tratamentos com o isolado CEN1530, estas mesmas cultivares apresentaram percentuais de germinação de 36,6 e 30%, respectivamente. As demais cultivares apresentaram boa capacidade germinativa na

presença destes mesmos isolados de *S. sclerotiorum*, com valores de 93,3 e 100%. Esse resultado reflete a baixa capacidade de infecção dos isolados, com 0 e 6,6% de plântulas sintomáticas ao todo (Tabela 4).

As sementes de todas as cultivares exibiram percentuais de germinação entre 53,3 – 100% quando inoculadas artificialmente com os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 (FOLac raça 1 – 206 e FOLac raça 1 – 240). Estes isolados não apresentaram dano às cultivares BRS Leila e BRS Lélia (0%) e demonstraram baixa capacidade de infecção nas sementes de ‘BRS Mediterrânea’ (3,3 e 6,6), respectivamente. As cultivares Mauren e Vitória de Santo Antão apresentaram percentuais de 26,6 e 49,9% de plântulas sintomáticas (Tabela 4).

Nos ensaios com o fungo *R. solani* isolado RHI 23, também houve uma variação no percentual de sementes germinadas. O isolado RHI 23 afetou mais as cultivares Vitória de Santo Antão e a cultivar Mauren, as quais apresentaram baixos índices de germinação (3,3 e 39,9%, respectivamente). Com a cultivar Mauren, observou-se que as plântulas germinadas desenvolveram os sintomas de necrose ou *damping-off*, logo a seguir. Com as cultivares BRS Leila, BRS Mediterrânea e BRS Lélia, observaram-se altos valores de germinação na presença do isolado de *R. solani* (96,6 e 100%) (Tabela 4).

O fungo *P. ultimum* isolado PYT555, considerado típico em sistemas de hidroponia, prejudicou seriamente a germinação das sementes nas cultivares Vitória de Santo Antão, na qual nenhuma das sementes germinou e, ‘Mauren’, que apresentou apenas 20% de sementes germinadas. Já as cultivares BRS Leila, BRS Mediterrânea e BRS Lélia foram menos afetadas e, embora tenham sido observados 100% de germinação para todas elas, algumas plântulas exibiram sintomas causados pela colonização de PYT 555, com valores de 6,66, 13,3 e 16,6% de plântulas sintomáticas (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual de sementes de diferentes cultivares de alface germinadas e incidência (plântulas sintomáticas e sementes mortas), quando inoculadas artificialmente com os fungos: *Sclerotinia sclerotiorum* (isolados CEN1147 e CEN1530), *Sclerotium rolfsii* (isolados CEN216 e CEN1531), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (isolados FOLac raça 1 – 206 e FOLac raça 1 – 240), *Rhizoctonia solani* (isolado RHI 23) e *Pythium ultimum* (isolado PYT 555).

Cultivar	*T	Sementes germinadas (%)							
		Sementes inoculadas com os fitopatógenos							
		<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1147)	<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1530)	<i>S. rolfsii</i> (CEN216)	<i>S. rolfsii</i> (CEN216)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> (FOLac raça 1 – 206)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> (FOLac raça 1 – 240)	<i>R. solani</i> (RHI 23)	<i>P. ultimum</i> (PYT 555)
Mauren	83,3	0	36,6	0	0	76,6	53,3	39,9	20
BRS Leila	100	100	100	0	0	100	100	96,6	100
BRS Mediterrânea	100	93,3	100	0	0	100	100	100	100
BRS Lélia	100	93,3	100	0	0	100	100	100	100
Vitória de Santo Antão	73,3	0,3	30	0	0	86,6	80	3,3	0

Cultivar	*T	Incidência (%)							
		Plântulas sintomáticas e sementes mortas inoculadas com os fitopatógenos							
		<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1147)	<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1530)	<i>S. rolfsii</i> (CEN216)	<i>S. rolfsii</i> (CEN216)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> (FOLac raça 1 – 206)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> (FOLac raça 1 – 240)	<i>R. solani</i> (RHI 23)	<i>P. ultimum</i> (PYT 555)
Mauren	0	100	66,6	100	100	26,6	49,9	66,6	100
BRS Leila	0	16,6	0	100	100	0	0	29,9	6,66
BRS Mediterrânea	0	46,6	6,6	100	100	3,3	6,6	16,6	13,3
BRS Lélia	0	96,6	6,6	100	100	0	0	26,6	16,6
Vitória de Santo Antão	0	100	83,3	100	100	89,9	90	100	100

* Testemunha não inoculada.

Como se observa na Tabela, as cultivares Vitória de Santo Antão (16%) e Mauren (39%), foram as que diferiram significativamente entre si e das demais, quanto ao índice de germinação na presença dos fungos fitopatogênicos testados. As três representantes do tipo varietal crespa, ‘BRS Leila’, ‘BRS Lélia’ e ‘BRS Mediterrânea’ apresentaram percentuais de 92, 79 e 86% de germinação, respectivamente, na presença dos patógenos.

Tabela 5. Percentagem de germinação (%) das cultivares BRS Leila, BRS Lélia, Mauren, BRS Mediterrânea e Vitória de Santo Antão, inoculadas artificialmente com fungos fitopatogênicos de solo.

Cultivar	Percentual de germinação⁽¹⁾
‘BRS Leila’	92 ± 0.11a
‘BRS Lélia’	79 ± 0.34a
‘Mauren’	39 ± 0.32b
‘BRS Mediterrânea’	86 ± 0.15a
‘Vitória de Santo Antão’	16 ± 0.26c

⁽¹⁾Letras diferentes na mesma linha representam diferença média de probabilidade significativa ao nível de 5% pelo teste Tukey.

2.4. DISCUSSÃO

2.4.1 Germinação de sementes de cultivares de alface

Estudos sobre a qualidade das sementes de espécies cultivadas têm gerado grande interesse por parte de pesquisadores, principalmente quanto à padronização, aperfeiçoamento e estabelecimento de métodos de análises laboratoriais (Mendes *et al.*, 2009). Os valores de germinação de sementes de alface por diferentes métodos reportados no presente estudo estão em conformidade com Nascimento *et al.* (2012). Para Kikuti & Marcos Filho (2012), informações sobre testes para estimar velocidade e porcentagem de germinação de sementes de alface são relativamente escassas, por isso recomendam o uso combinado de diferentes

testes. Entretanto, os resultados aqui obtidos mostraram pouca variação entre os métodos utilizados. Soares *et al.* (2017) observaram a influência da temperatura na germinação de sementes de diferentes cultivares de alface com o uso de papel Germitest. Segundo esses mesmos autores, foram observados valores de germinação de 80% no grupo de cultivares crespas de verão, 47% no grupo varietal americana, 74% no segmento mimosa e 82% no segmento varietal crespa repolhuda. Tais resultados estão de acordo com os resultados observados neste trabalho com as cultivares do tipo varietal crespa ('BRS Lélia', 'BRS Mediterrânea' e 'BRS Leila') e contrariam os obtidos com a cultivar americana (Mauren), uma vez que também esta cultivar apresentou percentuais elevados de germinação em papel Germitest.

Meios gelificantes (a base de ágar-água) são requeridos como superfície de suporte para o desenvolvimento de explantes de alface, principalmente, a partir de folhas cotiledonares obtidas de sementes germinadas *in vitro* (Pinheiro *et al.*, 2012). Neste trabalho, confirma-se a utilidade do método ágar-água para germinação das sementes de alface.

Golle *et al.* (2010), utilizando sementes de *Pinus taeda* L., relataram que fatores ligados ao meio, como toxidez causada por contaminantes existentes no ágar, tratamentos de sementes com etanol e hipoclorito de sódio (NaOCl) ou até mesmo baixa disponibilidade de água no meio, podem ter relação com a baixa germinação. No entanto, esse aspecto não pode ser considerado como relevante para germinação de sementes de alface, uma vez que os testes realizados no presente estudo não detectaram anormalidades aparentes ou algum dano causado pelo ágar (Figura 1). Entretanto, Caldas *et al.* (1998) também mencionaram que o ágar está entre os agentes que podem induzir toxicidade a algumas espécies vegetais, especialmente quando o produto possui baixo grau de pureza. Vale informar que, neste estudo foi utilizado um ágar comercial (Dinâmica[®]) na concentração de 2%. Coutinho *et al.* (2001) relataram percentuais de germinação de 80% em sementes de arroz (*Oryza sativa*) e 82% em

sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), utilizando o meio ágar-água, considerado adequado para as espécies estudadas por esses autores.

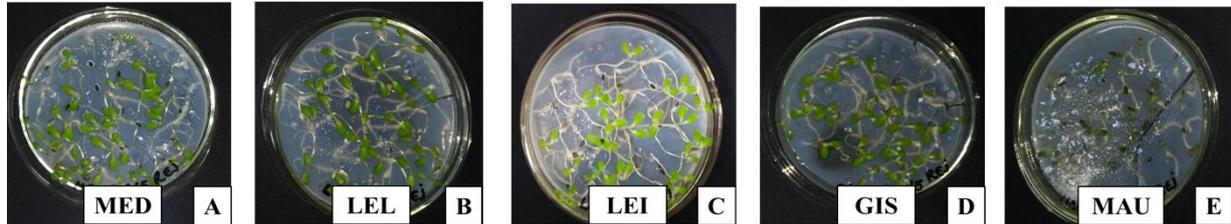


Figura 1. Ilustração dos testes de germinação, em ágar-água, de sementes de alface das cultivares: ‘BRS Mediterrânea’ (A); ‘BRS Lélia’ (B); ‘BRS Leila’ (C); ‘Gizele’ (D); ‘Mauren’ (E).

Em contrapartida, Rodrigues *et al.* (2012) constataram que o uso de hipoclorito de sódio favorece a germinação de sementes de alface, exceto quando hidrocondicionadas em papel Germitest. No entanto, esta informação não foi confirmada no presente estudo, pelo menos com as cultivares Vitória de Santo Antão e Gizele, as quais apresentaram valores de percentual de germinação em Germitest inferiores estatisticamente, em relação às demais cultivares de alface. Fernandes *et al.* (2017) testaram a germinação de sementes de alface (cultivar não especificada) em papel Germitest, obtendo bons resultados. O mesmo foi verificado com Silva *et al.* (2008), com sementes de pinhão-manso. Portanto, os resultados de testes de germinação podem variar entre espécies vegetais e entre cultivares dentro de espécies.

O processo de germinação é afetado por uma série de condições intrínsecas e extrínsecas à semente, como umidade, temperatura e oxigênio. Pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que os testes de germinação conduzidos em papel Germitest e em papel filtro não acarretaram danos às sementes de alface, apesar de asseverada a existência, nesses suportes, de substâncias tóxicas, às quais sementes de algumas espécies, incluindo alface, seriam sensíveis (Brasil, 2009). A avaliação de suportes para germinação de sementes é feita por

comparação do desenvolvimento das radículas imediatamente após a germinação, porque os sintomas de inibição são mais pronunciados nas raízes em estágio inicial de desenvolvimento. São indicativas da presença de substâncias nocivas às sementes nesse tipo de suporte, raízes mais curtas com extremidades escurecidas, ou levantadas do papel e aglomeração de pelos absorventes.

Deng & Song (2012) postulam que sementes de alface germinam melhor à temperatura de 20 °C. No entanto, contrariando esses autores, como também Bertagnolli *et al.* (2003) e Schwember & Bradford (2010), o presente trabalho revelou índices de germinação máximo com a maioria das cultivares, à temperatura 26 °C. Índices de germinação mais baixos foram os obtidos com as cultivares Gizele (77%) e Vitória de Santo Antão (44%), apenas no Germitest. De acordo com os trabalhos supracitados, temperaturas acima de 25° C afetariam a germinação final e, também, a velocidade de germinação, a velocidade da absorção de água e as reações bioquímicas, que determinam todo o processo germinativo.

A escolha do método a ser utilizado para os testes de germinação deve levar em consideração as exigências de cada espécie e a infraestrutura do laboratório. As percentagens de germinação relatadas no presente trabalho equivalem às percentagens de sementes que originaram plântulas normais, considerando às condições descritas nas Regras de Análises de Sementes (Marcos Filho, 2005; Brasil, 2009).

2.4.2. Testes de patogenicidade *in vitro*

Testes de patogenicidade *in vitro*, em sementes, apresenta potencial de uso na prospecção de estudos preliminares de genótipos de alface resistentes às doenças causadas pelos patógenos de solo. O foco do presente estudo foi verificar se isolados dos fungos *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, *R. solani* e *P. ultimum*, coletados em áreas de cultivo de alface (CEN1530, CEN1531, FOLac raça 1 – 206, FOLac raça 1 – 240,

RHI 23 e PYT 555) e feijoeiro (CEN1147 e CEN216) revelariam ser patogênicos a alface, em testes conduzidos com sementes.

A origem dos isolados de *S. sclerotiorum* – CEN1147 e *S. rolfsii* – CEN216 não interferiu na patogenicidade *in vitro* à cultura da alface. Ainda, os dois isolados de *S. sclerotiorum* (CEN1147 e CEN1530) por vezes se comportaram diferentemente para a mesma cultivar, como foi o caso, principalmente das cultivares Mauren e Vitória de Santo Antão. O isolado *S. sclerotiorum* - CEN 1147 afetou mais a germinação das sementes das cultivares Mauren, BRS Lélia e Vitória de Santo Antão. As cultivares BRS Leila, BRS Mediterrânea e BRS Lélia apresentaram menor incidência da doença com o isolado CEN1530, do mesmo patógeno. Venturoso *et al.* (2015) constataram que distintos isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de lavoura de soja podem, quando inoculados artificialmente, também infectar sementes de outras oleaginosas, como: canola, cártamo, crambe, girassol, nabo forrageiro e níger. O fungo provocou tombamento de pré-emergência e pós-emergência em todas estas espécies estudadas. Esses resultados corroboraram aqueles obtidos por Figueirêdo (2005) com isolados de *S. sclerotiorum* de diferentes origens, quando inoculados em feijão.

Com relação aos isolados de *S. rolfsii* (CEN216 e CEN1531), trata-se de um fungo considerado polífago, capaz de infectar mais de 1900 espécies botânicas. Sua distribuição é mundial e causa tombamento de mudas e podridão do colo ou das raízes das plantas hospedeiras (SMML, 2019), portanto, sem qualquer especificidade, como observado no presente estudo.

Já os fungos do complexo *F. oxysporum* são considerados parasitas especializados e tem uma reduzida gama de hospedeiros, com biótipos específicos a espécies e frequentemente a cultivares de plantas (Lockwood, 1988). Em contraste, o fungo *R. solani* é geralmente considerado um patógeno mais primitivo e não especializado. Muitos isolados patogênicos de *R. solani* podem infectar plântulas de vários hospedeiros, embora em plantas adultas sejam

mais restritos em sua gama de hospedeiros. Este pode ser introduzido em novas áreas de cultivo, em qualquer etapa do plantio, via sementes, mudas e/ou substratos contaminados (Lewis & Lumsden, 2001). Neste estudo, o isolado de *R. solani* - RHI23 foi patogênico a todas as cultivares testadas, sendo que as cultivares Mauren e Vitória de Santo Antão apresentaram altos percentuais de plântulas sintomática e de sementes mortas. Novamente as cultivares representantes do tipo varietal crespa ‘BRS Leila’, ‘BRS Mediterrânea’ e ‘BRS Lélia’, apresentaram um maior número de plântulas sem sintomas.

Segundo Lopes *et al.* (2010), *R. solani* é um patógeno de solo causador de podridões em caules e raízes, presente na maioria das regiões de cultivo de alface, que pode limitar a produção dessa hortaliça. O fungo constitui um dos maiores problemas em regiões ou épocas quentes, solos mais úmidos ou com excesso de irrigação, onde, juntamente com *P. ultimum* e *F. oxysporum*, afeta inclusive cultivos protegidos, causando falhas no estande e plantas mal desenvolvidas. Na produção de mudas para o plantio em campo, as sementes afetadas geram plântulas doentes, resultando em *dampin-off*. Além disso, os microescleródios de *R. solani* podem sobreviver em outros hospedeiros (Mercier & Manker, 2005). Esses fatos justificam os experimentos conduzidos neste trabalho, com o objetivo de verificar a patogenicidade do isolado RHI23 desse fungo às sementes de cultivares de alface.

A produção de escleródios pelos isolados de *S. rolfsii* observada nas placas-teste é um agravante, uma vez que tais estruturas de sobrevivência do fungo, se misturadas às sementes de alface podem, eventualmente, passar despercebidos. Este fato não foi observado com os fungos também formadores de estruturas de sobrevivência *S. sclerotiorum* (CEN1147 e CEN1531) e *R. solani* (RHI23). É importante destacar o papel dos esclerócios na sobrevivência e dispersão de patógenos (Pereira *et al.*, 2015), como *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii*, podendo induzir doenças policíclicas, quando o inóculo secundário produzido

durante o desenvolvimento da doença resulta em infecções adicionais ou novas infecções em outro hospedeiro (Benson *et al.*, 1994).

Propágulos de quase todos os gêneros dos fitopatógenos habitantes do solo respondem aos exsudatos das sementes e raízes, entretanto, pouco se conhece sobre as moléculas específicas que elicitam essas respostas (Bowen & Rovira, 1991). Nelson (1990) reportou a germinação de microconídios e clamidósporos de *F. oxysporum* em resposta a exsudatos de raízes de *Musa* sp. (banana), sementes e mudas de *Pisum sativum* (ervilha) sementes e raízes de *Cassia obtusifolia* (fedegoso) e raízes de *Gossypium hirsutum* (algodão). Porém, a molécula estimulante foi considerada desconhecida. Para *R. solani*, *P. ultimum* e *S. rolfsii*, a fonte do exsudato foi principalmente sementes de ervilha, que influenciaram na germinação de oósporos, esporângios e esclerócios, estimulados por compostos voláteis, uma molécula desconhecida, por glucose e etanol. Neste estudo de patogenicidade *in vitro* com sementes de alface, os isolados de *S. rolfsii* (CEN216 e CEN1531) foram os únicos a formarem esclerócios na placa de Petri com meio ágar-água como suporte. Ainda assim, sobre os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac raça 1 - 206 e FOLac raça 1 - 240) e PYT555 não é possível afirmar que não houve a formação de propágulos típicos do gênero (clamidósporos e conídios), pois as culturas não foram avaliadas microscopicamente.

Espera-se que patógenos do sistema radicular em solos tropicais sejam favorecidos por temperaturas mais elevadas. A quantificação do efeito da temperatura na reprodução dos patógenos do sistema radicular pode contribuir para aumentar a eficiência do manejo das doenças induzidas por estes fungos (Ceresini & Souza, 1996). Os patógenos diferem quanto ao ótimo de desenvolvimento e a temperatura pode determinar a distribuição geográfica da ocorrência das doenças que causam. A temperatura ótima para crescimento micelial e formação de escleródios de *S. rolfsii*, por exemplo, está entre 27-30 °C (Punja, 1985).

Existem indícios de que a dispersão de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 tenha sido via sementes infectadas, baseados no fato de o patógeno estar presente em várias regiões em diferentes continentes e condições climáticas (Garibaldi *et al.*, 2004; Cabral *et al.*, 2018). Os resultados obtidos neste trabalho com as cultivares BRS Leila, BRS Lélia e BRS Mediterrânea corroboram Cabral (2016), em seus ensaios de melhoramento genético de alface resistente ao *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, como citado na Tabela 1. Estas cultivares foram lançadas recentemente como fruto de parceria da Embrapa Hortaliças e a empresa de sementes Agrocinco[®]. Além de apresentarem resistência a *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, foi possível notar diferença entre índices germinativos destas três cultivares de padrão varietal crespa, superiores aos verificados com as demais testadas. Os resultados das inoculações artificiais de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em placas de Petri utilizando sementes, confirma o fato de que esse fitopatógeno causa doenças de pré e pós-emergência de plantas de alface (Hubbard & Gerik, 1993

De acordo com Pacifico (2017) em um levantamento de doenças em alfaces do grupo varietal americana ‘Laurel’, ‘Raider Plus’, ‘Winslow’ e ‘Ludmila’, verificou-se que a ocorrência de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, *R. solani* e *S. sclerotiorum* foi de 32%, 22% e 3%, respectivamente, no verão, com temperaturas acima de 25 °C. No presente estudo, as cultivares Mauren, BRS Leila, BRS Lélia e BRS Mediterrânea são consideradas tolerantes ao calor, adaptando-se às temperaturas de verão acima de 30 °C. Essas quatro cultivares apresentaram diferenças nas percentagens de plântulas sintomáticas, à temperatura de 26 °C. Entretanto, a cultivar americana Mauren também apresentou sementes mortas, quando inoculadas com o isolado RHI 23. A cultivar lisa Vitória de Santo Antão tem sido tradicionalmente cultivada na região Norte do Brasil. Essa região é predominantemente de clima equatorial, com temperatura no verão chegando a 35 °C, mas com média da temperatura

de 25 °C (CPTEC, 2019). Estes fatos sugerem que o fator temperatura tenha efeito na infecção do RHI23 de *R. solani* nas cultivares testadas.

Em relação à infecção causada pelos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac raça 1 - 206 e FOLac raça 1 - 240), ‘Mauren’ e ‘Vitória de Santo Antão’ apresentaram percentuais variados de plântulas sintomáticas, à temperatura de incubação de 26 °C. Contudo, estes dois isolados não foram responsáveis pelas maiores perdas no ensaio *in vitro*. Perdas maiores com *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* podem ser encontradas na literatura, como as relatadas por Matheron *et al.* (2005), onde a incidência do patógeno foi de 88% à temperatura de 26 °C no estado do Arizona (EUA), resultando em perdas na produção de alface variável, de 51% a 100%. Os resultados obtidos neste estudo corroboram os obtidos por Gordon e Koike (2015), cuja incidência de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* foi menor em temperaturas entre 23 °C e 25 °C.

Estudos conduzidos por Ferraz & Viana (2017) com a cultivar lisa Regina 2000, mostraram ser esta cultivar altamente suscetível ao *F. oxysporum* em comparação com a cultivar mimosa Mimosa Roxa. É importante mencionar que a determinação da raça de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* é baseada na capacidade dos isolados induzirem (ou não) sintomas em um conjunto de cultivares de alface diferenciais ou diferenciadoras. Contudo, tais ensaios nem sempre podem responder a questionamentos sobre a existência de associação consistente entre a suscetibilidade fenotípica relacionada à interação patógeno x acultivar (Ogiso *et al.*, 2002; Fujinaga *et al.*, 2003; Cabral *et al.*, 2014).

Baptista *et al.* (2011) verificaram que a cultivar crespa ‘Vera’ foi mais suscetível do que a do tipo mimosa em um estudo de patogenicidade *in vitro* com *Pythium* spp. Esse fato foi também observado por Pinto *et al.*, (2005) com as cultivares Vera e Verônica, ambas do tipo crespa. Entretanto, neste estudo, as cultivares dos padrões varietais americana ‘Mauren’ e lisa

‘Vitória de Santo Antão’ foram as mais afetadas. Na literatura, *P. ultimum* já foi reportado causando danos econômicos consideráveis em áreas de olericultura, plantas ornamentais e arboricultura (Thomson & Burns, 1989; Harris & Nelson, 1999; Appiah *et al.* 2005). Kageyama & Nelson (2002) constataram, em um ensaio para controle biológico, dificuldades em controlar a infecção por *P. ultimum*, ao verificar que a germinação dos esporângios era estimulada por uma preferência de exsudatos de sementes de diversas hortaliças, dentre elas a alface. No presente trabalho, observaram-se falhas na germinação em 100% das sementes da cultivar Vitória de Santo Antão e 80% das sementes da cultivar Mauren. Já nas cultivares do tipo varietal crespa não ocorreram falhas de germinação.

Teste de patogenicidade em sementes *in vitro* também podem ter aplicações para triagens rápidas, ou prospecção de materiais resistentes em bancos de germoplasmas. Diversos autores relataram sucesso na identificação de germoplasmas resistente a *Rhizoctonia* em culturas como beterraba (Bugbee & Campbell, 1990), batata (Leach & Webb, 1993), algodão (Wang & Davis, 1997) e diversas oleaginosas (Yang & Verma, 1992), empregando este método.

As perdas na produção de alface devido aos patógenos de solo estudados podem ser significativas e até devastadoras, mesmo na alfacicultura convencional, especialmente no caso de fungos que produzem estruturas de resistência, a exemplo de *S. rolfsii*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*, uma vez que tais estruturas podem ser inacessíveis aos produtos químicos (Reis *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2010). No caso de *P. ultimum*, nota-se uma propensão do patógeno para resistência a fungicidas (Alvarez *et al.*, 2012; Lookabaugh *et al.*, 2015). Portanto, há necessidade de se desenvolver estratégias de manejo das doenças não dependentes do uso de fungicidas químicos. A esse respeito, o desenvolvimento e uso de agentes de biocontrole contra os fungos de solo vem sendo incentivado com foco, tanto na alfacicultura convencional como no sistema de produção orgânica.

Entender o processo de reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro é muito importante, pois permite que várias rotas de defesa sejam ativadas para conter o progresso da infecção. Acredita-se que a interação entre o gene R e o *Avr* desencadeie a expressão de uma série de genes ligados à resistência da planta contra o patógeno. Quando isso não ocorre, a planta não é capaz de ativar seus mecanismos de defesa de forma eficiente, resultando no estabelecimento da doença (Briggs & Ojal, 1994; Wit, 1997; Wit & Joosten, 1999).

O número de cultivares resistente/tolerantes disponíveis no mercado para o produtor é muito pequeno, mesmo devido a sua importância, aliado ao fato de que a alface é hospedeira de vários patógenos destrutivos. Os resultados obtidos neste trabalho *in vitro* podem contribuir para futuros estudos mais aprofundados envolvendo ensaios de casa de vegetação, campos de produção ou campos infestados, para o estudo da resistência destes patógenos e cultivares aqui envolvidos.

Conforme salientado por Brieger & Gurgel (1942) em trabalhos de melhoramento e manutenção das qualidades de hortaliças, é necessário que as melhores plantas, ou as que mais correspondem ao tipo desejado, sejam mantidas como produtoras de sementes. A preferência do consumidor brasileiro pelo tipo varietal crespa é determinante na escolha da variedade. Este estudo demonstrou que, considerando o potencial germinativo por diferentes métodos e a patogenicidade avaliada, as três representantes deste tipo varietal, ‘BRS Lélia’, ‘BRS Leila’ e ‘BRS Mediterrânea’, são boas representantes desse tipo varietal.

2.5. CONCLUSÕES

- ✓ Os testes de germinação, com o uso dos métodos utilizados neste trabalho, atestaram o elevado poder germinativo das sementes de alface utilizadas, apesar dos percentuais médios com papel Germitest.
- ✓ Todos os fungos foram patogênicos a cultura da alface.

- ✓ Os isolados de *S. rolfsii* foram responsáveis pela não germinação das sementes de todas as cultivares.
- ✓ A germinação das sementes da cultivar BRS Leila foi menos afetada pela presença dos fitopatógenos estudados, à exceção de *S. rolfsii*.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRÍNCIPE, A. BORIOLI, G.; FISHER, S.; MORI, G. & JOFRÉ, E. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, p. 159-74, 2012.
- ALVES, C. Z.; SILVA, J. B. & CÂNDIDO, A. C. S. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de goiaba. *Revista Ciência Agronômica*, v. 46, n. 3, p. 615-621, 2015.
- APPIAH, A. A.; VAN WEST, P.; OSBORNE, M. C. & GOW, N. A. R. Potassium homeostasis influences the locomotion and encystment of zoospores of plant pathogenic oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, v. 24, p. 213-223, 2005.
- BAPTISTA, F. R.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; TEIXEIRA, L. D. D. & SANTOS JÚNIOR, N. A. Avaliação patogênica in vitro de *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechler em alface. *Summa Phytopathologica*, v. 37, n. 1, 2011.
- BENSON, D.M. INOCULUM. IN: CAMPBELL, C.L. & BENSON, D.M. (Eds.) *Epidemiology and Management of Root Diseases*. Heidelberg. Springer-Verlag. p. 1-33, 1994.
- BERTAGNOLLI, C. M.; MENEZES, N. L.; STORCK, L.; SANTOS, O. S. & PASQUALLI, L. L. Desempenho de sementes nuas e peletizadas de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a estresse hídrico e térmico. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 25, n. 1, p. 7-13, 2003.
- BOWEN, G.D.; ROVIRA, A.D. The rhizosphere. In: Waisel, Y., Eshal, A. & Kafkat, U. (Eds.) *Plant Roots*. New York. Marcel Dekker, p. 641-669, 1991.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análises de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS. p. 399. 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf> Acesso em: 10 dez. 2018.
- BRIEGER, F. G.; GURGEL, J. T. A. Seleção e produção de sementes em hortaliças: com referência especial ao gênero *Brassica*. *Bragantia*, v. 2, n. 11, p. 449-480, 1942.
- BRIGGS, S. P.; OJAL, G. S. Genetic patterns of plant host-parasite interactions. *Trends in Genetics*, v. 10, p. 12-16, 1994.

- BUGBEE, W. M.; CAMPBELL, L. G. Combined resistance in sugar beet to *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae* and *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, v. 74, p. 353-355, 1990.
- BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Model selection and multimodel inference : a practical information-theoretic approach; 2nd edition, Springer-Verlag, New York, 488p., 2002.
- CABRAL, C. S.; BRUNELLI, K. R.; COSTA, H.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; REIS, A. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 as the causal agent of lettuce wilt in Brazil. *Tropical Plant Pathology* v. 39, p. 197-202, 2014.
- CABRAL, C. S. Análise genética da resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 em alface: aplicação de marcadores do tipo RGA e de SNPs derivados de genotyping-by-sequencing. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, p.182. 2016.
- CABRAL, C. S.; FONSECA, M. E. N.; BRUNELLI, K. R.; ROSSATO, M.; COSTA, H.; BOITEUX, L. S.; REIS, A. Relationships among Brazilian and worldwide isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 inferred from ribosomal intergenic spacer (IGS-rDNA) region and EF-1 α gene sequences. *European Journal of Plant Pathology* v. 152, p. 81-94, 2018.
- CALDAS, L. S.; PADMAJA, H. & FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPq, p. 87-132, 1998.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 590p., 2012.
- CERESINI, P.C.; SOUZA, N.L. Caracterização cultural e fisiológica de *Rhizoctonia solani* GA 4 HGI associado a vagens de amendoimzeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 443-454, 1996.
- COUTINHO, W. M.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M. & FERREIRA, D. F. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio Ágar-água. *Revista Brasileira de Sementes*. v. 23. n.2. p. 127-135. 2001.
- CPTEC. Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos. Disponível em:< <http://clima1.cptec.inpe.br/estacoes/pt>> Acesso em: 17 abr. 2019.
- DENG, Z.; SONG, S. Sodium nitroprusside, ferricyanide, nitrite and nitrate decrease the termo-dormancy of lettuce seed germination in a nitric oxide-dependent manner in light. *South African Journal of Botany*, v. 78, n. 1, p. 139-146, 2012.
- FERNANDES, L. R. S. G; MOTA, R. S; SILVA, G, P; BENETT, C. G. S & BENETT, K. S. S. Germinação de sementes de alface em função do teor de água no substrato. IV Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG, Universidade Estadual de Goiás, Campus Ipameri, Ipameri – Goiás. 2017.
- FERRAZ, L. C. L.; VIANA, M. M. S. Ocorrência de fusariose em alface estudada em diferentes sistemas de plantio. In: Anais do VI Congresso Latino-Americano; X Congresso Brasileiro; V Seminário do DF e Entorno. Manejo de Agroecossistemas e Agricultura Orgânica, v. 13, n. 1, 2017.

- FIGUERÊDO, G. S. Controle biológico de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. e *Ulocladium atrum* e patogenicidade ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). (Dissertação) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 54p., 2005.
- FRANZIN, S.M.; MENEZES, N.L.; GARCIA, D.C. & SANTOS, O.S. Efeito da qualidade das sementes sobre a formação de mudas de alface. Horticultura Brasileira, Brasília, v.23, n.2, p.193-197, 2005.
- FUJINAGA, M.; OGOSH, H.; TUCHIYA, N.; SAITO, H.; YAMANAKA, S.; NOZNE, M. & KOJIMA, M. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. Journal of General Plant Pathology, v. 69, p. 23-28, 2003.
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G. & GULLINO, M.L. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Phytoparasitica, v. 32, p. 61-65, 2004.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; HANAUER, J. G. & WALDOW, D. A. G. Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. Revista Árvore, v. 34. n.1. p. 39-48. 2010.
- GORDON, T. R.; KOIKE, S. Management of *Fusarium* wilt of lettuce. Crop Protection, Guildford, v. 73, p. 45-43. 2015.
- HARRIS, A. R.; NELSON, S. Progress towards integrated control of damping-off disease. Biological Sciences, v. 154, p. 123-130, 1999.
- HUBBARD, J. C.; GERIK, J. S. A new wilt disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactum*. Plant Disease, v. 77, p. 750-754, 1993.
- KAGEYAMA, K.; NELSON, E. B. Differential inactivation of seed exudate stimulation of *Pythium ultimum* sporangium germination by *Enterobacter cloacae* influences biological control efficacy on different plant species. Applied and Environmental Microbiology, v. 69. n. 2, 2003.
- KIKUTI, A. L. P.; MARCOS FILHO, J. Teste de vigor em sementes de alface. Horticultura Brasileira, v. 30, p. 44-50, 2012.
- LEACH, S. S.; WEBB, R. E. Evaluation of potato cultivars, clones and a true seed population for resistance to *Rhizoctonia solani*. American Potato Journal, v. 70, n. 4, p. 317-328, 1993.
- LEWIS, J.A.; LUMSDEN, R.D. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. Crop Protection, v. 20, p. 49-56, 2001.
- LOCKWOOD, J.L. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, v. 26, p. 93-121, 1988.
- LOOKABAUGH, E.C.; IVORS, K.M., & SHEW, B.B. Mefenoxam sensitivity, aggressiveness, and identification of *Pythium* species causing root rot on floriculture crops in North Carolina. Plant Disease, v. 99, p. 1550-1558, 2015.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

- MARCOS FILHO, J; Fisiologia de semente de plantas cultivadas. Piracicaba, Fealq, 495p. ISBN 85-7133-038-7, 2005.
- MATHERON, M.E.; McCREIGHT. J. D.; TICKES, B. R. & PORCHAS, M. Effect of planting date, cultivar, and stage of plant development on incidence of fusarium wilt of lettuce in desert production fields. *Plant Disease*, v. 89, p. 565-570. 2005.
- MENDES, A. M. S.; BASTOS, A. A. & MELO, M. G. G. Padronização do teste de tetrazólio em sementes de *Parkia velutina* Benoist (Leguminosae – Mimosoideae). *Acta Amazonica*, v. 39, n. 4, p. 823-828, 2009.
- MERCIER, J.; MANKER, D. C. Biocontrol of soil-borne disease and plant growth enhancement in greenhouse soil-less mix by the volatile-producing fungus *Muscodora albus*. *Crop Protection*, v. 25, p. 355-362, 2005.
- MINAMI, K. Produção de mudas de alta qualidade. Piracicaba: Degaspari. 440P., 2010.
- NASCIMENTO, W. M.; CRODA, M.D. & LOPES, A.C.A. Produção de sementes qualidade fisiológica e identificação de genótipos de alface termotolerantes. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 34, n. 3, p. 510-517, 2012.
- NELSON, E.B. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant and Soil*, v. 129, p. 61-73. 1990.
- OGISO, H.; FUJINAGA, M.; SAITO, H.; TAKEHARA, T. & YAMANAKA, S. 2002. Physiological races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* isolated from crisphead lettuce in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, v. 68, p. 292-299, 2002.
- OLIVEIRA, M. D. L. S.; FIGUEIREDO, E. L.; LOURENÇO, L. D. F. H. & LOURENÇO, V. V. Análise microbiológica de alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.), comercializados em feiras-livres da cidade de Belém, Pará, *Higiene alimentar*, v. 20, p. 96-100, 2006.
- PACIFICO, M. G. Levantamento de doenças da alface americana em municípios do sul do estado de Minas Gerais. (Dissertação) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 64p., 2017.
- PEREIRA, R. B.; SILVA, P. P.; NASCIMENTO, W. M. & PINHEIRO, J. B. Tratamento de sementes de hortaliças. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Circular Técnica, v. 140, 2015.
- PINHEIRO, M.V.M.; MAIA, T.C.R.S.C.; LIMA, B.V. & MOTOIKE, S.Y. Propagação *in vitro* de genótipos de alface via embriogênese somática. *Ciência Rural*, v.42, n.11, p. 1947-1953, 2012.
- PINTO, Z.V.; SOUSA, A.L.O.P.; SILVA, C.P.; DUARTE, D.G.; PATRÍCIO, F.R.A.; SANTOS, A.S. & TEIXEIRA, L. D. Reação de cultivares de alface à podridão de raízes, causada por *Pythium helicoides*, em sistemas hidropônicos. *Summa Phytopathologica*, v.31. p. 96-96, 2005.
- PUNJA, Z.K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology*, v. 23, p. 97-127, 1985.

- REIS, A.; COSTA, H. & LOPES, C. A. Epidemiologia e manejo do mofo-branco em hortaliças. Empresa Brasileira de Agropecuária, Comunicado Técnico, v. 45, 2007.
- RODRIGUES, D. L.; LOPES, H. M.; SILVA, E. R. & MENEZES, B. R. S. Embebição, condicionamento fisiológico e efeito do hipoclorito de sódio na germinação de sementes de alface. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. v. 6. n. 1. p. 52. 2012.
- SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. A genetic locus and gene expression patterns associated with the priming effect on lettuce seed germination at elevated temperatures. Plant Molecular Biology, v. 73, n. 1-2, p. 105-118, 2010.
- SILVA, H. P; NEVES, J. M. G; BRADÃO JÚNIOR, D. S & COSTA, C. A. Quantidade de água do substrato na germinação e vigor de sementes de pinhão-manso. Revista Caatinga, v. 21. n. 5. p. 178-184. 2008.
- SMML Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host Database. Disponível em: <https://nt.arsgrin.gov/fungal_databases/fungus_host/new_frameFungusHostReport.cfm>. Acesso em: 30 mar. 2019.
- SOARES, P. A. M.; DAVID, A. M. S. S.; BERNARDINO, D. L. M. P.; QUINTINO, R. A.; LACERDA, J. P. N. & SILVA, F. G. Germination and vigor of lettuce seeds under different temperatures. Brazilian Journal of Agriculture, v. 92, n. 3, p. 271-280, 2017.
- TEIXEIRA, L. D.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. & KIMATI, H. Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica no Brasil. Summa Phytopathologica, v.32, n.3, p.221-226, 2006.
- THOMSON, R. J.; BURNS, R. G. Control of *Pythium ultimum* with antagonistic fungal metabolites incorporated into sugar beet seed pellet. Soil Biology and Biochemistry, v. 21, p. 745-748, 1989.
- VENTUROSOS, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; VENTUROSOS, L. A. C.; PONTIM, B. C. A. & REIS, G. F. Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. Ciência Rural, v. 45, n. 5, p. 788-793, 2015.
- WANG, H.; DAVIS, R.M. Susceptibility of selected cotton cultivars to seedling disease pathogens and benefits of chemical seed treatments. Plant Disease, v. 18, p. 1085-1088. 1997.
- WIT, P. J. G. M. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. Trends in Plant Science, v. 2, p. 452-480, 1997.
- WIT, P. J. G. M. JOOSTEN, M. H. A. J. Avirulence and resistance genes in the *Cladosporium fulvum*-tomato interaction. Current Opinion in Microbiology, v. 2, n. 4, p. 368-373, 1999.
- YANG, J.; VERMA, P. R. Screening genotypes for resistance to pre-emergence damping-off and post-emergence seedling root rot of oilseed rape and canola caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-1. Crop Protection, v. 11, p. 443-448, 1992.

CAPÍTULO 3

Avaliação de *Trichoderma* spp. quanto ao potencial de biocontrole de fungos habitantes de solo patogênicos à alface

RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial antagonístico de fungos do gênero *Trichoderma*, mantidos em coleção de culturas, contra os fungos fitopatogênicos *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, *R. solani* e *P. ultimum*. Os isolados do agente de biocontrole utilizados foram: isolados CEN01 (*T. harzianum*), CEN507 (*T. virens*), CEN512 (*T. asperellum*), CEN1433 (*T. asperelloides*), CEN1441 (*Trichoderma* sp.) e CEN1452 (*T. koningiopsis*). Também se avaliou a capacidade dos isolados de *Trichoderma* em suprimir a doença causada por *S. rolfsii* em plantas de alface, em casa de vegetação. Nos ensaios *in vitro*, foi utilizada a técnica de pareamento de culturas. Os ensaios de casa de vegetação foram conduzidos com a cultivar BRS Leila. A maioria dos isolados de *Trichoderma* testados foram superiores em crescimento micelial no pareamento com os fitopatógenos. O menor valor médio de crescimento micelial (2,2 cm) foi observado com *S. sclerotiorum* (isolado CEN1530), no confronto com *T. asperellum*. Entretanto, *R. solani* e *P. ultimum* atingiram 4,7 e 4,8 cm de crescimento micelial contra os antagonistas *T. virens* e *T. koningiopsis*, respectivamente. Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* também demonstraram baixas médias de crescimento micelial nos confrontos, apenas 3,03 e 2,71 cm. A média da inibição micelial entre antagonistas e fitopatógenos foram entre 51 – 69%. O destaque foi *T. asperellum*, o antagonista responsável pelos maiores percentuais de inibição contra todos os fitopatógenos avaliados. Os isolados de *Trichoderma* demonstraram potencial de inibição micelial acima de 50% contra todos os fitopatógenos, com exceção de *T. virens* (47%) e *T. harzianum* (49%) contra *R. solani*, e *T. harzianum* (43%) e *T. koningiopsis* (45%) contra *P. ultimum*. Os resultados preliminares obtidos em casa de vegetação no tratamento de mudas de alface com 10, 15, 20 e 25 mL da suspensão de esporos de *T. asperelloides* e *T. koningiopsis* no substrato infestado com *S. rolfsii* (CEN1531), não mostraram evidência de que alguma combinação, antagonista + dose crescente, seja de alguma forma eficaz para o controle da doença nas condições testadas. Todavia, nos tratamentos com doses de 20 e 25 mL de *T. asperelloides* contribuíram para a sobrevivência de 50% das mudas ao final de 10 dias de experimentação.

Palavras-chave: interação antagonística, pareamento de culturas, supressão de doença.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antagonistic potential of *Trichoderma* fungi, kept in a culture collection, against phytopathogenic fungi *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1, *R. solani* and *P. ultimum*. The isolates of the biocontrol agent were: CEN01 (*T. harzianum*), CEN507 (*T. virens*), CEN512 (*T. asperellum*), CEN1433 (*T. asperelloides*), CEN1441 (*Trichoderma* sp.) and CEN1452 (*T. koningiopsis*). The ability of *Trichoderma* isolates to suppress *S. rolfsii* disease in lettuce plants in a greenhouse was also evaluated. In *in vitro* assays, the dual culture technique was used. The greenhouse trials were conducted with the cultivar BRS Leila. Most *Trichoderma* isolates tested were superior in mycelial growth in pairing with phytopathogens. The lowest average value of mycelial growth (2.2 cm) was observed with *S. sclerotiorum* (CEN1530 isolate) in comparison with *T. asperellum*. However, *R. solani* and *P. ultimum* reached 4.7 and 4.8 cm of mycelial growth against *T. virens* and *T.*

koningiopsis antagonists, respectively. The isolates of *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* also showed low average mycelial growth in the confrontation, only 3.03 and 2.71 cm. The average mycelial inhibition between antagonists and phytopathogens was between 51 - 69%. The highlight was *T. asperellum*, the antagonist responsible for the highest inhibition percentages against all phytopathogens evaluated. *Trichoderma* isolates showed mycelial inhibition potential above 50% against all phytopathogens except *T. virens* (47%) and *T. harzianum* (49%) against *R. solani*, and *T. harzianum* (43%) and *T. koningiopsis* (45%) against *P. ultimum*. Preliminary results obtained in a greenhouse in the treatment of lettuce seedlings with 10, 15, 20 and 25 mL of *T. asperelloides* and *T. koningiopsis* spore suspension in the *S. rolfsii* (CEN1531) infested substrate, showed no evidence of that some combination, antagonist + increasing dose, is in any way effective for disease control under the conditions tested. However, treatments with doses of 20 and 25 mL of *T. asperelloides* contributed to the survival of 50% of the seedlings after 10 days of experimentation.

Key words: antagonistic interaction, dual culture, disease suppression.

3.1. INTRODUÇÃO

Fungos fitopatogênicos habitantes do solo ocasionam perdas consideráveis na agricultura, em todo o mundo (Katan, 2017; Bastakoti *et al.*, 2017). No Brasil, a cultura da alface também é afetada. As estratégias de controle das doenças causadas por esses fungos são limitadas, devido à amplitude de hospedeiro da maioria desses patógenos e à alta taxa de sobrevivência a condições ambientais variadas, por meio das suas estruturas de sobrevivência (esclerócios, clamidósporos e oósporos). Ainda, repetidas aplicações de fungicidas podem favorecer populações de microrganismos resistentes, ou daqueles capazes de rapidamente degradarem xenobióticos no solo, reduzindo a eficiência de tais produtos. Outro aspecto importante a ser considerado é que a alface é consumida fresca e seu ciclo curto, de 30-40 dias após o transplântio das mudas, aumenta a possibilidade de contaminação, com resíduos de agroquímicos, pelo produto levado à mesa do consumidor (Pinto *et al.*, 2014).

Fungos antagonistas têm sido usados para controlar doenças de plantas, sendo que 90% das aplicações desses agentes são realizadas com isolados de diferentes espécies de *Trichoderma* (Kumar *et al.*, 2017). Os mecanismos pelos quais *Trichoderma* spp. atuam diretamente contra fungos fitopatogênicos são, por exemplo, antibiose, micoparasitismo e competição; indiretamente, esses agentes de biocontrole atuam por estimulação do crescimento de plantas e indução de resistência de plantas a doenças. Tais mecanismos estão amplamente descritos na literatura (Benitez *et al.*, 2004; Harman, 2011).

Trichoderma é a designação de um gênero (informal) de fungos anamorfos, cujos teleomorfos associados são classificados taxonomicamente como pertencentes ao gênero *Hypocrea*, no filo Ascomycota. Estes fungos estão presentes nos diversos tipos de solos, sendo capazes de estabelecer relações benéficas com as plantas (Nieto-Jacobo *et al.*,

2017) e, por isso, vem ganhando importância na agricultura, especialmente como agentes de controle biológico.

Embora fungos do gênero *Trichoderma* sejam também usados contra patógenos foliares, os casos de sucesso mais frequentemente apontados na literatura estão relacionados ao uso desses antagonistas contra fungos fitopatogênicos de solo (Srivastava *et al.*, 2015), entre os quais, vários patógenos de alface, a exemplo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* Matuo & Motohashi, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e *Pythium ultimum* (Trow). Esses fungos fitopatogênicos causam doenças caracterizadas como *damping-off*, murchas vasculares, podridões de raízes, queima da saia e mofo-branco da alface (Bedendo, 1995; 2018).

A prospecção de antagonistas conduzida *in vitro*, embora não ofereça resultados conclusivos para seleção de agentes de biocontrole, serve para indicação de isolados com potencial no desenvolvimento de formulações de biofungicidas, ou de fontes de genes (Auler *et al.*, 2013), para transformação e seleção de linhagens transgênicas com fenótipos valiosos. Pareamento de culturas é uma técnica de confronto direto, eficaz e rápida para reconhecimento de antagonistas *in vitro*, por isso, é amplamente utilizada em prospecção de microrganismos potenciais agentes de controle biológico. Esta técnica foi introduzida por Weindling (1932, 1934), que foi o primeiro a relatar o parasitismo exercido por *Trichoderma* spp. contra um fitopatógeno.

Portanto, o objetivo deste estudo foi testar isolados de *Trichoderma* quanto à capacidade de inibir o crescimento micelial dos fungos *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, *R. solani* e *P. ultimum*, patogênicos a alface, por meio do pareamento de culturas.

Isolados que apresentaram potencial na inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii* foram também submetidos a testes *in vivo*, para avaliação quanto à habilidade em suprimir a podridão de raízes causada por esse fungo em mudas de alface.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Local de realização dos ensaios

Os ensaios *in vitro* e em casa de vegetação foram conduzidos Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília – DF.

3.2.2. Isolados de *Trichoderma* utilizados

Seis isolados de *Trichoderma* representantes de diferentes espécies (Tabela 6) foram estudados quanto à sua diversidade no potencial de inibição micelial contra fitopatógenos de solo como: *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, *P. utimum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, *in vitro*. Cinco dos seis isolados de *Trichoderma* foram previamente identificados em nível de espécie (dados não publicados), por outros membros da equipe do Laboratório de Fitopatologia do Prédio de Controle Biológico – PCB.

Tabela 6. Origem dos isolados de *Trichoderma* com origem, hospedeira/substrato e ano de isolamento.

Espécie/Isolado	Município de origem	Hospedeiro/ Substrato	Ano de isolamento
<i>T. harzianum</i> (CEN01)	Ilhéus (BA)	<i>M. pernicioso</i>	1997
<i>T. virens</i> (CEN507)	Petrolina (PE)	Goiabeiras/Solo	2007
<i>T. asperellum</i> (CEN512)	Petrolina (PE)	Goiabeiras/Solo	2007
<i>T. asperelloides</i> (CEN1433)*	Brasília (DF)	Berinjela/Solo	2013
<i>Trichoderma</i> sp. (CEN1441)	Brasília (DF)	Rubiáceas/Solo	2013
<i>T. koningiopsis</i> (CEN1452)*	Brasília (DF)	Rubiáceas/Solo	2013

* Testados contra *S. rolfsii* (CEN1531) em condições de casa de vegetação.

Os isolados destas espécies de *Trichoderma* trabalhados foram escolhidos porque existem diversos relatos na literatura, citando-as como agentes de biocontrole de fitopatógenos em trabalhos de várias partes do mundo. Já os fungos fitopatogênicos foram escolhidos dentre os gêneros considerados polífagos (*S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* e *R. solani*) e duas espécies comumente relatadas como sendo específicas para a cultura da alface (*F. oxysporum* f. sp. *lactucae* e *P. ultimum*), capazes de danos expressíveis na cultura. Patógenos e antagonistas estão depositados na Coleção de Microrganismos para o Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF.

3.2.3. Testes de pareamento de culturas

Os isolados foram reativados em placas de Petri utilizando o meio BDA (Merk KGaA[®]). Após esse procedimento as culturas foram acondicionadas em estufa incubadora BOD (Nova Técnica[®]) a 26 °C com fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias.

O potencial antagonico dos seis isolados contra os fungos fitopatogênicos foi estudado utilizando o método de pareamento de culturas conforme descrito por Dennis & Webster (1971b). Discos de micélio de cinco milímetro de diâmetro foram retirados da região de crescimento de colônias crescidas em BDA (Merk KGaA[®]), desenvolvidas nas condições descritas no capítulo anterior. Os discos contendo patógeno e antagonistas foram depositados opostamente na superfície do meio (BDA) e as placas foram mantidas em estufa incubadora BOD (Nova Técnica[®]) nas mesmas condições descritas acima. Após 10 dias de cultivo, tomaram-se as medidas do diâmetro das colônias, com o auxílio de paquímetro digital (Digimex[®]). O tratamento testemunha consistiu de placas sem o disco de micélio do antagonista.

A partir dos dados do diâmetro das colônias (cm) obtidos nas leituras após 10 dias de cultivo, calcularam-se os valores médios de percentagem de inibição (%) do crescimento micelial, conforme Menten *et al.* (1976), utilizando a fórmula: % inibição = [(ctest – ctrat) /ctest] x 100, em que ctest = crescimento da testemunha; e ctrat = crescimento do tratamento. Contudo, neste trabalho serão considerados os isolados de *Trichoderma* eficientes, somente aqueles que inibirem acima de 50% os fitopatógenos testados no pareamento de culturas.

3.2.4. Avaliação de *Trichoderma* spp. na supressão da podridão de raízes de alface em casa de vegetação

Os isolados *T. asperelloides* e *T. koningiopsis* foram escolhidos devido aos seus desempenhos nos confrontos diretos contra ambos isolados de *S. rolfsii* e também por se tratarem de isolados que ainda não foram estudados no biocontrole de fitopatógenos, pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação (temperatura variando entre 20 °C e 40 °C, umidade entre 70% e 80 %), com os isolados *T. asperelloides* - CEN1433 e *T. koningiopsis* - CEN1452, contra o isolado *S. rolfsii* - CEN1531. Os isolados do antagonista foram cultivados em placas de Petri, contendo o meio BDA (Merk KGaA[®]), nas condições supracitadas. As suspensões de esporos foram preparadas por raspagem e lavagem da superfície do meio colonizado, em água destilada e a concentração de inóculo, ajustada para 1,5 x 10⁷ conídios/mL (Adaptado de Bettiol *et al.*, 2013). Já o isolado do patógeno (*S. rolfsii* - CEN1531) foi multiplicado em arroz parboilizado, como descrito a seguir: para 100 g de grãos de arroz, depositados em sacos de polietileno com 500 g de capacidade, foram adicionados 60 mL de água destilada. O material foi autoclavado (120° C/20 minutos) e, após resfriamento, recebeu 10 discos de micélio do patógeno, obtidos de colônias crescidas a 26 °C durante sete dias (Falcão *et al.*, 2005).

A cultivar BRS Leila foi escolhida por demonstrar os melhores desempenhos no capítulo anterior. Sementes desta cultivar foram desinfestadas como descrito no Capítulo 2 e semeadas em células de sementeira de isopor, em casa de vegetação. Aos 30 dias de idade, as mudas foram retiradas da sementeira e tiveram as raízes nuas submersas na suspensão de esporos de *Trichoderma*, sendo a seguir, transplantadas para vasos de 1 L de capacidade, contendo solo. Após o transplante, o inóculo do patógeno foi depositado junto ao colo das mudas, à base de 1 g de grão de arroz colonizado por *S. rolfsii*. Logo após este procedimento, as suspensões dos antagonistas de cada tratamento (10 mL, 15 mL, 20 mL e 25 mL) foram utilizadas para regar o solo. Os tratamentos foram: controle – Testemunha absoluta (água destilada); (T1) *T. asperelloides* – CEN1433-10mL; (T2) *T.koningsiopsis* – CEN1452-10mL; (T3) *S. rolfsii* – CEN1531; (T4) *T. koningsiopsis* - CEN1452-10mL + *S. rolfsii* – CEN1531; (T5) *T. koningsiopsis* - CEN1452-15mL + *S. rolfsii* – CEN1531; (T6) *T. koningsiopsis* - CEN1452-20mL + *S. rolfsii* – CEN1531; (T7) *T. koningsiopsis* - CEN1452-25mL + *S. rolfsii* – CEN1531; (T8) *T. asperelloides* - CEN1433-10mL + *S. rolfsii* – CEN1531; (T9) *T. asperelloides* - CEN1433-15mL + *S. rolfsii* – CEN1531; (T10) *T. asperelloides* - CEN1433-20mL + *S. rolfsii* – CEN1531; (T11) *T. asperelloides* - CEN1433-25mL + *S. rolfsii* – CEN1531.

Este experimento foi montado a fim de observar a capacidade dos antagonistas em controlar a doença em casa de vegetação, com a aplicação de quatro doses diferentes no substrato recém-infestado pelo fitopatógeno escolhido. A avaliação foi feita após 10 dias da instalação do experimento, considerando a sobrevivência das plantas de alface tratadas com as diferentes doses da suspensão dos isolados antagonistas.

3.2.5. Delineamento experimental e análise dos dados

Para o pareamento de culturas, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (D.I.C), composto por 48 tratamentos e três repetições, em esquema fatorial 6 x 8 (seis isolados de *Trichoderma* e oito isolados dos patógenos). O experimento foi conduzido quatro vezes. Os dados para a análise do crescimento micelial dos fitopatógenos foram analisados pelo modelo não-paramétrico Scheirer-Ray-Hare, seguido do pós-teste de comparação Dunn com ajuste dos *p*-valores pelo método Benjamini-Hochberg. Nas análises do cálculo da inibição micelial dos patógenos por *Trichoderma* spp., elegeu-se o modelo de Regressão Beta e as comparações múltiplas com ajuste de *p*-valor pelo teste Tukey no Software R (Burnham & Anderson, 2002).

Devido a quantidade de mudas de alface disponíveis, nos ensaios de casa de vegetação, adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (D.I.C), composto por nove tratamentos, com seis repetições, em esquema fatorial 2 x 4 (duas espécies de *Trichoderma* e quatro doses das suspensões de conídios dos antagonistas). Para a análise estatística neste ensaio, utilizou-se o modelo GLM de família binomial, popularmente conhecido por modelo de regressão logística, no Software R (Burnham & Anderson, 2002).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Teste de pareamento de culturas

. Os isolados de *Trichoderma* testados colonizaram rapidamente o meio e a maioria foram superiores em crescimento micelial no pareamento com os fitopatógenos. O menor valor médio de crescimento micelial (2,2 cm) foi observado com *S. sclerotiorum* (isolado CEN1530), no confronto com *T. asperellum*. Entretanto, *R. solani* e *P. ultimum* atingiram 4,7 e 4,8 cm de crescimento micelial, em confronto com os antagonistas *T. virens* e *T. koningiopsis*, respectivamente. Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* também

apresentaram baixos valores médios de crescimento micelial nos confrontos, de 3,03 e 2,71 cm, respectivamente (Tabela 7).

O crescimento micelial de *S. sclerotiorum* - CEN1147, *S. rolfsii* - CEN216 e *R. solani* - RHI23 não mostrou variação com relação às diferentes espécies de *Trichoderma* testadas. Os valores médios das medidas do diâmetro de colônias desses patógenos foram de 3,95; 3,66 e 4,31 cm, respectivamente. Na maioria dos tratamentos, observou-se interação de efeito patógeno versus isolado/espécie de *Trichoderma*, como observado na Tabela 7.

Os menores valores médios de crescimento micelial (2,2 cm), como foram verificados com *S. sclerotiorum* - CEN1530, no confronto com *T. asperellum*. Este tratamento diferiu significativamente do observado nos confrontos do mesmo patógeno com *Trichoderma* sp. e *T. harzianum*. Outros patógenos também bastante afetados pelo isolado de *T. asperellum* foram *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* FOLac raça 1- 206 e 240 (2,5 e 2,3 cm), respectivamente; *S. rolfsii* - CEN1531 (2,6 cm) e *P. ultimum* - PYT555 (2,4 cm). O patógeno *R. solani* foi o menos afetado no confronto com os isolados de *Trichoderma* testados, com valores médios do crescimento micelial variando entre 4,0 e 4,7 cm. A maior variação dos valores médios frente aos isolados de *Trichoderma*, foi observada com *P. ultimum*, cuja inibição do crescimento micelial foi maior com o isolado *T. asperellum* e menor com *T. harzianum*.

Estes resultados baseados na comparação entre os *p*-valores contrastando espécie com espécie, demonstram variação do desempenho dos isolados de *Trichoderma* spp. em relação aos diferentes isolados dos fungos fitopatogênicos. Cabe destacar que, de acordo com a Tabela 7, isolados da mesma espécie (*S. sclerotiorum* CEN1147 e CEN1530; *S. rolfsii* CEN216 e CEN1531; *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* FOLac raça 1 - 206 e FOLac raça 1 - 240) foram diferentemente afetados pelos agentes de biocontrole, o que caracteriza a intraespecificidade.

Tabela 7. Crescimento micelial (cm) dos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum* em confronto direto com *Trichoderma* spp., utilizando o método de pareamento de culturas, após 10 dias de cultivo.

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Patógeno(cm) ⁽¹⁾							
	<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1147)	<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1530)	<i>S. rolfsii</i> (CEN216)	<i>S. rolfsii</i> (CEN1531)	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. lactucae</i> raça 1 (FOLac - 206)	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. lactucae</i> raça 1 (FOLac - 240)	<i>R. solani</i> (RHI23)	<i>P. ultimum</i> (PYT555)
<i>T. harzianum</i> (CEN01)	3.5±1.00a	4.2±0.55ab	3.9±1.05a	3.6±0.81ab	3.2±0.42ab	2.6±0.40ab	4.5±0.23a	5.1±0.94ab
<i>T. virens</i> (CEN507)	3.9±0.68a	3.2±0.90acd	3.2±0.64a	2.8±1.34ab	3.1±0.14ab	2.7±0.20ab	4.7±0.26a	3.8±1.74ac
<i>T. asperellum</i> (CEN512)	4.1±0.66a	2.2±1.10c	3.5±0.48a	2.6±0.53a	2.5±0.54ab	2.3±0.25a	4.2±0.64a	2.4±2.07c
<i>T. asperelloides</i> (CEN1433)	3.7±1.21a	3.1±0.60cd	3.9±0.63a	3.2±0.62ab	3.2±0.51ab	2.6±0.33ab	4.4±0.27a	4.0±1.26abc
<i>Trichoderma</i> sp. (CEN1441)	4.1±0.69a	4.4±0.38b	4.0±0.32a	3.8±0.67b	3.7±1.19a	3.7±1.39b	4.0±0.20a	3.9±0.75abc
<i>T. koningiopsis</i> (CEN1452)	4.4±0.52a	3.8±0.41abd	3.5±0.41a	2.8±0.66ab	2.5±0.26b	2.4±0.37a	4.1±0.18a	4.8±0.50b
Testemunha	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
Média geral	3,95	3,48	3,66	3,13	3,03	2,71	4,31	4,0

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra minúsculas entre colunas não diferem entre si pelo teste Dunn.

Os isolados do mesmo patógeno foram analisados formando grupos, a fim de se conhecer o potencial dos dois isolados agrupados. Ao considerar três grupos (por espécie de patógeno), ao invés de seis, CEN1147 e CEN1530 formam o grupo *S. sclerotiorum*; CEN216 e CEN1531 formam o grupo *S. rolfsii* e FOLac raça 1 - 206 e FOLac raça 1 - 240 formam o grupo *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (Tabela 8). Pela análise dos dados de crescimento micelial nos agrupamentos, destacam-se as diferenças por espécies de patógeno e isolado dos agentes de biocontrole, como foi comentado anteriormente. Nesta análise (Tabela 8) fica evidenciada a variação do efeito de isolados/espécies de *Trichoderma* frente às espécies dos fungos fitopatogênicos. Claramente, o patógeno mais afetado nos confrontos com *Trichoderma* spp., foi *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*. Em contrapartida, o isolado do antagonista que menos afetou o crescimento micelial dos patógenos, foi *Trichoderma* sp. (CEN1441).

Tabela 8. Crescimento micelial (cm) por espécie de fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Fusarium oxysporum*, obtido no pareamento com *Trichoderma* após 10 dias de cultivo.

Grupo/Patógeno (cm) ⁽¹⁾			
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>T. harzianum</i> (CEN01)	3,88±0,85ab	3,78±0,92ab	2,92±0,49b
<i>T. virens</i> (CEN507)	3,58±0,87ab	3,05±1,04c	2,95±0,29b
<i>T. asperellum</i> ; (CEN512)	3,19±1,32b	3,08±0,70c	2,47±0,42b
<i>T. asperelloides</i> (CEN1433)	3,42±0,98b	3,62±0,71abc	2,91±0,51b
<i>Trichoderma</i> sp. (CEN1441)	4,27±0,56a	3,92±0,52a	3,74±1,26a
<i>T. koningiopsis</i> (CEN1452)	4,12±0,53a	3,17±0,66bc	2,48±0,31b
Testemunha	9,0	9,0	9,0
Média	3,74	3,43	2,91

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si estatisticamente pelo teste Dunn.

As médias da inibição micelial entre antagonistas e fitopatógenos foram entre 51 - 69%. O destaque foi *T. asperellum*, o antagonista responsável pelos maiores percentuais de inibição contra todos os fitopatógenos avaliados. Os isolados de *Trichoderma* mostraram potencial de inibição micelial acima de 50% contra todos os fitopatógenos, à exceção de *T. virens* (47%) e *T. harzianum* (49%) contra *R. solani*, e *T. harzianum* (43%) e *T. koningiopsis* (45%), contra *P. ultimum* (Tabela 9).

Os resultados obtidos na avaliação da inibição de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* - CEN1147 e CEN1530, *S. rolfsii* - CEN216 e CEN1531, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* FOLac-raça 1-206 e 240, *R. solani* - RHI23 e *P. ultimum* - PYT555, ao final de 10 dias de incubação, encontram-se na Tabela 9. Considerando as distintas espécies de *Trichoderma*, estas não diferiram significativamente na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* - CEN1147, *S. rolfsii* - CEN216 e CEN1531 e *P. ultimum* - PYT555, estes com médias de percentagens inibitórias de 55, 58, 64,5 e 52%, respectivamente. Nos confrontos com *S. sclerotiorum*, o antagonista *T. asperellum* apresentou maior inibição do crescimento micelial (76%). Este antagonista foi responsável pelos maiores valores dos percentuais de inibição nos confrontos com *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* isolados FOLac raça 1 - 206 e FOLac raça 1 - 240 (71 e 73%), juntamente com o isolado *T. koningiopsis* (71 e 73%), respectivamente. Nos ensaios com *R. solani* – RHI23, o antagonista *Trichoderma* sp. foi o responsável pelo maior valor de inibição de crescimento micelial do patógeno (54%).

Tabela 9. Inibição do crescimento micelial (%) de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum* por espécies *Trichoderma* ao final de 10 dias de cultivo.

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Inibição micelial dos patógenos(%) ⁽¹⁾							
	<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1147)	<i>S. sclerotiorum</i> (CEN1530)	<i>S. rolfsii</i> (CEN216)	<i>S. rolfsii</i> (CEN1531)	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. lactucae</i> raça 1 (FOLac - 206)	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. lactucae</i> raça 1 (FOLac - 240)	<i>R. solani</i> (RHI23)	<i>P. ultimum</i> (PYT555)
<i>T. harzianum</i> (CEN01)	60±0.11a	53±0.06d	56±0.11a	59±0.09a	64±0.04bc	70±0.04a	49±0.02bc	43±0.10a
<i>T. virens</i> (CEN507)	55±0.07a	64±0.10bc	63±0.07a	69±0.14a	64±0.01bc	69±0.02a	47±0.02c	57±0.19a
<i>T. asperellum</i> (CEN512)	53±0.07a	76±0.12a	60±0.05a	70±0.05a	71±0.06ab	73±0.02a	53±0.07ab	56±0.10a
<i>T. asperelloides</i> (CEN1433)	58±0.13a	65±0.06b	55±0.07a	63±0.06a	64±0.05bc	70±0.03a	50±0.03abc	55±0.14a
<i>Trichoderma</i> sp. (CEN1441)	53±0.77a	51±0.04d	54±0.03a	57±0.07a	58±0.13c	59±0.15b	54±0.02a	56±0.08a
<i>T. koningiopsis</i> (CEN1452)	51±0.05a	57±0.04cd	60±0.04a	69±0.07a	71±0.02a	73±0.04a	53±0.02ab	45±0.05a
Média geral	55	61	58	64,5	65,3	69	51	52

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si estatisticamente pelo teste Tukey 5%.

Além da redução do crescimento micelial dos fitopatógenos, a Figura 2 mostra a colonização de *Trichoderma* spp. em meio BDA, em confronto com os fitopatógenos, onde se pode destacar que alguns isolados/espécies de *Trichoderma* apresentaram padrões de crescimento variado quanto ao aspecto das colônias. Por exemplo, anéis de esporulação foram mais marcantes quando em confronto com *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, ambos os isolados (FOLac raça 1 – 206 e FOLac raça 1 – 240), na presença de *T. harzianum* (CEN01). Em confronto com *P. ultimum* – PYT555, os anéis de conidiação foram menos evidentes, verificando-se a sobreposição do antagonista sobre o fitopatógeno. Anéis de conidiação foram também pronunciados nas colônias *T. harzianum* em confronto com *S. sclerotiorum* – CEN1530. Neste caso, o agente de biocontrole colonizou mais da metade da placa. Já com o isolado CEN1147 de *S. sclerotiorum*, o fungo *T. harzianum* colonizou metade da placa, havendo sobreposição das colônias. O isolado da espécie *T. harzianum* também mostrou ser forte competidor frente a *S. rolfsii* (ambos os isolados) e anéis de conidiação foram formados. O patógeno *R. solani* – RHI23 colonizou mais da metade da placa, porém, sem sobrepor a colônia do antagonista.

O antagonista *T. virens* (CEN507) não apresentou as mesmas características do antagonista anterior, com relação ao padrão de crescimento e formação de anéis de conidiação. Todavia, foi um forte competidor, sobrepondo os isolados *S. sclerotiorum* – CEN1530 e *P. ultimum* – PYT555. Entretanto, o isolado *R. solani* – RHI23 colonizou metade da placa na presença deste antagonista. O antagonista *T. asperellum* (CEN512) apresentou esporulação com aspecto flocoso e formação de anéis de conidiação marcantes em todos os confrontos. Apenas os isolados *S. sclerotiorum* – CEN1147 e *R. solani* – RHI23 foram capazes de colonizar boa parte do meio (Figura 2).

As colônias de *T. asperelloides* (CEN1433) também apresentaram a esporulação com aspecto flocoso, micélio aéreo em todos os confrontos e sobreposição das colônias dos

patógenos *S. sclerotiorum* – CEN1530 e *P. ultimum* – PYT555. Este antagonista foi capaz de inibir o crescimento micelial das colônias dos isolados de *S. rolfsii* (CEN216 e CEN1531) e *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac raça 1 – 206 e FOLac raça 1 – 240), com formação de poucos escleródios no disco de inoculação (*S. rolfsii*). No pareamento com *R. solani* - RHI23 a competição foi maior, porém ao final de 10 dias de inoculação, *T. asperelloides* já havia iniciado seu crescimento sobre a colônia deste patógeno. O isolado *Trichoderma* sp. (CEN1441) apresentou esporulação verde claro e foi competidor no meio, com exceção nos pareamentos com *S. rolfsii* (CEN216 e CEN1531) e *R. solani* (RHI23); observou-se uma forte descoloração do meio BDA, indicando a presença de metabólitos secretados pelo fungo. O antagonista *T. koningiopsis* (CEN1452) apresentou esporulação verde escura e sobrepôs quase todos os fitopatógenos, à exceção dos isolados de *S. rolfsii* (Figura 2).

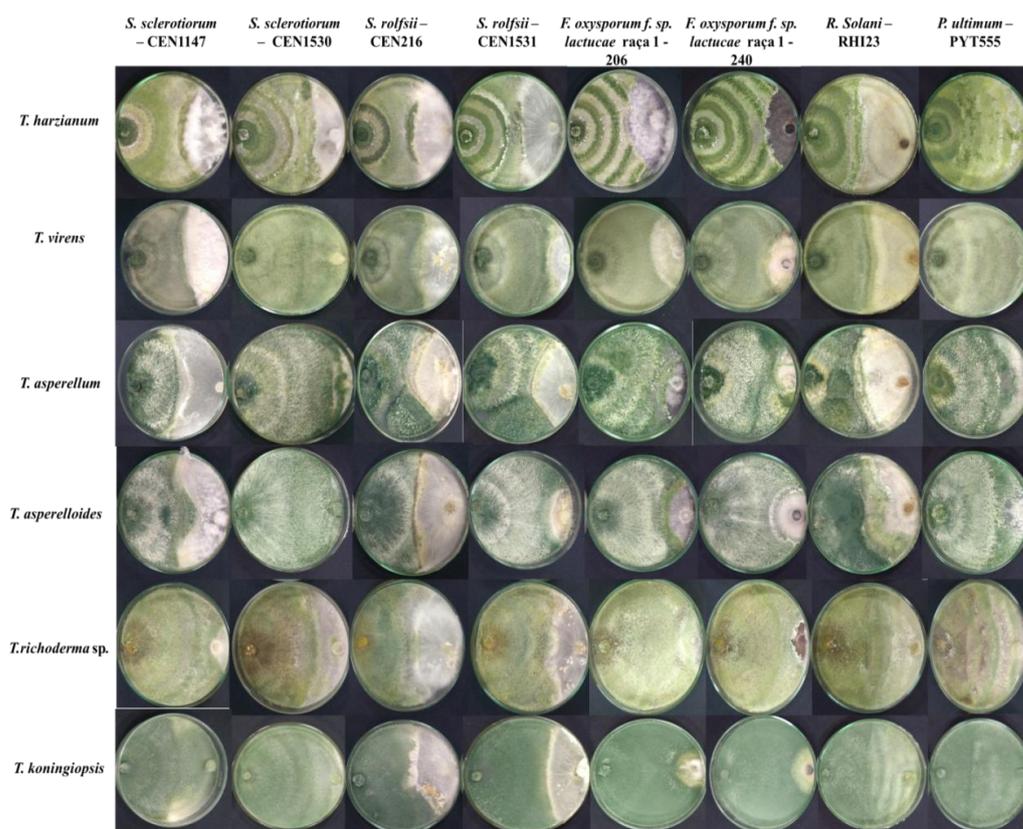


Figura 2. Pareamento de culturas de *Trichoderma* spp. com fungos fitopatogênicos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*) em BDA.

3.3.2. Supressão da murcha-de-esclerócio (*S. rolfsii*) por *T. asperelloides* e *T. koningiopsis* em casa de vegetação

Após 48 horas da aplicação das doses do antagonistas em cada tratamento e do fitopatógeno ao mesmo tempo, as mudas infectadas já apresentaram sintomas de murcha e vasos escurecidos pela infecção do fungo. Não houve controle inicial da doença em casa de vegetação, após 10 dias da instalação deste experimento preliminar, fato comprovado pela não detecção de diferença significativa entre os tratamentos, nas análises dos dados obtidos (Tabela 14). Observou-se que 100% das plantas sobreviveram nos tratamentos sem inoculação do fitopatógeno *S. rolfsii*, isolado CEN1531. Em relação à ocorrência de plantas doentes ou mortas ao final do experimento, apenas no tratamento com *T. koningiopsis* (CEN1452), na dose de 15mL da suspensão do antagonista mais o patógeno (CEN1531), a mortalidade de plantas foi de 100%. Nas doses de 25 mL de *T. koningiopsis*, 10 mL de *T. asperelloides* (CEN1433) e 15 mL de *T. asperelloides* mais o patógeno, os índices de mortalidade de plantas foram de 84%, não diferindo da testemunha só com o patógeno (*S. rolfsii*). Entretanto, nas doses de 20 e 25 mL de *T. asperelloides* mais o patógeno, verificaram-se 50% de plantas mortas e, conseqüentemente, 50% de plantas sobreviventes e sadias aos tratamentos.

Tabela 10. Sobrevivência de plantas de alface (cultivar BRS Leila) tratadas com 10, 15, 20 e 25 mL das suspensões de *Trichoderma asperelloides* (CEN1433) e *Trichoderma koningiopsis* (CEN1452) na concentração de $1,5 \times 10^7$ / conídios por mL e incidência da murcha-de-esclerócios nas plantas em substrato infestado com *Sclerotium rolfsii* isolado CEN1531, após 10 dias de instalação do experimento.

Tratamento	Sobrevivência das mudas (%)	Incidência da murcha de esclerócios (%)
Controle – Testemunha absoluta	100	0
<i>T. asperelloides</i> – CEN1433 - 10mL	100	0
<i>T.koningiopsis</i> – CEN1452 - 10mL	100	0
<i>S. rolfsii</i> – CEN1531	16	84
<i>T.koningiopsis</i> -10mL + <i>S. rolfsii</i>	33	67
<i>T.koningiopsis</i> - 15mL + <i>S. rolfsii</i>	0	100
<i>T.koningiopsis</i> - 20mL + <i>S. rolfsii</i>	33	67
<i>T.koningiopsis</i> - 25mL + <i>S. rolfsii</i>	16	84
<i>T. asperelloides</i> - 10mL + <i>S. rolfsii</i>	16	84
<i>T. asperelloides</i> - 15mL + <i>S. rolfsii</i>	16	84
<i>T. asperelloides</i> - 20mL + <i>S. rolfsii</i>	50	50
<i>T. asperelloides</i> - 25mL + <i>S. rolfsii</i>	50	50

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Teste de pareamento de culturas

De acordo com Askew & Laing (1993), são necessários métodos confiáveis para avaliação do potencial antagônico de agentes de biocontrole contra fitopatógenos. A técnica de pareamento de culturas foi introduzida por Weidling (1934) e, após uma série de publicações de Dennis & Webster (1971a; b; c) sobre antagonismo *in vitro*, passou a ser amplamente utilizada em *screening* de isolados de *Trichoderma*. O potencial de biocontrole

deste fungo vem sendo bastante documentado na literatura ao longo dos anos (Weidling, 1932, 1934; Dennis & Webster, 1971b; Papavizas, 1985; Chet, 1987; Harman & Taylor, 1990; Melo & Azevedo, 2000; Mello *et al.*, 2007; Harman, 2011). Este trabalho representa mais uma contribuição às informações existentes na literatura na utilização da técnica de pareamento de culturas. A maioria das espécies de *Trichoderma* estudadas foram superiores aos fitopatógenos de solo em crescimento e inibição micelial, com valores médios de 2,71 a 4,31 cm e 51 a 69%, respectivamente.

As espécies *T. asperellum* e *T. koningiopsis* apresentaram os melhores resultados frente aos fitopatógenos. Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram relatados por Isaias *et al.* (2014) e Marques *et al.* (2016) utilizando esta mesma técnica com outros isolados de *Trichoderma* da Coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Segundo esses autores, a inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* ocorreu de forma eficiente, com o uso das espécies *T. asperellum*, *T. koningiopsis* e *T. harzianum*, atingindo respectivamente, valores de inibição de 25 – 75%, 25 – 50% e 25 – 100% contra *S. rolfsii* (Isaias *et al.*, 2014) e 52 – 63%, 54 – 77% e 36 - 69% (Marques *et al.*, 2016). Já Matroudi *et al.* (2009) obtiveram valores de 70 – 93% de inibição micelial de *S. sclerotiorum* no pareamento de culturas com *T. atroviride* e *T. harzianum*. Lopes *et al.* (2012) também utilizaram isolados de *T. asperellum*, alcançando valores de inibição de 50%, com este mesmo patógeno. Sumida *et al.* (2018) também obteve excelentes resultados no pareamento de culturas com dois isolados de *T. asperelloides* contra *S. sclerotiorum*, com valores de 75-100% de inibição crescimento micelial.

Outra espécie utilizada nos ensaios de pareamento de cultura foi *T. virens*. Essa espécie já foi relatada sendo efetiva contra *S. sclerotiorum*, *P. ultimum* e *R. solani*. (Huang *et al.*, 2000; Lumsden & Locke, 1989). Esta afirmação está em conformidade ao demonstrado neste trabalho com os patógenos *S. rolfsii* (63 e 69%), para os dois isolados respectivamente e para

P. ultimum (57%). Entretanto, para o patógeno *R. solani*, a espécie *T. virens* não foi tão efetiva na inibição do crescimento micelial (47%), sendo a espécie com o menor desempenho. Já com o isolado *T. asperellum* a inibição do crescimento micelial de *R. solani* foi de 53%. Pinheiro *et al.* (2017) e Sousa *et al.* (2017) também demonstraram resultados inferiores a 50% de inibição do crescimento micelial de *R. solani*, utilizando isolados de *T. asperellum* e outras espécies deste agente de biocontrole.

Os resultados demonstrados neste trabalho, no pareamento dos isolados de *Trichoderma* spp. com o patógeno *P. ultimum*, variaram entre 43 – 57% de inibição. A variação nos valores de inibição do crescimento micelial de *P. ultimum* foi também verificada por Kerkeni *et al.* (2007), entre 33 – 66%, em pareamento com *T. viride*. Segundo Harman *et al.* (2004), esta variação no antagonismo de fungos do gênero *Trichoderma*, acontece pela sua capacidade de sobrevivência e proliferação, que envolve diferentes mecanismos de ação contra seus competidores.

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados neste estudo, foram superiores em crescimento e inibição micelial no pareamento com o patógeno *S. rolfsii*. Este fenômeno ocorre devido às espécies deste gênero serem fortes colonizadoras em seus habitats, seja pela utilização eficiente do substrato, como também pela capacidade de secreção de metabólitos (Schuster & Schmoll, 2010), porém, estes resultados podem variar. De acordo com Auler *et al.* (2013), isolados de *Trichoderma* testados contra *S. rolfsii* demonstraram potencial de inibição inferior a 66% no pareamento de culturas, enquanto Pacheco *et al.* (2016) alcançaram até 65% de inibição micelial de *S. rolfsii*, utilizando *T. harzianum* e *T. asperellum*.

Na realidade, os mecanismos empregados pelos agentes de biocontrole são muito complexos e dependentes do tipo de agente de biocontrole, do patógeno e ainda da planta hospedeira envolvida na interação (Howell, 2003). Os patógenos menos competitivos, no presente estudo, foram os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*. As espécies *T. asperellum*,

T. asperelloides e *T. koningiopsis* inibiram o crescimento micelial destes isolados em mais de 70%. Milanesi *et al.* (2013) observaram crescimento médio micelial de *F. oxysporum* em torno de 3,5 – 4,8 cm no pareamento com isolados de *T. koningiopsis* e *T. asperellum*. Hoffmann *et al.* (2015) relataram valores de 38 – 94% de inibição de *Fusarium* sp. utilizando 15 isolados de diferentes espécies de *Trichoderma*. Contudo, estudos com isolados de *T. harzianum* visando ao controle de *F. oxysporum*, demonstraram inibição do crescimento micelial de 77,99%, quando o antagonista foi introduzido dois dias antes do patógeno e de 45,69%, quando patógeno e antagonista foram introduzidos ao mesmo tempo, em placas de Petri (Nwankiti & Gwa, 2018). Resultados divergentes foram encontrados por Ferreira de Sá *et al.* (2019), segundo estes autores, isolados de *Fusarium* sp. foram capazes de atingir valores de crescimentos micelial de até 5,6 cm no pareamento com isolados de *Trichoderma*.

Pela técnica do pareamento de culturas, demonstra-se, portanto, a capacidade do fungo antagonista em parasitar o fungo fitopatogênico, por meio da interação denominada micoparasitismo (Mishra *et al.*, 2004; Viterbo *et al.*, 2002), a qual pode ser observada através de exames da região de confronto, utilizando microscopia ótica ou de varredura. O micoparasitismo de *Trichoderma* spp. envolve a detecção, reconhecimento, adesão ou enrolamento em torno da hifa do patógeno e a lise, rompimento consequente da ação das hifas do antagonista sobre o fungo parasitado (Mukherjee, 2011). As colônias dos antagonistas envolvidos podem sofrer alguma alteração macro e microscópicas. Brito *et al.* (2010) verificaram que as colônias de *T. asperellum* apresentaram anéis de conidiação nos confrontos com *S. sclerotiorum*. Montero-Barrientos *et al.* (2011) realizaram ensaios de pareamentos de cultura com *T. harzianum* contra *R. solani* e *P. ultimum* e constataram uma sobreposição do antagonista sobre o patógeno *P. ultimum* e a formação de anéis de conidiação no pareamento com *R. solani*.

Os percentuais de inibição do crescimento micelial dos patógenos através do pareamento de culturas com isolados de *Trichoderma* spp. foram satisfatórios porque os antagonistas deste gênero são capazes de colonizar rapidamente o substrato, caracterizado pelo mecanismo de ação denominado competição. Esta característica, segundo Peres & Melo (1995), traz grande vantagem na utilização desse fungo como agente de biocontrole em larga escala. Mello *et al.* (2007) ainda afirmam que a importância do ensaio de pareamentos de culturas não reside apenas na possibilidade de seleção inicial dos isolados promissores para testes mais decisivos, mas também porque nestes testes é possível observar as interações entre os microrganismos e determinar os mecanismos de ação envolvidos.

3.4.2. Supressão da murcha-de-esclerócio (*S. rolfsii*) por *T. asperelloides* e *T. koningiopsis* em casa de vegetação

O isolado *S. rolfsii* – CEN1531 também se mostrou patogênico à mudas de alface da cultivar BRS Leila, causando murchamento como sintoma inicial, escurecimento dos vasos, tombamento ao longo dos dias e ao final de 10 dias, a morte de algumas plantas de alface. A patogenicidade deste isolado (*S. rolfsii* – CEN1531) para esta cultivar, já havia sido relatada no Capítulo 2, em ensaios de patogenicidade *in vitro*. Todavia, a análise estatística não foi capaz de responder se o aumento das doses nos tratamentos contra o fitopatógeno, seria capaz de controlar a doença, nas condições testadas.

Embora este ensaio fosse preliminar, outros fatores podem ter contribuído para este resultado final, como a alta temperatura da casa de vegetação. Segundo Punja (1985), altas temperaturas favorece a infecção por *S. rolfsii*. Os resultados alcançados no presente estudo contrariam aqueles obtidos por Ávila *et al.* (2005), onde 100% de plantas sobreviveram em solo infestado com o patógeno e tratado com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. Também Pádua *et al.* (2007) observaram percentual de sobrevivência de plantas de feijoeiro

variando de 30 a 100%, ao testar isolados de *Trichoderma* no controle da murcha de esclerócios. Entretanto, esses tais resultados referem-se a outros isolados de *Trichoderma*, além de envolverem espécies vegetais diferentes.

De acordo com a literatura, *S. rolfsii* é patogênico a diversas culturas e, antes de atuar como patógeno, o fungo necessita de um período de crescimento saprofítico sobre substrato orgânico. Fato observado neste trabalho, onde mesmo com a aplicação ao mesmo tempo dos antagonistas (*T. asperelloides* e *T. koningiopsis*), o fungo *S. rolfsii* foi superior na competição pelo substrato e conseguiu ainda colonizar as plantas de alface antes do ação dos isolados *Trichoderma* escolhidos, na maioria dos tratamentos. Em um trabalho conduzido em campo por Yaqub & Shahzad (2011), o fungo *S. rolfsii* apresentou efeito negativo sobre o crescimento de plantas de girassol e feijão. Além disso, foi constatada a redução da doença com a aplicação de diversos antagonistas, como *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. polysporum* e *T. virens*.

Auler *et al.* (2013) também obtiveram resultados satisfatórios com o uso de *T. harzianum* no controle de *S. rolfsii* em casa de vegetação, nas culturas da soja e feijão, tendo destacado a espécie *T. asperelloides*. Esta espécie, também no presente trabalho, apresentou elevados índices de sobrevivência de plantas. O resultado observado nos tratamentos com a aplicação de 20 e 25 mL da suspensão de conídios de *T. asperelloides*, pode ser um indicativo de que doses maiores devem ser utilizadas no controle da murcha-de-esclerócios em alface, causada por *S. rolfsii*. Contudo, devido à sobrevivência de 50% de plantas de alface nos tratamentos que envolveram as maiores doses da suspensão do antagonista, é preciso que novos testes sejam realizados e, se comprovada à eficiência de que maiores doses são capazes de suprimir o fungo *S. rolfsii* em casa de vegetação, estas devem ser escolhidas para futuros trabalhos e também com outros isolados destes antagonistas e fitopatógeno.

3.5. CONCLUSÕES

- ✓ Todas as espécies de *Trichoderma* testadas *in vitro* apresentaram potencial antagonista contra isolados dos patógenos *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* e *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1.
- ✓ Nos confrontos com *R. solani*, apenas os isolados *T. harzianum* – CEN01 e *T. virens* – CEN507 não atingiram índices de inibição do crescimento micelial acima de 50%.
- ✓ Nos confrontos com o isolado *P. ultimum*, somente os isolados *T. harzianum* – CEN01 e *T. koningiopsis* – CEN1452 não alcançaram índice de inibição do crescimento micelial de pelo menos 50%.
- ✓ O isolado *T. asperellum* – CEN512 foi o que apresentou maior capacidade de inibir o crescimento micelial dos fitopatógenos nas condições testadas.
- ✓ Pelos resultados obtidos no experimento preliminar em casa de vegetação com *S. rolfsii* - CEN1531, não há evidências de que alguma combinação antagonista (*T. asperelloides* – CEN1433 e *T. koningiopsis* – CEN1452) + dose crescente, seja de alguma forma eficaz no controle da doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, Z. R.; CARVALHO, S. S.; BRAÚNA, L. M.; GOMES, D. M. P. A.; SILVA, M. C. F. & MELLO, S. C. M. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, v. 117, ISSN 1676-1340, 2005.
- AULER, A. C. V.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii*. Revista Agro@mbiente On-line, v. 7, n. 3, p. 359-365. 2013.
- ASKEW, D.J.; LAING, M.D. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. Plant Pathology, v. 42, p. 686-690, 1993.

- BASTAKOTI, S.; BELBASE, S.; MANANDHAR, S. & ARJYAL, C. *Trichoderma* species as Biocontrol Agent against SoilBorne Fungal Pathogens. Nepal Journal of Biotechnology, v. 5, n. 1, p. 39-45, 2017.
- BEDENDO, I. *Damping-off*. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, cap. 42, p. 820-828, 1995.
- BEDENDO, I. P. *Damping-off*. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. & BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, cap. 23. p. 323-327, 2018.
- BENITEZ, T.; RINCÓN. A. M.; LIMÓN, M. C. & CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Internacional Microbiology, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M.; LOBO JÚNIOR, M.; COSTA, J. C. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. & MOURA, A. B. Metodologia para controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Trichoderma*. Embrapa Meio Ambiente, Curso Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma*, 52p., 2013. Acesso: 30 de mar, 2019. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2013/Trichoderma/ApostilaTrichoderma2013.pdf>.
- BRITO, F. S.; MILLER, P. R. M. & STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. Revista Brasileira de Agroecologia, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2010.
- BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach; 2nd edition, Springer-Verlag, New York, 488p., 2002.
- CHET, I. Innovative approaches to plant disease control. John Wiley and Sons, New York, 382p., 1987.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotic. Transactions of British Mycological Society, v. 57, p. 25-39, 1971a.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II, Production of volatile antibiotics, Transactions of British Mycological Society, v. 57, p. 41-48, 1971b.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III, Hyphal interaction. Transaction of British Mycological Society, v. 57, p. 363-369, 1971c.
- FALCÃO, J. V.; OLIRI, F. P.; ÁVILA, V. R.; MELLO, S. C. M. Estabelecimento de metodologia para contaminação de solo com propágulos dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, e expressão de doença em soja. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado Técnico, v. 135, 9p., 2005.
- FERREIRA DE SÁ, M. N.; LIMA, J. S.; JESUS, F. N.; PEREZ, J. O. & GAVA, C. A. T. Seleção *in vitro* de agentes de biocontrole visando o controle de *Fusarium* sp. Acta Brasiliensis, v. 3, n. 1, p. 14-16, 2019.

- HARMAN, G. E.; TAYLOR, A. G. Development of an effective biocontrol seed treatment system. In *Biological control of soil-borne plant pathogens*. Ed. D Hornby, C.A.B. Internacial, p. 415-426, 1990.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I. & LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, v. 2, p. 43–56. 2004.
- HARMAN, G. E.; *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, v. 39, n. 2, p. 103-108, 2011.
- HOFFMANN, C. A.; CHAGAS, L. F. B.; SILVA, D. P.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. & SCHEIDT, G. N. Potential of isolated antagonism of *Trichoderma* against isolated from *Fusarium* sp., in vitro. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 10, n. 1, p. 236-242, 2015.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, v. 87, p. 4-10, 2003.
- HUANG, H.C., BREMER, E., HYNES, R.K. & ERICKSON, R.S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold by dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, v. 18, p. 270-276, 2000.
- ISAIAS, C. O.; MARTINS I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P. & MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, v. 40, n. 1, p. 34-41. 2014.
- KATAN, J. Diseases caused by soilborne pathogens: biology, management and challenges. *Journal of Plant Pathology*, v. 99, n. 2, p. 305-315, 2017.
- KERKENI, A.; DAAMI-REMADI, M.; TARCHOUN, N. & KHEDHER, M. B. *In vitro* and *in vivo* suppression of *Pythium ultimum* the causal agent of the cucumber damping-off by some compost fungi. *Asian Journal of Agricultural Research*, v. 1, n. 2, p. 50-58, 2007.
- KUMAR, G.; MAHARSHI, A.; PATEL, J.; MUKHERJEE, A.; SINGH, H. B. & SARMA, K; *Trichoderma*: A potential fungal antagonist to control plant diseases, SATSA Mukhapatra – Annual Technical, Issue 21, 2017.
- LOPES, F.A.C.; STEINDORFF, A.S.; GERALDINE, A.M.; BRANDÃO, R.S.; MONTEIRO, V.N.; LOBO JUNIOR, M.; COELHO, A.S.G.; ULHOA, C.J. & SILVA, R.N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, v.116, p.815- 824, 2012.
- LUMSDEN, R.D.; LOCKE, J.C. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. *Phytopathology* v. 79, p. 361-366, 1989.
- MARQUES, E.; MARTINS, I.; CUNHA, M. O. C.; LIMA, M. A.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; INGLIS, P. W. & MELLO, S. C. M. New isolates of *Trichoderma* antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biota Neotropica*, v. 16, n. 3, 2016.

- MATROUDI, S.; ZAMANI, M.R. & MOTALLEBI, M. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. *Egyptian Journal of Biology*, v.11, p.37-44, 2009.
- MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; BRAÚNA, L. M. & GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, v. 11, n. 1, p. 3-9, 2007.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, cap. 8. p.263-284, 2000.
- MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C. & KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial da *Macrophomina phaseolina* *in vitro*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 1, p. 57-66, 1976.
- MILANESI, P. M.; BLUME, E.; ANTONIOLI, Z. I.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, R. F.; FINGER, G. & DURIGON, M. R. Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 36, n. 3, p. 347-356, 2013.
- MISHRA, P. K.; MUKHOPADHYAY, A. N. & SINGH, U. S. Suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* populations in soil by application of *Trichoderma virens* and *in vitro* approaches for understanding biological control mechanisms. *Indian Phytopathology*, v. 57, n. 1, p. 44-47, 2004.
- MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S. & MONTE, E. Functional analysis of the *Trichoderma harzianum* nox1 Gene, encoding na NADPH oxidase, relates production of reactive oxygen species to specific biocontrol activity against *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 9, 2011.
- MUKHERJEE, P. Genomics of biological control – whole genome sequencing of two mycoparasitic *Trichoderma* spp. *Current Science*, v. 101, n. 3, p. 268. 2011.
- NIETO-JACOBO, M. F.; STEYAERT, J. M.; SALAZAR-BADILLO, F. B.; VI NGUYEN, D.; ROSTÁS, M.; BRAITHWAITE, M.; DE SOUZA, J. T.; JIMENEZ-BREMONT, J. F.; OHKURA, M.; STEWART, A. & MENDOZA-MENDOZA, A. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 112, 2017.
- NWANKITI, A. O.; GWA, V. I.; Evaluation of antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* causal agent of white yam (*Dioscorea rotundata* poir) tuber rot. *Trends Technical Scientific Research*, v. 1, n. 1, p. 555-554. 2018.
- PACHECO, K. R.; VISCARDI, B. S. M.; VASCONSELOS, T. M.; MOREIRA, G. A. M.; VALE, H. M. M. & BLUM, L. E. B. Eficácia de *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* e *T. reesei* contra *Sclerotium rolfsii*. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 32, n. 2, p. 412-421, 2016.
- PÁDUA, R. R. P.; ALVARENGA, D. O. A.; QUEIROZ, P. R. Q. & MELLO, S. C. M. M. Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolfsii* pertencentes

- ao gênero *Trichoderma*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, v. 165, 2007.
- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, v. 23, p. 23-54. 1985.
- PERES, E.; DE MELO, I. S. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I – Aspectos citológicos. Scientia Agricola, v. 52, n. 1, p. 56-59, 1995.
- PINHEIRO, C. C. C.; CARDOSO, A. F.; FERREIRA, W. X. & SILVA, G. B. Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma asperellum* contra *Rhizoctonia solani* *in vitro*. In. II Congresso Internacional das Ciências Agrárias, Cointer – PDVAgro 2017. Natal – RN, Anais eletrônicos, 2017. Disponível em: < <https://cointer-pdvagro.com.br/wp-content/uploads/2018/02/POTENCIAL-DE-ANTAGONISMO-DE-ISOLADOS-DE-Trichoderma-asperellum-CONTRA-Rhizoctonia-solani-in-vitro.pdf>> Acesso em: 15 fev. 2019.
- PINTO, Z. V.; CIPRIANO, M. A. P.; SANTOS, A. S.; PFENNING, L. H. & PATRÍCIO, F. R. A. Control of lettuce bottom rot by isolates of *Trichoderma* spp. Summa Phytopathologica, v. 40, n. 2, p. 141-146, 2014.
- PUNJA, Z.K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Review of Phytopathology, v. 23, p. 97-127, 1985.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 87, p. 787-799, 2010.
- SOUSA, I. A. L.; BENCHIMOL, R. L.; SILVA, C. M.; SANTOS, A. K. A.; PINHEIRO, C. C. C. & CARVALHO, E. A. Potencial de biocontrole de *Rhizoctonia solani* do Feijão-caupi. Biota Amazônia, v. 7, n. 1, p. 86-89, 2017.
- SRIVASTAVA, M.; SHAHID, M.; PANDEY, S.; KUMAR, V.; SINGH, A.; TRIVEDI, S. & SHIVRAM, S. Y. K. *Trichoderma*: a scientific approach against soil borne pathogens. African Journal of Microbiology Research, v. 9, n. 50, p. 2377-2384, 2015.
- SUMIDA, C. H.; DANIEL, J. F. S.; ARAUJO, A. P. C. S.; PEITL, D. C.; ABREU, L. M.; DEKKER, R. F. H. & CANTERI, M. G. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. Biocontrol Science and Technology, v. 28, n. 2, p. 142-156, 2018.
- VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L. & CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrole of fungal plant pathogens. Antonie van Leeuwenhoek, v. 81, n. 1-4, p. 549-556, 2002.
- WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology, v. 22, p. 837- 845, 1932.
- WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lingorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology, v. 24, p. 1153, 1934.
- YAQUB, F.; SHAHZAD, S. Efficacy and persistence of microbial antagonists against *Sclerotium rolfsii* under field conditions. Pakistan Journal of Botany, v. 43, n. 5, p. 2627-2634, 2011.

CAPÍTULO 4

Avaliação da morfologia de colônias de *Trichoderma* spp. observadas em diferentes meios, compatibilidade e sensibilidade a produtos químicos registrados para a cultura da alface

RESUMO

O uso de *Trichoderma* spp. em conjunto com produtos químicos para o controle de doenças de plantas tende a ser usual entre os produtores rurais, porém o efeito provocado pelos químicos sobre a ação dos microrganismos antagonistas carece ainda de estudos. Testes de compatibilidade entre químicos e biológicos conduzidos em laboratório exigem o uso de meios de cultura apropriados, de forma que os organismos possam expressar adequadamente suas características culturais, possibilitando uma avaliação confiável da influência de tais produtos sobre o desenvolvimento de colônias dos organismos testados. Em face disto, o objetivo deste estudo foi, em meio previamente selecionado, determinar a compatibilidade de isolados de *Trichoderma* com fungicidas e inseticidas químicos, *in vitro*. Excetuando o isolado *Trichoderma* sp., os isolados do antagonista apresentaram esporulação intensa nos meios CMD e BDA e, desta forma, o meio BDA, por ser de uso rotineiro no Laboratório, foi o escolhido para os estudos de compatibilidades *in vitro*. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. atingiram crescimento micelial máximo de 9,0 cm em todas as doses de boscalida, iprodiona e imidacloprido. Nos ensaios com procimidona e iprodiona, todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram a morfologia da colônia diferentes das testemunhas, exceto o isolado *Trichoderma* sp. – CEN1441. Este mesmo isolado foi o único compatível ao ingrediente ativo procimidona em todas as doses. Entretanto, os isolados *T.virens* e *T. koningiopsis* alcançaram médias de inibição micelial entre 22-68% e 18-20% na presença deste fungicida. Nenhum dos isolados foi compatível *in vitro* ao tiabendazol nas condições testadas. Este princípio ativo é recomendado para o controle da fusariose na cultura da alface. O meio BDA se mostrou apropriado para os estudos de compatibilidade de produtos químicos com agentes antagonistas, *in vitro*. Todos os isolados de *Trichoderma* foram compatíveis com os ingredientes ativo iprodiona, boscalida e os inseticidas à base de imidacloprido, nas doses testadas.

Palavras-chaves: combinação de *Trichoderma* com produtos químicos; espécies de *Trichoderma*, meio de cultura.

ABSTRACT

The use of *Trichoderma* spp. in conjunction with chemicals for plant disease control, it tends to be usual among farmers, but the effect of chemicals on the action of these antagonistic microorganisms is still lacking. Laboratory-conducted chemical and biological compatibility tests require the use of appropriate culture media so that organisms can adequately express their cultural characteristics, enabling a reliable assessment of the influence of such products on the colonies development of the organisms tested. In view of this, the objective of this study was, in a previously selected medium, to determine the compatibility of *Trichoderma* isolates with chemical fungicides and insecticides *in vitro*. Except for the *Trichoderma* sp. isolate, the antagonist isolates showed intense sporulation in the CMD and BDA media and, therefore, the BDA medium, being routinely used in the Laboratory, was chosen for *in vitro* compatibility studies. All isolates of *Trichoderma* spp. reached maximal mycelial growth of 9.0 cm at all doses of boscalide, iprodione and imidacloprid. In the trials with procymidone and iprodione, all *Trichoderma* isolates presented colony morphology different from the controls except the *Trichoderma* sp. - CEN1441. This same isolate alone was compatible with the active ingredient procymidone at all doses. However, *T.virens* and *T. koningiopsis* isolates achieved average mycelial inhibition between 22-

68% and 18-20% in the presence of this fungicide. None of the isolates were *in vitro* compatible with thiabendazole under the conditions tested. BDA medium has been shown to be suitable for *in vitro* compatibility studies of chemicals with antagonist agents. All *Trichoderma* isolates were compatible with the active ingredients: iprodione, boscalide and imidacloprid-based insecticides at the tested doses.

Key words: combination of *Trichoderma* with chemicals, *Trichoderma* species, culture medium.

4.1. INTRODUÇÃO

O fungo *Trichoderma* coloniza a superfície da raiz e estabelece uma zona de interação no córtex. Nesta região, o fungo secreta enzimas e outras moléculas bioativas, sendo capazes de fragmentar a parede celular de outros fungos e induzir a resposta de resistência na planta. Fungos deste gênero podem ser eficientes no controle de doenças ocasionadas por patógenos de solo como *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium* spp. e *Sclerotinia* spp. Assim, são úteis para o enriquecimento de substratos, tratamento de sementes e em pulverização na parte aérea das plantas ou aplicados nos sulcos de plantio. Os mecanismos de ação utilizados por esses fungos são diversos, destacando-se competição, micoparasitismo e antibiose, sendo este resultante da produção de metabólitos secundários ativos contra outros fungos. *Trichoderma* pode permanecer ativo mesmo sob condições ambientais desfavoráveis para o crescimento micelial, o que sugere a possibilidade de tolerância do fungo a estresses, característica importante, considerando a questão das mudanças climáticas e suas possíveis consequências para as espécies vegetais exploradas economicamente (Sathiyaseelan *et al.*, 2009).

O uso de fungicidas representa um dos principais métodos de controle de doenças de plantas. Entretanto, tais produtos químicos impactam o meio ambiente e a saúde humana. O manejo integrado, utilizando várias práticas e não apenas pulverizações com fungicidas químicos, hoje é a forma mais indicada para o controle das doenças de plantas. A implementação desta prática requer cuidado para a inserção do uso dos agentes de controle biológico ao conjunto de medidas de controle, pois os microrganismos podem ser afetados pelos produtos químicos (Bhale & Rajkonda, 2015; Manjunath *et al.*, 2017).

Um cuidado a ser tomado com relação à inserção do agente de biocontrole em um sistema de manejo integrado, onde são aplicados fungicidas e inseticidas regularmente, é a realização prévia de testes de compatibilidades do agente com os produtos químicos

usualmente utilizados na cultura. Esses testes, conduzidos em laboratório, exigem o uso de meios de cultura apropriados, de forma que os organismos possam expressar adequadamente suas características culturais, possibilitando uma avaliação confiável da influência de tais produtos sobre o desenvolvimento de colônias dos organismos testados.

Um bom meio de cultura deve incluir ingredientes prontamente disponíveis, facilidade de preparo e manipulação, baixo custo e efetividade após armazenamento prolongado. Eles podem conter hidrolisados de proteínas (peptonas, caseína, triptona), carboidratos (lactose, sacarose, maltose, glicose, xilose) e tampões (fosfato monossódicos e dissódicos ou potássicos). Podem ser suplementados com extrato de levedura, vitaminas, soro e, ainda, substâncias inibidoras, como corantes de anilina, produtos químicos e agentes antimicrobianos, sais, íons férricos e ferrosos (sulfeto ferroso), gelificantes (ágar), dentre outros compostos, a fim de atender a proposta e viabilidade do estudo. Desta forma, são classificados de acordo com sua formulação (Claflin *et al.*, 1987; Alfenas & Mafia, 2007).

Face ao que foi dito, o objetivo deste estudo foi, em meio previamente selecionado, determinar a compatibilidade de isolados de *Trichoderma* com fungicidas e inseticidas químicos, *in vitro*.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Meios de cultura utilizados para multiplicação dos fungos

A fim de escolher o meio mais apropriado para o crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* em estudos de compatibilidade *in vitro* com os fungicidas e inseticidas, foram realizados ensaios prévios com diversos meios utilizados na rotina de um laboratório. Os meios testados foram: ágar-água (AA), Batata Dextrose Ágar (BDA), Cornmeal Dextrose Ágar (CMD), Czapek (CZA), Martín (MAR), Murashige & Skoog, 1962 (MS), Sabouraud

Dextrose Ágar (SDAY), Sacarose Nutriente Ágar (SNA), Malte e Ágar (MA), Extrato de Malte e Ágar (MEA) e V8 20% (V8). A produção dos meios está descrita no Anexo 1.

Foram utilizadas as culturas monospóricas em tubo, descritas no item 2.2.2. como fonte primária de colônias. Os isolados *T. harzianum* – CEN01, *T. virens* – CEN507, *T. asperellum* – CEN512, *T. asperelloides* – CEN1433, *Trichoderma* sp. – CEN1441, *T. koningiopsis* – CEN1452, foram repicados para placas contendo meio BDA (Merk KGaA[®]) e incubados em estufa incubadora BOD (Nova Técnica[®]) a 26°C, por sete dias. Após este processo, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias e depositados na superfície do meio de cada meio em teste, em placas de Petri. As culturas foram incubadas em estufa incubadora (BOD) a 26 °C, com fotoperíodo de 12 horas e avaliadas aos 10 dias após a incubação.

O ensaio foi composto por 66 tratamentos com três repetições, no esquema fatorial 6 x 11 em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). Este experimento foi repetido três vezes. As variáveis avaliadas foram: aspecto do crescimento micelial, coloração, formato e espessura das colônias. Nestes ensaios não foi avaliada a produção de conídios por placa, nem a velocidade de crescimento micelial do isolado.

4.2.2. Avaliação da compatibilidade de *Trichoderma* com fungicidas e inseticidas recomendados para a cultura da alface

De acordo com o site Agrofite (MAPA), os fungicidas e inseticidas comerciais utilizados são recomendados e registrados para uso contra os fitopatógenos; os inseticidas são rotineiramente utilizados para a cultura da alface e estão listados no Anexo 2.

Os ensaios foram baseados em cinco doses dos ingredientes ativos (Tabela 11), tendo a dose III como a base para duas subdoses (valores abaixo da dose recomendada) e duas

superdoses (valores acima da dose recomendada) baseada na dose comercial recomendada (Tabela 12).

Tabela 11. Doses (g/mL) dos ingredientes ativos utilizadas nos testes de compatibilidade por 500 mL de BDA.

Ingrediente ativo	Grupo químico	Doses				
		I	II	III	IV	V
Imidacloprido	Neonicotinóide	0,036	0,090	0,272	0,454	0,636
Imidacloprido	Neonicotinóide	0,083	0,216	0,350	0,483	0,616
Iprodiona	Dicarboximida	0,550	0,650	0,750	0,850	0,950
Procimidona	Dicarboximida	0,425	0,525	0,625	0,725	0,825
Boscalida	Piridina-carboxamida	0,300	0,400	0,500	0,600	0,700
Tiabendazol	Benzimidazol	0,500	1,250	2,500	3,750	4,750

Não foram preparadas soluções estoque, pois os próprios produtos comerciais foram as fontes para retirada das doses empregadas.

Tabela 12. Doses comerciais (mL/L) referências recomendadas, utilizadas para os ensaios de compatibilidade dos fungicidas e inseticidas.

Ingrediente ativo	Doses					Calda (mL/L)
	I	II	III*	IV	V	
Imidacloprido	40	100	300	500	700	550.000
Imidacloprido	125	325	525	725	925	750.000
Iprodiona	1100	1300	1500	1700	1900	1.000.000
Procimidona	850	1050	1250	1450	1650	1.000.000
Boscalida	600	800	1000	1200	1400	1.000.000
Tiabendazol	0.0010	0.0025	**0,0025- 0,0049	0.0075	0.0095	1mL

* III Dose comercial recomendada. A partir destas, foram estipuladas duas subdoses (I e II) e duas superdoses (IV e V).

** Dose recomendada para o tratamento de 1000 sementes.

Os valores das doses dos produtos foram obtidos em proporção à calda utilizada no ensaio, sempre 500 mL de BDA a uma temperatura em torno de 40 °C. Adicionalmente aos cálculos das quantidades (g ou mL) utilizados, foram realizados os cálculos da quantidade e a concentrações em ppm de ingrediente ativo (i.a) em 500 mL de BDA (Tabela 13 e 14).

Tabela 13. Quantidade (g/L ou kg) de ingrediente ativo (i.a) em 500 mL de BDA.

Ingrediente ativo	Concentração do produto	Doses				
		I	II	III	IV	V
Imidacloprido	700g ou 70%	0,025	0,063	0,190	0,317	0,445
Imidacloprido	200g ou 20%	0,016	0,043	0,070	0,096	0,123
Iprodiona	500g ou 50%	0,275	0,325	0,375	0,425	0,475
Procimidona	500g ou 50%	0,212	0,262	0,312	0,362	0,412
Boscalida	500g ou 50%	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350
Tiabendazol	485g ou 48,5%	0,242	0,606	1,212	1,818	2,303

Tabela 14. Concentração (ppm) de ingrediente ativo (i.a) em 500mL de BDA.

Ingrediente ativo	Grupo químico	Doses				
		I	II	III	IV	V
Imidacloprido	Neonicotinóide	50,9	126	380	636	890
Imidacloprido	Neonicotinóide	32	86	140	192	246
Iprodiona	Dicarboximida	550	650	750	850	950
Procimidona	Dicarboximida	424	524	624	724	824
Boscalida	Piridina-carboxamida	300	400	500	600	700
Tiabendazol	Benzimidazol	480	1210	2420	3630	4600

* 1 ppm é = 1 ml do (soluto)/1000 L do solvente (solução) ou 1 g/1000 L ou 1 mg/1000 L ou 1 µL/1 mL.

As doses foram primariamente diluídas em 10 mL de água destilada autoclavada, sob agitação constante em câmara de exaustão e vertido imediatamente na calda (meio BDA), para evitar a decantação e dissolver melhor o produto. Cada placa recebeu 20 mL da solução

BDA + fungicida/inseticida. Discos de micélio (5 mm \varnothing) foram depositados no centro da placa de Petri contendo o meio. A incubação das culturas foi realizada em estufa incubadora BOD (Nova Técnica[®]) a 26 °C, durante 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas de luz/escuro. Após a medição do diâmetro das colônias (cm), calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial, segundo Menten *et al.* (1976), utilizando a fórmula: % inibição = [(ctest – ctrat) /ctest] x 100, em que ctest = crescimento da testemunha; e ctrat = crescimento do tratamento.

4.2.3. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), composto por 30 tratamentos cada produto, com três repetições, adotou-se o esquema fatorial 6 x 5. Estes experimentos foram repetidos três vezes. Os modelos utilizados foram, a Regressão Beta e comparação de médias pelo teste Tukey 5%, utilizando o software R (Burnham & Anderson, 2002).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Morfologia das colônias de *Trichoderma* spp. em diferentes meios

Nos resultados obtidos neste ensaio, foi possível observar uma diferença na morfologia das colônias e esporulação dos isolados de *Trichoderma*, entre todos os meios testados. O meio BDA se mostrou o mais eficiente quanto à capacidade de esporulação dos *Trichoderma* spp. As colônias apresentaram coloração verde intensa, com aspecto aveludado para a maioria dos isolados e por isso foi o escolhido para uso nos testes de compatibilidade dos isolados de *Trichoderma* com fungicidas e inseticidas.

As colônias de *T. harzianum* - CEN01 apresentaram o mesmo padrão de morfologia radial de crescimento, ainda que sutilmente nos meios SNA, MS, AA, CZA, MEA e ME.

Ainda foi possível visualizar que o micélio era quase translúcido, todos eles apresentaram pouca esporulação. Já nos meios CMD e BDA houve intensa esporulação verificando-se a coloração verde das colônias, com aspecto aveludado. Em especial no meio de cultivo V8, o fungo manteve as características de crescimento em anéis concêntricos com a esporulação bem evidentes. No meio de cultivo SDAY, as colônias exibiram coloração verde menos intensa sem o aspecto aveludado, mas com crescimento em anéis concêntricos. Houve pigmentação dos meios BDA e MEA (Figura 3).

Na morfologia das colônias de *T. virens* - CEN507, também foi possível verificar pouca esporulação, porém com formação de anéis concêntricos nos meios SNA, MS, AA, CZA e MEA. No meio ME, a esporulação e crescimento micelial foram quase imperceptíveis. A característica de esporulação nos meios CMD, BDA e V8 foram intensas, com coloração verde escura, principalmente em CMD e BDA. Um crescimento atípico na colônia de *T. virens* - CEN507 ocorreu no meio SDAY, com a esporulação lembrando o formato de hélices, intercalando com o micélio de coloração branco. Também exibiu pigmentação nos meios BDA e MEA vista na parte inferior da placa (Figura 3).

A morfologia das colônias de *T. asperellum* - CEN512 teve um aspecto tufoso na maioria dos meios de cultura, devido à esporulação irregular, em tufos e não uniforme, embora menos evidente em SNA, MS, AA, CZA, ME e MEA. Dentre estes meios citados anteriormente, a esporulação foi mais aparente no meio CZA e menos no meio de cultura ME. Os meios BDA e CMD proporcionaram esporulação de coloração verde escura, juntamente com o meio V8, todavia, este com menos esporulação na placa de Petri. O meio SDAY foi o único a apresentar esporulação profusa em toda a placa e presença de micélio aéreo. Pigmentação foi verificada no meio CMD (Figura 3).

A morfologia da colônia em *T. asperelloides* - CEN1433 seguiu com o mesmo padrão de crescimento e esporulação dos isolados anteriores, nos quesitos micélios esparsos e poucas esporulações em SNA, MS, AA e ME, um pouco mais esporulada nos meios CZA e MEA, apresentando anéis. Nos meios considerados mais ricos, como BDA, V8, CMD e SDAY houve intensa esporulação, dando aspecto aveludado à colônia e não houve pigmentação em nenhum dos meios de cultura trabalhados (Figura 3).

O isolado *Trichoderma* sp. - CEN1441, até aqui considerado possível espécie nova (dados não publicados), apresentou decréscimo de esporulação ao longo dos ensaios, mesmo recorrendo sempre aos tubos de matrizes na instalação dos ensaios. Todavia, foi importante notar que a morfologia das colônias nos meios SNA, MS, AA, CZA, ME, MEA, CMD e SDAY permaneceu a mesma, com a presença de poucos esporos, anéis de crescimento discretos, exceto no meio SNA. As colônias nos meios BDA e V8 apresentaram esporulação abundante, sendo o V8 o que proporcionou melhor esporulação, com anéis de crescimento. Notou-se também aqui, forte pigmentação dos meios CMD e MEA em amarelo-laranja. Os outros meios (BDA, SDAY e V8), apesar de serem de coloração mais forte mesmo sem a presença do fungo, também apresentaram leve mudança de coloração nas placas de Petri (Figura 3).

A morfologia das colônias de *T. koningiopsis* - CEN1452 apresentaram crescimento micelial completo na presença de todos os meios utilizados. Nos meios SNA e CZA observou-se a presença discreta de anéis no início do crescimento da colônia e, também, esporulação com aspecto irregular e em tufos. Os anéis de esporulação da colônia permaneceram nos meios MS, MEA e V8, este com esporulação mais abundante. Os meios CMD e BDA mantiveram a esporulação intensa, coloração verde escura e a presença de anéis de esporulação nítidos no início do crescimento da colônia. Em SDAY, as colônias

apresentaram coloração verde-pálida, aveludada e com presença de micélios aéreos, além de esporulação em tufos. Não exibiu pigmentação em nenhum dos meios testados (Figura 3).

O meio Martin é um meio seletivo, rotineiramente utilizado para isolamento de fungos do gênero *Trichoderma* do solo. Neste, não houve formação de setores das colônias de *Trichoderma* spp. por que a inoculação foi feita com um disco de micélio, diferentemente do que é feito no procedimento de isolamento. As colônias se apresentaram em geral com tamanho reduzido, por causa do componente Rosa de bengala, um inibidor, no qual o crescimento é mais lento e a coloração dos conídios variou entre verde-limão e verde-oliva, com a presença de micélio branco adensado em todas as espécies. Todos os isolados apresentaram crescimento e esporulação em anéis com forte demarcação das zonas de crescimento, em especial o isolado *Trichoderma* sp. - CEN1441, no qual a colônia se apresentou com aspecto ondulado e crescimento micelial de maior diâmetro (Figura 3).

Excetuando o isolado *Trichoderma* sp., os isolados do antagonista apresentaram esporulação intensa nos meios CMD e BDA e, desta forma, o meio BDA, por ser de uso rotineiro no Laboratório, foi o escolhido para os estudos de compatibilidades *in vitro*.

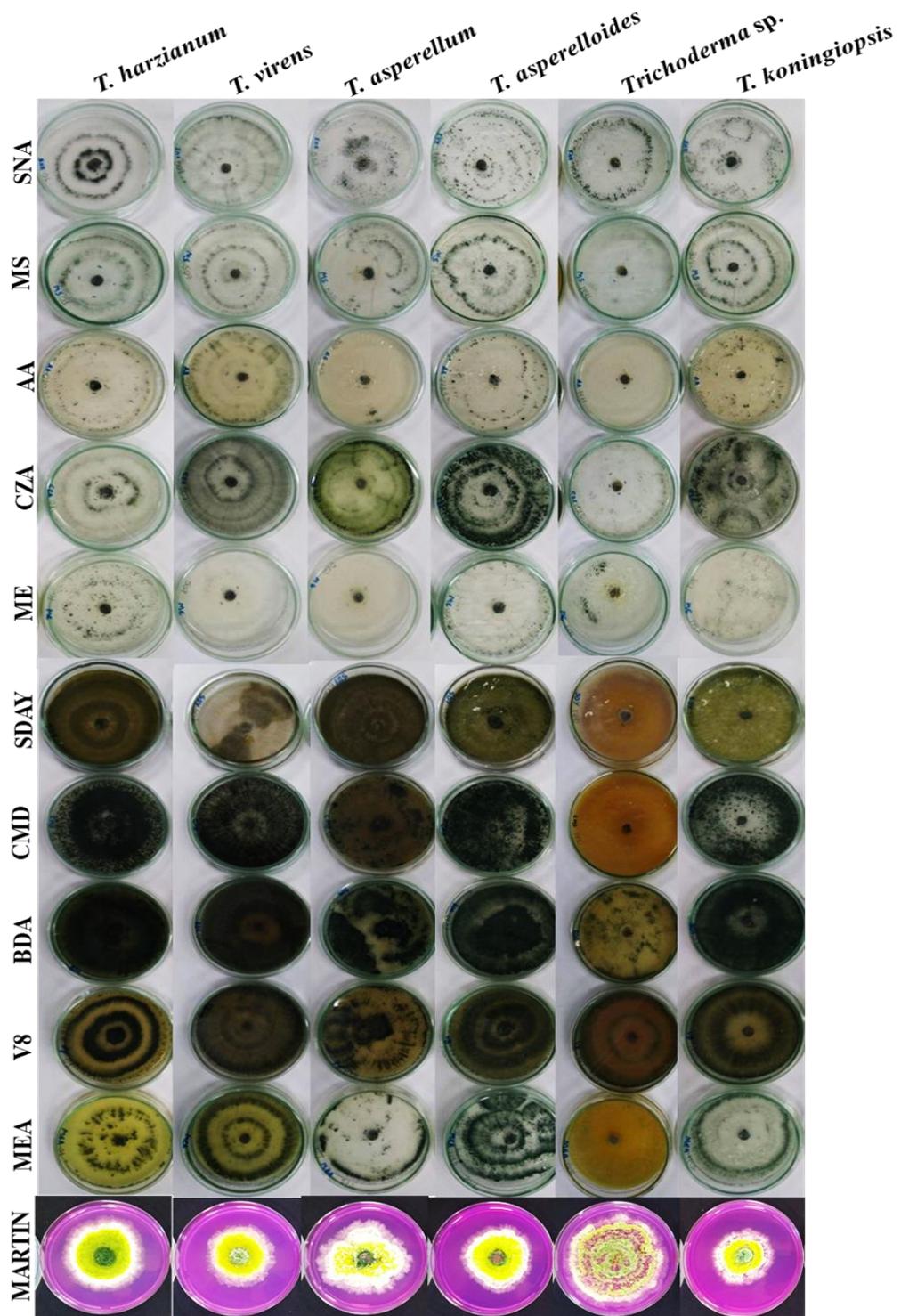


Figura 3. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. nos meios: SNA – Sacarose nutriente ágar; MS – Murashige e Skoog; AA – Ágar-água; CZA – Czapec dox; ME – Malte e ágar; SDAY – Sabouraud dextrose ágar 4%; CMD – Corn meal dextrose; BDA – Batata dextrose ágar; V8 – Suco de vegetais 20%; MEA – Extrato de malte e ágar.

4.3.2. Compatibilidade de espécies de *Trichoderma* a fungicidas e inseticidas recomendados a cultura da alface

Todos os isolados de *Trichoderma* colonizaram com sucesso a superfície do BDA suplementado com os fungicidas a base de boscalida, iprodiona e os inseticidas a base de imidacloprido, e foram considerados compatíveis com esses ingredientes ativos. Em todas as doses, os isolados atingiram crescimento máximo nas placas de Petri após sete dias de incubação em estufa incubadora (Figura 4, 5 e 6). Nenhum dos isolados cresceu no meio BDA suplementado com o fungicida a base de tiabendazol, por isso não foi considerado compatível *in vitro* (Tabela 15).

Tabela 15. Crescimento (cm) e porcentagem de inibição micelial (%) de *Trichoderma* spp. em meio BDA suplementado com boscalida, iprodiona, imidacloprido e tiabendazol.

Tratamento + ingrediente ativo			Grupo químico	Crescimento micelial (cm)	Inibição micelial (%)
<i>Trichoderma</i> boscalida	spp.	+	Piridina-carboxamida	9,0	0
<i>Trichoderma</i> iprodiona	spp.	+	Dicarboximida	9,0	0
<i>Trichoderma</i> imidacloprido	spp.	+	Neocotinóide	9,0	0
<i>Trichoderma</i> tiabendazol	spp.	+	Benzimidazol	0	100

Os ensaios com as doses envolvendo o ingrediente ativo iprodiona, foi o que apresentou maior diferença na morfologia das colônias dentre os isolados de *Trichoderma* em relação as testemunhas, porém, sem inibição do crescimento micelial nas concentrações testadas (Figura 4). Os ensaios com o fungicida boscalida indicaram que os isolados de *Trichoderma* são compatíveis com esse fungicida nas concentrações testadas. As colônias exibiram crescimento micelial homogêneo, com crescimento micelial ocorrendo da mesma forma que no tratamento

testemunha (Figura 5). Nos testes de sensibilidade com os inseticidas à base de imidacloprido verificou-se também, com todos os isolados de *Trichoderma*, crescimento semelhante aos tratamentos testemunhas, mesmo nas concentrações elevadas de ingrediente ativo (Figura 6).

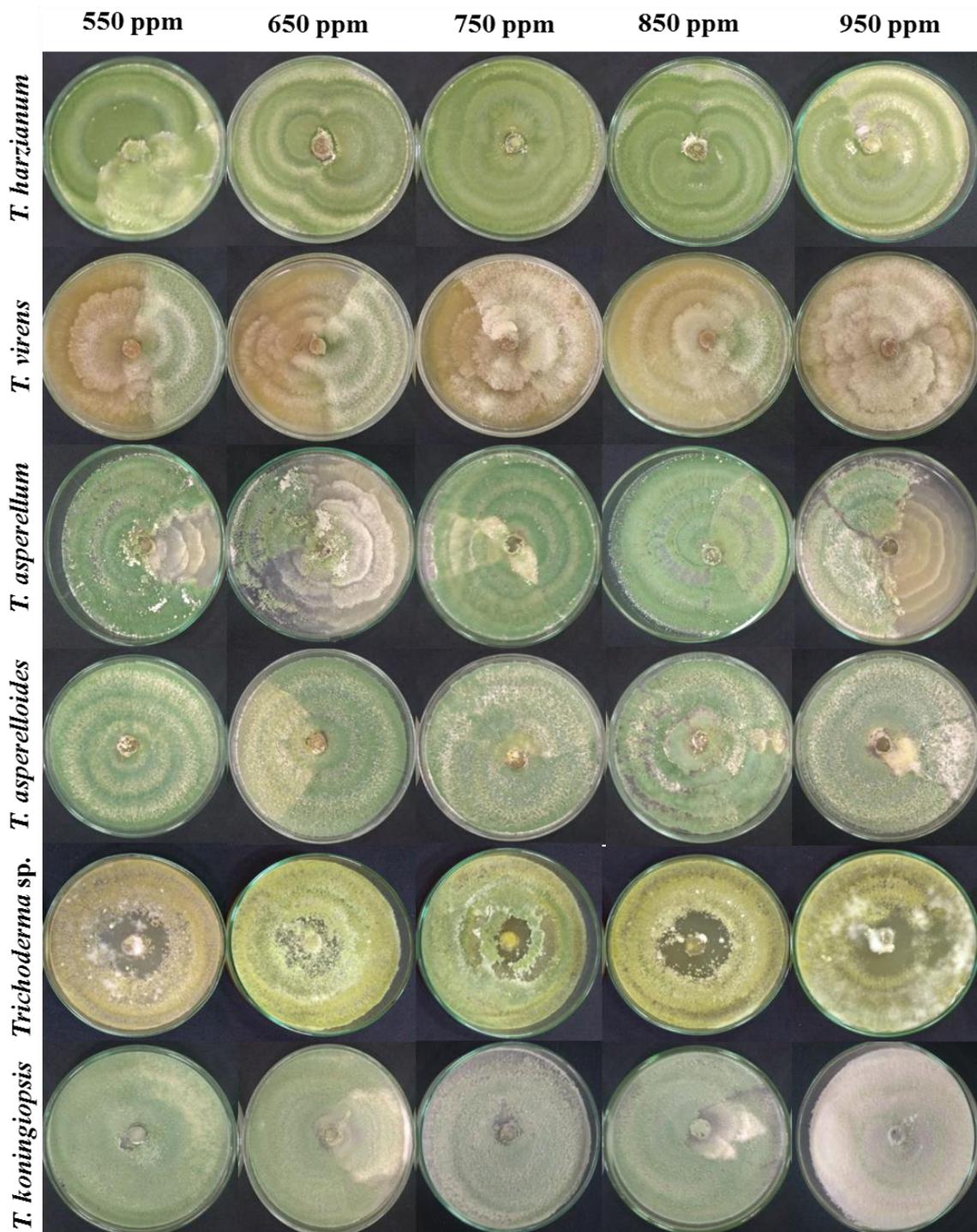


Figura 4. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. em meio BDA suplementado com iprodiona.

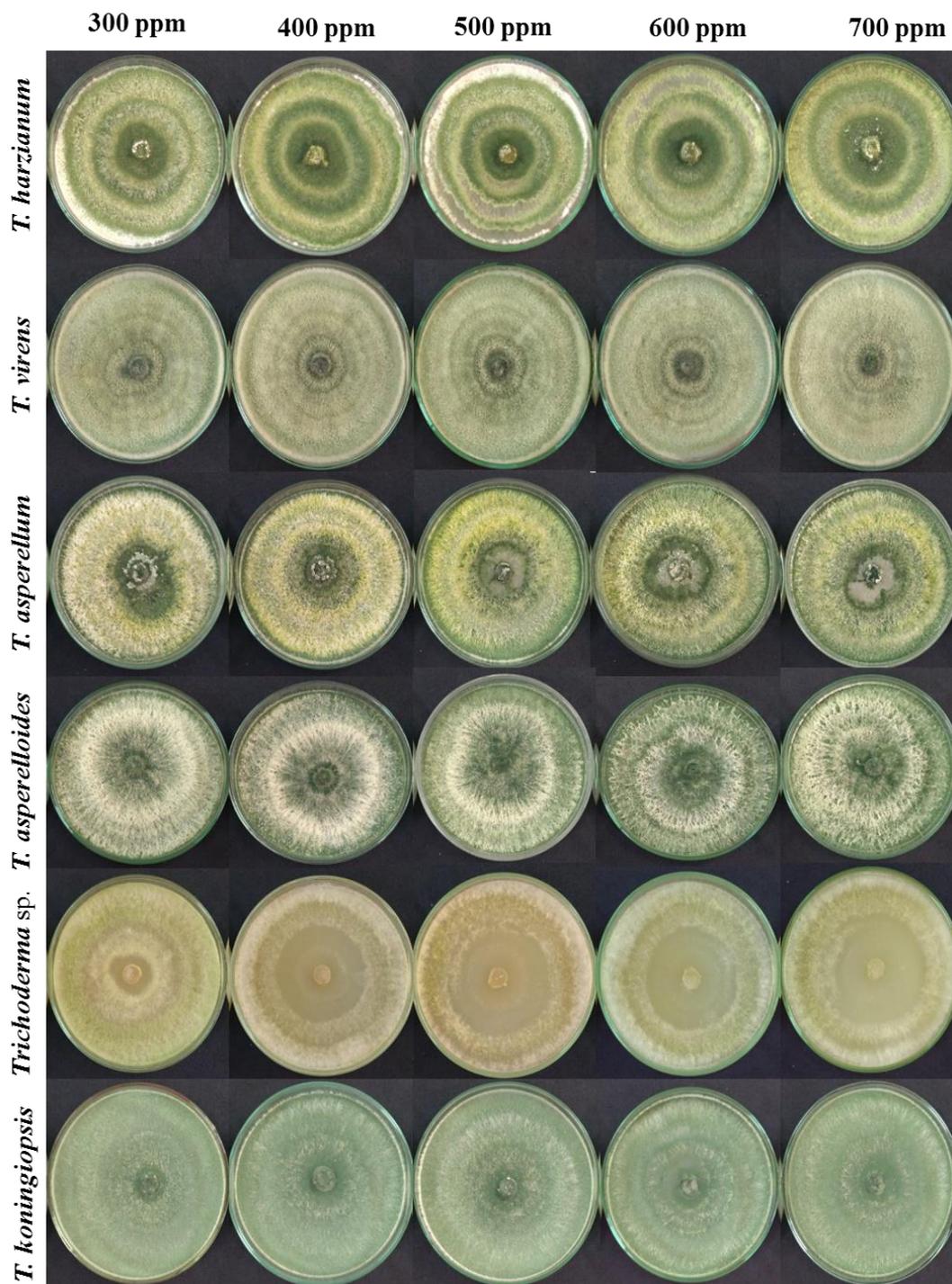


Figura 5. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. em meio BDA suplementado com boscalida.

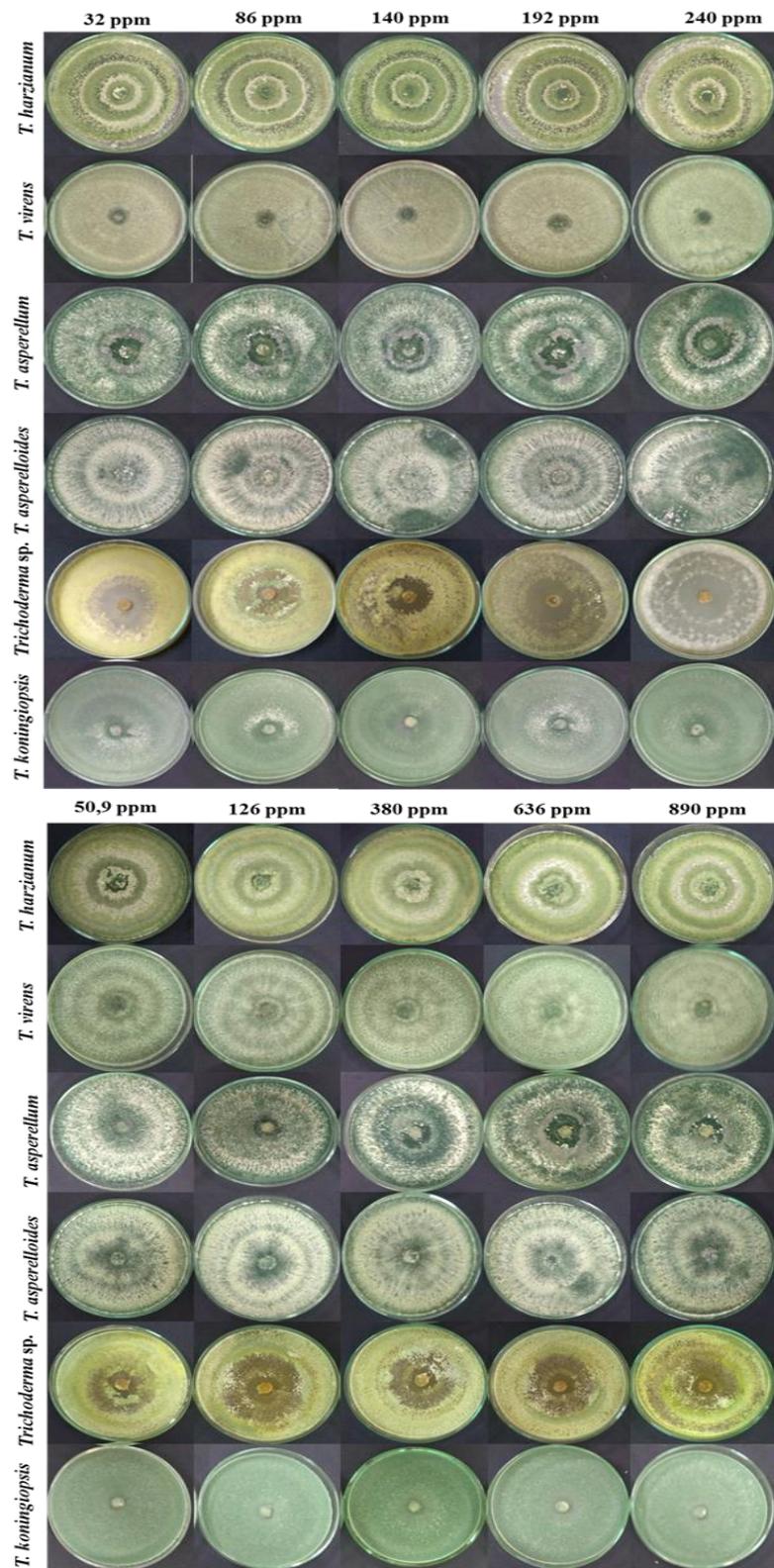


Figura 6. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. em meio BDA suplementado com imidacloprido.

O efeito da suplementação do BDA com o fungicida procimidona foi diferente para os isolados testados, onde as espécies alcançaram um desempenho heterogêneo. Pela Tabela 16, foi possível constatar que o isolado *T. harzianum* - CEN01 apresentou inibição micelial entre 71-74%, não diferindo estatisticamente entre as concentrações. As colônias se apresentaram reduzidas, com pouca esporulação onde houve o crescimento do micélio, com formação de um halo de crescimento com coloração amarelada. O melhor desempenho com o isolado *T. virens* - CEN507, foi na concentração 424 ppm, com apenas 22% de inibição micelial. As colônias apresentaram-se com esporulação setorizada e bordas irregulares. Para o isolado *T. asperellum* - CEN512 houve diferença estatística nas concentrações 424 e 624 ppm, com 53 e 52% de inibição micelial. Entretanto, nas concentrações mais altas (724 e 824 ppm) verificaram-se inibições, em média de 72% (Tabela 16). As colônias se apresentaram menores, sem a formação de anéis de crescimento e esporos (Figura 7).

Já o isolado *T. asperelloides* - CEN1433 os valores de inibição foram variados, diferindo estatisticamente somente na concentração 424, alcançando 35% de inibição micelial. As colônias apresentaram crescimento irregular em todas as concentrações, com micélio entumecido, sem a presença de anéis e com a presença de esporos, porém, reduzidos nas concentrações mais altas. O isolado *Trichoderma* sp. - CEN1441 conseguiu crescer em todas as doses, com 0% de inibição micelial, sendo o melhor representante dos isolados estudados, ainda que as concentrações não tenham diferido significativamente. As colônias apresentaram crescimento por toda a placa de Petri, sem irregularidades nas bordas, contudo, aparentemente não houve a presença de esporulação ou pigmentação do BDA. O isolado *T. koningiopsis* - CEN1452 não apresentou diferença estatística para crescimento nas concentrações de procimidona testadas. Todavia, observaram-se valores baixos de inibição micelial entre 18-20%, alcançando assim o segundo melhor desempenho entre os isolados testados neste estudo (Tabela 16). As colônias cresceram de forma irregular, radialmente com

bordas onduladas em todas as concentrações e apresentaram formação de esporos (Figura 7).

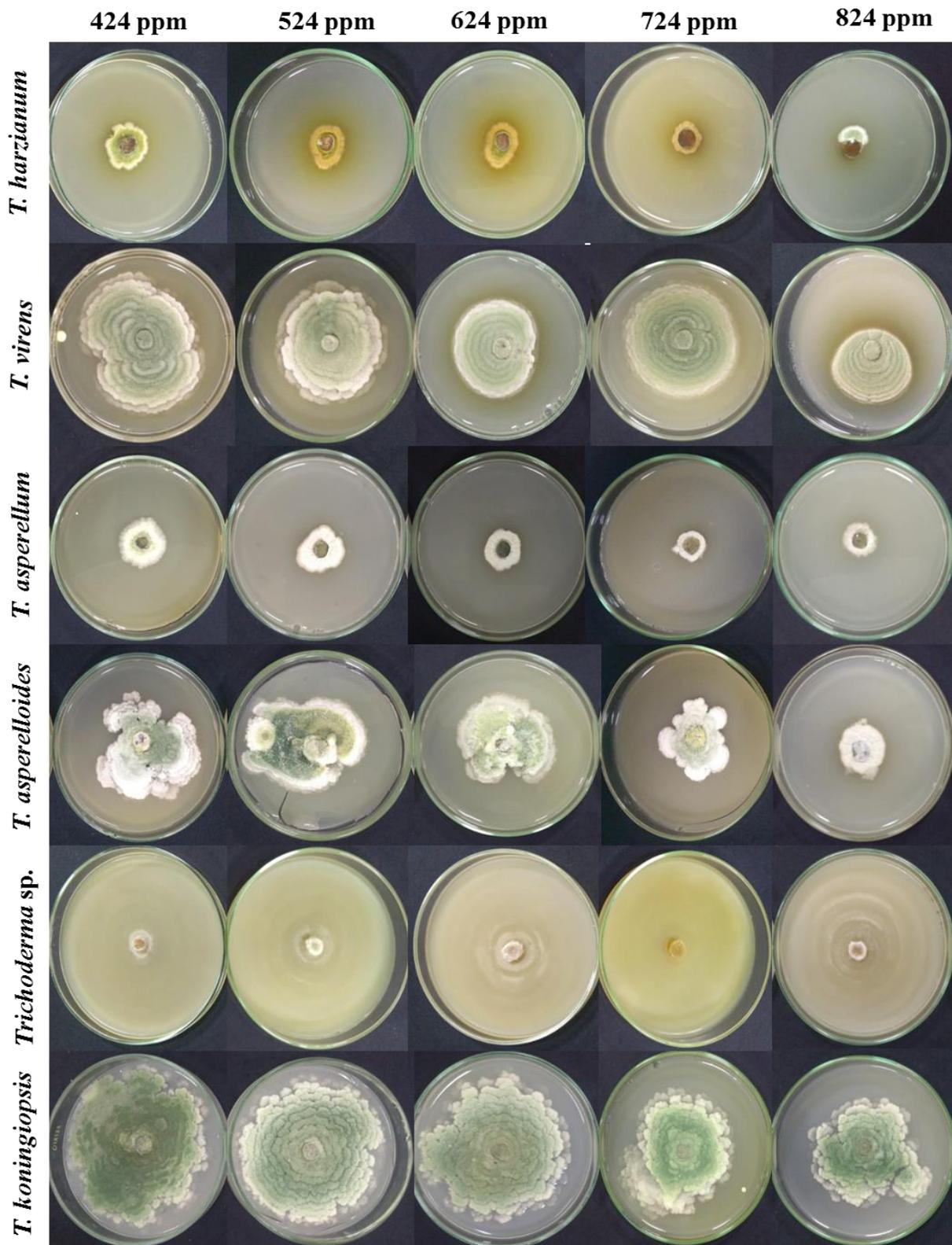


Figura 7. Aspecto colonial de *Trichoderma* spp. em meio BDA suplementado com procimidona.

Tabela 16. Inibição do crescimento micelial (%) de *Trichoderma* spp., em meio BDA suplementado com o fungicida procimidona a diferentes concentrações.

		Inibição micelial (%) ⁽¹⁾				
		Doses (concentração em ppm)				
Ingrediente ativo (grupo químico)	<i>Trichoderma</i>	I (424)	II (524)	III (624)	IV (724)	V (824)
Procimidona (Dicarboximida)	<i>T. harzianum</i> – CEN01	71±0,04a	75±0,04a	74±0,04a	72±0,10a	74±0,08a
	<i>T. virens</i> – CEN507	22±0,06d	35±0,12cd	59±0,16ab	48±0,23bc	68±0,09a
	<i>T. asperellum</i> – CEN512	53±0,15b	60±0,08a	52±0,17b	72±0,05a	74±0,06a
	<i>T. asperelloides</i> – CEN1433	35±0,10c	41±0,10bc	45±0,08bc	57±0,15ab	69±0,03a
	<i>Trichoderma</i> sp. - CEN1441	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a
	<i>T. koningiopsis</i> – CEN1452	18±0,10a	19±0,14a	16±0,08a	19±0,09a	20±0,04a

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si estatisticamente pelo teste Tukey 5%.

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Morfologia das colônias de *Trichoderma* spp. em diferentes meios

Inconsistências no crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* foram pouco evidentes, pois todos os isolados ocuparam toda a superfície da placa de Petri (9 cm²) de todos os meios testados, após sete dias de incubação. Quanto às variações morfológicas e a esporulação, estes isolados se comportaram de maneira particular para cada meio. A seletividade dos meios de cultura pode ser obtida utilizando-se fontes específicas de carbono (C) e nitrogênio (N), os quais podem estimular o crescimento de uma determinada espécie e inibir o de outra, ou ainda quando algumas secreções dos microrganismos presentes na placa reagem com os constituintes dos meios de cultura (Alfenas & Mafia, 2007). É interessante ressaltar que os meios BDA e SNA contém baixo teor de açúcar, uma das fontes de carbono utilizada pelos fungos para se desenvolverem e muito utilizado em estudo para avaliar as taxas de crescimento (Nirenberg, 1976).

O BDA é útil em ensaios para a caracterização de colônias e observação de pigmentação, enquanto SNA e CMD apresentam a vantagem de mostrar as características gerais que os fungos do gênero *Trichoderma* apresentam na natureza, comparando aos meios BDA, MEA e ME (Samuels, 2004). Os resultados deste estudo mostram que estes meios demonstraram tais características. Os isolados *T. asperellum* – CEN512 e *Trichoderma* sp. – CEN1441 pigmentaram fortemente o meio CMD. Chaverri & Samuels (2003) notaram a alta variação na espécie *T. harzianum*, em produzir pigmentos em diferentes tons amarelo, marrons e avermelhados.

Segundo Peres & Melo (1995), alguns isolados de *T. harzianum* foram capazes de descolorir o meio BDA com a produção de substâncias metabólicas de coloração, que varia de amarelo claro ao marrom. Os resultados com o isolado desta mesma espécie *T. harzianum* – CEN01 corroboram estes autores, onde foi possível verificar a descoloração apenas do meio

MEA. Contudo, o isolado *Trichoderma* sp. – CEN1441, que ainda não possui a espécie definida, também descoloriu na metade dos meios utilizados, sendo eles, SDAY, CMD, BDA, V8 e MEA. Espécies do complexo *T. harzianum* podem apresentar diferentes morfologias de colônias em meio BDA e SNA (Chaverri *et al.*, 2015).

Uma estratégia de reprodução utilizada pelo fungo é o microciclo de conidiação, um ciclo de vida mais curto onde os conídios germinam e logo em seguida formam outros conídios, sendo o crescimento micelial ausente ou muito reduzido. Em algumas espécies observam-se anéis concêntricos de conidiação em resposta a alternados ciclos de luz e escuridão (Gressel & Galum, 1967; Steyaert *et al.*, 2013). No presente trabalho, os ensaios foram montados em regime de luz/escuro e essas características de esporulação foram visualizadas nos meios SNA, MS, AA, CZA, ME e MEA. Ausência de micélio aéreo foi outra característica bastante observada com os isolados testados. A produção de anéis de conidiação foi observada nos meios: SNA, MS, AA, CZA, ME, MEA, V8 e SDAY para os isolados *T. harzianum* – CEN01, *T. virens* – CEN507 e *T. asperelloides* – CEN1433; MS, SDAY e CZA para *T. asperellum* – CEN512; SNA e V8 para *Trichoderma* sp. – CEN1441 e MS, CZA, V8 e MEA para *T. koningiopsis* – CEN1452.

O aspecto de esporulação esverdeado das colônias de *Trichoderma* spp., observado neste estudo, é uma característica marcante para a maioria das espécies, dentro do gênero (Chaverri & Samuels, 2003). A conidiação a partir do micélio é estimulada quando há combinação apropriada de fatores ambientais, estímulos luminosos, relação Carbono: Nitrogênio, pH do ambiente extracelular, ferimentos físicos no micélio, presença de cálcio e influência de derivados de compostos orgânicos voláteis, sendo reconhecidos por influenciar a produção de esporos (Friedl *et al.*, 2008). Os meios ricos em açúcar como o BDA, demonstraram uma capacidade maior de esporulação para a maioria dos isolados aqui estudados.

Durante muito tempo as espécies de *Trichoderma* foram definidas apenas através de padrões morfológicos. Entretanto, a identificação de espécies com base na morfologia é muitas vezes dificultada pela falta de características que definam claramente variações entre as culturas em nível de espécie. Neste contexto, foi possível verificar que, as espécies estudadas reagem aos componentes dos meios, com aspectos particulares de micélio, esporulação, formação de anéis e pigmentação do meio. O crescimento desses organismos é consequência das fontes nutricionais utilizadas, juntamente com as condições físicas de cultivo. Diante disto os melhores meios foram CMD e BDA, pois proporcionaram para a maioria das espécies trabalhadas, uniformidade de esporulação, micélio denso e cotonoso.

Glicose, glucose ou dextrose, são monossacarídeos e são um dos carboidratos mais importantes na biologia (Nelson & Cox, 2014). Meios contendo esses constituintes e CZA, ME e MEA com outras fontes de açúcar, como sacarose, extrato de malte ou maltose foram responsáveis por uma variação entre os isolados estudados. Observou-se, com esses meios, esporulação escassa em relação aos meios contendo dextrose (BDA, CMD e SDAY). Em conformidade com estes dados, Rossi-Rodrigues *et al.* (2009) testaram diferentes espécies de *Trichoderma* em meios com diferentes fontes nutricionais, como carbono e nitrogênio, elementos essenciais e observaram que a glicose é melhor do que a sacarose como fonte de carbono, por induzir o crescimento de isolados de *Trichoderma*.

Em trabalhos conduzidos por Rossi-Rodrigues *et al.* (2009) o extrato de leveduras e a triptona (um tipo de peptona) foram boas fontes de nitrogênio (N), induzindo o crescimento de *T. hamatum* e *T. harzianum*. Rodrigues (2010) obtiveram respostas a doses de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) no meio de cultura. Os resultados obtidos com os meios preparados a partir de fontes de N como, peptona, extrato de leveduras e nitrato de potássio, exibiram diferentes morfologias das colônias. Vale lembrar que o meio SDAY, que contém peptona e extrato de leveduras proporcionou crescimento micelial e esporulação profusa dos isolados *T.*

harzianum – CEN01, *T. virens* – CEN507, *T. asperellum* – CEN512, *T. asperelloides* – CEN1433 e *T. koningiopsis* – CEN1452. Porém os meios MEA e Martin, que também possuem peptona, reduziram a esporulação desses isolados.

Existem poucos estudos utilizando triptona como fonte de N em meio de cultura e os que existem geralmente são com bactérias. Peptona é mais comumente utilizada para crescimento de fungos como *Trichoderma* spp. (Wiater *et al.*, 2005). Em resposta à peptona como fonte de N, neste estudo, os isolados *T. harzianum* – CEN01, *T. virens* – CEN507 e *Trichoderma* sp. – CEN1441 foram capazes de pigmentar o meio, indicando a produção de substância não identificadas, provavelmente, metabólitos secundários. Variações no aspecto de colônias podem ser decorrentes de efeitos de diferentes pHs do meio de cultivo (Steyaert *et al.*, 2010). Vale ressaltar, no entanto, que todos os meios utilizados tiveram o pH inicial ajustado para 6-6,5. Os meios MS e AA são pobres para suprir as exigências de nutrientes dos isolados, sendo o primeiro, rotineiramente utilizado na avaliação da capacidade germinativa e vigor de sementes, esporos de fungos e o segundo, em isolamento e armazenamento de fungos.

4.4.2. Compatibilidade de espécies de *Trichoderma* a fungicidas e inseticidas recomendados a cultura da alface

Os ingredientes ativos boscalida, imidacloprido, iprodiona, procimidona e tiabendazol exerceram efeitos variáveis sobre o crescimento vegetativo e esporulação dos isolados testados, *T. harzianum* – CEN01, *T. virens* – CEN507, *T. asperellum* – CEN512, *T. asperelloides* – CEN1433, *Trichoderma* sp. – CEN1441 e *T. koningiopsis* – CEN1452.

Alguns dos princípios ativos testados (procimidona, tiabendazol, boscalida e imidacloprido) possuem ação sistêmica ou erradicante. Isso significa que o princípio ativo precisa ser prontamente assimilado pela planta, translocado, e inibir infecções locais e

distantes do local de aplicação, sem afetar os tecidos dos hospedeiros (Garcia, 1999; Picinini, 1994). Os fungicidas de contato ou protetores, como o iprodiona do grupo dicarboximida, ao contrário, precisam ser relativamente insolúveis em água para que a barreira de proteção do hospedeiro não se desfaça. A aplicação de tais produtos deve resultar na inibição na germinação de esporos, promover a ramificação, intumescimento, lise de hifas e inibir o crescimento micelial dos fungos-alvo (Ehr & Kemmitt, 2002). Ótimos resultados foram alcançados com os ingredientes ativos, já que não apresentaram inibição do crescimento micelial nos isolados estudados, exceto o tiabendazol.

Porém, resultados diferentes relacionados a outros grupos químicos, podem ser encontrados na literatura. Divya *et al.* (2011) demonstraram que isolados selvagens de *T. harzianum* foram insensíveis a metade da dose recomendada para o princípio ativo piraclostrobina do grupo químico estrobilurina. O crescimento vegetativo de *T. harzianum* - CEN01, pertencente a essa mesma espécie citada, não foi afetado pelos ingredientes ativos do grupo piridina-carboxamida (também citado como sendo anilida), dicarboximida (iprodiona) e os inseticidas neocotinóides em nenhuma das concentrações.

Estudos abordando a compatibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. com fungicidas e inseticidas recomendados para a alface demonstraram a compatibilidade de *T. asperellum* e *T. asperelloides* com imidacloprido e iprodiona (Silva *et al.*, 2018). Os resultados alcançados por estes autores estão em conformidade com os obtidos neste, reforçando que os ingredientes ativos não exibiram nenhum efeito deletério contra espécies de *Trichoderma*. Porém alguns dados alcançados vão de encontro aos obtidos por esses autores, onde o princípio ativo procimidona não inibiu *T. asperellum*. Para o isolado *T. asperellum* – CEN512 houve inibição do crescimento micelial em 74%.

Tendo em vista tais afirmativas, Bhale & Rajkonda (2015) avaliaram a sensibilidade de *T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* e *T. virens* em meio CZA

suplementados com mancozeb (grupo químico ditiocarbamato) e captan (grupo químico dicaboximida) em diferentes concentrações. Estes autores constataram que em baixas concentrações ocorre o crescimento micelial. Contudo, em concentrações de captan acima de 500 µg/ml (500 ppm) e 5000 µg/ml (5000 ppm) de mancozeb ocorre um decréscimo do crescimento micelial em todas as espécies. A espécie *T. virens* apresentou crescimento micelial até a dose de 400 µg/ml (400 ppm) e *T. harzianum* até a dose 600 µg/ml (600 ppm) de captan, verificando-se crescimento micelial até a concentração 7000 µg/ml (7000 ppm). No presente trabalho, representantes destas mesmas espécies (CEN507 e CEN01) corroboram estes resultados com iprodiona em concentrações entre 550-950 ppm. Todavia, exibiram diferentes percentuais de inibição micelial na presença de procimidona em concentrações entre 424-824 ppm.

No estudo de Vasundara *et al.* (2015) para avaliar a compatibilidade de *T. viride* com produtos químicos e a combinações entre eles em BDA, foi constatada uma variabilidade no desempenho da espécie. No tratamento com mancozeb (3000 ppm) e imidacloprido (2000 ppm) separadamente, a espécie atingiu níveis baixos de inibição (7 e 11%) e, quando misturados (11%). Os resultados aqui obtidos corroboram o referido estudo imidacloprido, embora em concentrações abaixo das citadas por esses autores. Vale enfatizar que efeito sinérgico também tem sido alvo de estudos (Khirallah *et al.*, 2016; Saravanakumar *et al.*, 2016) e deve ser considerado em futuros experimentos com os isolados de *Trichoderma* da Coleção da Embrapa.

Os ensaios com o procimidona afetaram o desenvolvimento de todos os isolados testados. Os melhores resultados (menores inibições) foram alcançados por *Trichoderma* sp. – CEN1441 e *T. koningiopsis* – CEN1452. Segundo Ribas (2010), o ingrediente ativo captana que pertence ao mesmo grupo químico que procimidona interferiu no crescimento vegetativo de isolados de *T. harzianum* e *Trichoderma* sp. nas diferentes concentrações testadas. Ainda

considerando apenas o princípio ativo procimidona, é possível observar que não houve relação entre o aumento da concentração do produto com a diminuição do crescimento vegetativo.

Variações nas colônias verificadas, como ondulações nas bordas (*T. virens* – CEN507 e *T. koningiopsis* – CEN1452), esporulação sem a formação de anéis concêntricos (*T. harzianum* – CEN01, *T. virens* – CEN507, *T. asperelloides* – CEN1433 e *T. koningiopsis* – CEN1452), micélio mais esparso do que a testemunha (*Trichoderma* sp. – CEN1441), intumescimento de micélio (*T. asperelloides* – CEN1433) e redução drástica da esporulação foram comuns aos isolados. Em contraste com estes resultados, Ribas (2010) encontrou evidências de que o efeito inibitório de captana sobre o crescimento micelial de *T. harzianum* em meio BDA aumenta proporcionalmente ao aumento na concentração do produto.

As moléculas químicas utilizadas na agricultura foram desenvolvidas para enfraquecer o fitopatógeno, podendo atuar inibindo a germinação de seus esporos e provocando intumescimento, lise de hifas e interferir na respiração mitocondrial. O fungo antagonista quando compatíveis com estas moléculas, podem conferir uma vantagem competitiva sobre o fitopatógeno, uma vez que as moléculas químicas o enfraquecem, garantindo sua própria sobrevivência e nutrição, desde que ele resista às doses do produto e seja capaz de se desenvolver (Silva & Melo, 2019). Efeitos deletérios sobre *Trichoderma* spp. foram observados, no presente trabalho, apenas nos ensaios com tiabendazol e iprodiona, sendo que no caso de iprodiona, a esporulação é que foi afetada. Estes resultados obtidos dizem respeito a modos de ação das moléculas químicas e rotas metabólicas de *Trichoderma* spp.

Kumar & Mane (2017), utilizando isolados de *T. viride* e *T. harzianum* encontraram inibição de 100% com tiram e carbendazim. Porém, certa compatibilidade foi observada com o inseticida fosetyl AL, registrando crescimento de 1,3 a 57,59%. Kumar *et al.* (2018) não obtiveram sucesso com *T. viride* cultivados em presença de fungicidas à base de tiofanato,

carbendazim e mancozebe + carbendazim (inibições de 81,8 a 94,3%), nas concentrações de 50, 100 e 150 ppm. Esses resultados corroboram os obtidos neste trabalho, com respeito ao tiabendazol do mesmo grupo químico que carbendazim. Carbendazim tem sido citado por diversos pesquisadores como tóxico a *Trichoderma* sp., mesmo em concentrações baixas (Silva *et al.*, 1999; Malathi *et al.*, 2002; Hetong *et al.*, 2008; Nallathambi *et al.*, 2009).

Shovan (2012) demonstrou uma alta sensibilidade, em termos de germinação de conídios de *T. atroviride*, mas *T. asperellum* não se mostrou sensível a baixas concentrações de um fungicida à base de boscalida + piraclostrobina. O isolado *T. asperellum* – CEN512 não se mostrou sensível a nenhuma das concentrações de boscalida. Aliás, todos os isolados testados alcançaram crescimento micelial vegetativo e esporulação satisfatória e homogênea na presença deste ingrediente ativo.

Os isolados de *Trichoderma* trabalhados neste capítulo foram os mesmos utilizados no capítulo anterior (Cap. 3). A diversidade na atuação destes isolados contra os fitopatógenos *S. sclerotinia*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, *R. solani* e *P. ultimum*; que demonstraram bons resultados no antagonismo, agora também demonstrou ótimos resultados na compatibilidade com fungicidas e inseticidas químicos *in vitro*, recomendados a cultura da alface. Além do controle de doenças propriamente dito, muitas linhagens de *Trichoderma* são capazes ainda, de degradar moléculas de fungicidas químicos, tornando o uso simultâneo de fungicidas químicos e biológicos uma prática promissora, considerando o manejo integrado de doenças e a busca por melhor qualidade do ambiente (Alvarenga *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2001).

Estes estudos servem para reforçar a aplicabilidade conjunta de produtos químicos com agentes de biocontrole. Vale ressaltar que, um incentivo à redução de uso de moléculas químicas é justamente a comprovação da capacidade do agente antagonista em sobreviver a

esses produtos, contribuindo para a eficácia alcançada no controle de fitopatógenos, sem maiores prejuízos ambientais.

4.5. CONCLUSÕES

- ✓ Os meios de cultura CMD, BDA, V8 e SDAY foram os que obtiveram maior aspecto da esporulação. Entretanto somente o BDA foi escolhido para a realização dos testes de compatibilidade *in vitro* com produtos químicos.
- ✓ Todos os isolados foram compatíveis à maioria dos ingredientes ativos, nas condições testadas, com exceção apenas ao tiabendazol.
- ✓ O isolado *Trichoderma* - CEN1441 foi o único compatível em 100% das doses com procimidona.
- ✓ Os isolados *T. koningiopsis* - CEN1452 e *T. virens* - CEN507 alcançaram os menores índices de inibição do crescimento micelial nas doses de procimidona.
- ✓ Apenas nos ensaios com iprodiona houve alteração da morfologia das colônias, exceto com o isolado *Trichoderma* sp. – CEN1441.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em fitopatologia. Ed. UFV, 384p., 2007.
- ALVARENGA, D. O.; QUEIROZ, P. R.; ALMEIDA, A. M. & MELLO, S. C. M. Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, v. 168, 24p., 2007.
- BHALE, U. N.; RAJKONDA, J. N.; Compatibility of fungicides and antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against plant pathogens. Bioscience Methods, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2015.
- BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Model selection and multimodel inference : a practical information-theoretic approach; 2nd edition, Springer-Verlag, New York, 488p., 2002.
- CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales): species with green ascospores. Studies in Mycology, v. 48, n. 48, p. 1-116. 2003.

- CHAVERRI, P.; BRANCO-ROCHA, F.; JAKLITSCH, W.; GAZIS, R.; DEGENKOLB, T. & SAMUELS, G. J. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, v. 107, n. 3, 2015.
- CLAFLIN, L. E.; VIDAVER, A. K.; SASSER, M. M. X. P. A semiselective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathology*, v.77, p.730-734, 1987.
- DIVYA, R. V.; NARAYAN, R. P.; UMA, D. G. & SOKKA, R. S. Evaluation of biocontrol agents against *Rhizoctonia solani* f. sp. *sasakii* causing banded leaf and sheath blight of maize. *Indian Journal of Plant Protection*, v. 39, n. 3, p. 208-211, 2011.
- EHR, R. J.; KEMMITT, G. Periodic table of fungicides. Indianapolis: Dow Agrosciences, v. 1, 2002.
- FRIEDL, M. A.; KUBICEK, C. P. & DRUZHININA, I. S. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. *Applied Environment Microbiology*, v. 74, p. 245-250, 2008.
- GARCIA, A. Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. Porto Velho: EMBRAPA – CPAF, Rondônia, 1999. 32p. (EMBRAPA – CPAF Rondônia. Documentos, 46.
- GRESSEL, J. & GALUN, E. Morphogenesis in *Trichoderma*: photoinduction and RNA. *Development Biology*, v. 15, p. 575-598, 1967.
- HETONG, Y.; RYDER, M. & WENHUA, T. Toxicity of fungicides and selective medium development for isolation and enumeration of *Trichoderma* spp. in agricultural soils. *Internacional Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy*, 2008. Disponível em: <http://www.isth.info/methods/method.php?methods_id=8>. Acesso em 26 de março de 2019.
- KHIRALLAH, W.; MOUDEN, N.; SELMAOUI, K.; ACHBANI, EL H.; BENKIRANE, R.; TOUHANI, A. O. & DOUIRA, A. Compatibility of *Trichoderma* spp. with some fungicides under *in vitro* conditions, *International Journal of Recent Scientific Research*, v.7, p. 9060-9067, 2016.
- KUMAR, P.; MANE, S. S. Studies on the compatibility of biocontrol agents with certain fungicides. *Internacional Journal Currently Microbiology Applied Science*, v. 6, n. 3, p. 1639-1644, 2017.
- KUMAR, R.; SINGH, S. K.; YADAV, S.; KUMAR, R.; CHOUBEY, A. K. & KUMARI, A. Compatibility of *Trichoderma viride* with different fungicide and organic cake. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 7, n. 2, p. 2398-2401, 2018.
- LUZ, W. C. Avaliação dos tratamentos biológicos e químico na redução de patógenos em sementes de trigo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, n 1, p. 93-95, 2003.
- MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; PADNAMABAN, P.; MOHANRAJ, D. & RAMESH-SUNDER, A. Compatibility of biocontrol agents with fungicides against red rot disease of sugarcane. *Sugar Tech*, v. 4, n. 3/4, p. 131-136, 2002.
- MANJUNATH, M.; SINGH, A.; TRIPATHI, A. N.; PRAZANNA, R.; RAI, A. B. & SINGH, B. Bioprospecting the fungicides compatible *Trichoderma asperellum* isolate effective

- against multiple plant pathogens in vitro. *Journal of Environmental Biology*, v. 38, p. 553-560, 2017.
- MELO, I. S.; LEVANTEZI, K.; SPESSOTO, A. M. & FEICHTENBERGER, E. Degradação do fungicida metalaxial por linhagens de *Trichoderma* sp. isoladas de solos rizosféricos. In: MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S. & SPESSOTO, A. (Org.) Biodegradação. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 141-165, 2001.
- MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C. & KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial da *Macrophomina phaseolina* in vitro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 1, p. 57-66, 1976.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.
- NALLATHAMBI, P.; UMAMAHESWARI, U.; THAKORE, B. B. L. & MORE, T. A. Post-harvest management of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk) fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) using *Trichoderma* species, fungicides and their combinations. *Crop Protection*, v. 28, p. 525-532, 2009.
- NIENBERG, H. I. 1976. Untersuchungen uber die morphologische und biologische differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. In: PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. Springer, 121p., 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Artmed, 6^a edição, 1298p., 2014.
- PERES, E.; MELO, I. S. Variability among *Trichoderma harzianum* isolates: I – Cytological aspects. *Scientia Agricola*, v. 52, n. 1, p. 56-59, 1995.
- PICININI, E. C. Fungicidas benzimidazóis. Revisão Anual de Patologia Vegetal, v. 2, p. 357-409, 1994.
- RIBAS, P. P. Compatibilidade de *Trichoderma* spp. a princípios ativos de fungicidas comerciais aplicados na cultura do feijão. (Dissertação) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 104p., 2010.
- RODRIGUES, J. *Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum* – Feijoeiro. (Dissertação) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 85p., 2010.
- ROSSI-RODRIGUES, B. C.; BROCHETTO-BRAGA, M. R.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C.; ARRUDA, V. M. & NETTO, J. C. Comparative growth of *Trichoderma* strains in diferente nutritional sources, using Bioscreen C Automated system. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 404-410. 2009.
- SAMUELS, GARY. Methods of molecular identifications and lab. protocols: growth rate/colony radius. *Internacional Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy*, 2004. Disponível em: <http://www.isth.info/methods/method.php?method_id=4> Acesso em 10 de abril, 2019.

- SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L. A. & PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, v. 94, p. 146-168. 2002.
- SARAVANAKUMAR, K.; YU, C.; DOU, K.; WANG, M. & CHEN, Y. L. J. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*, v. 94, p. 37-46, 2016.
- SATHIYASEELAN, K.; SIVASAKTHIVELAN, P.; LENIN, G. Evaluation of antagonistic activity and shelf life study of *Trichoderma viride*. *Botany Research International*, v. 2, n. 3, p. 195-197, 2009.
- SHOVAN, L. R. Characterization of *Botrytis cinerea*, *Trichoderma* species and other fungi, including studies on inhibitory effects of chitosan and fungicides. (Master thesis). Publisher: Norwegian Journal of Agricultural Sciences, 2012. Disponível em: <<https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/186353/Thesis%20FINAL%20PRINT%20%284%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 20 de Fev. 2019.
- SILVA, M. A. F.; MOURA, K. E.; MOURA, K. E.; SALOMÃO, D. & PATRICIO, F. R. A. Compatibility of *Trichoderma* isolates with pesticides used in lettuce crop. *Summa Phytopathologica*, v. 44, n. 2, p. 137-142, 2018.
- SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. Biodegradação de fungicidas benzimidazóis. Embrapa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Melo_BiodegradacaoFungicidasBenzimidazois_000fdqbaqe302wx5eo0a2ndxyjebw1mn.pdf>. Acesso: 26 de março de 2019.
- STEYAERT, J. M.; WELD, R. J. & STEWART, A. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biology*, v. 114, p. 198-208, 2010.
- STEYAERT, J. M.; WELD, R. J.; MENDOZA, A.; KRYŠTOFOVÁ, S.; ŠIMKOVIC, M.; VARECKA, L.; STEWART, A. Asexual development in *Trichoderma*: from conidia to chlamydospores. In: MUKHERJEE, P. K. *et al.* (Eds.). *Trichoderma: biology and applications*. CAB International, p. 87–109, 2013.
- VASUNDARA, P.; RANGASWAMY, V. & JOHNSON, M. Compatibility studies with fungicides, insecticides and their combinations on *Trichoderma viridae* *in vitro* conditions. *Internacional Journal of Scientific & Engineering Research*, v. 6, n. 2, p. 310-316, 2015.
- WIATER, A.; SZCZODRAK, J.; PLESZCZYŃSKA, M. & PRÓCHNIAK, K. Production and use of mutanase from *Trichoderma harzianum* for effective degradation of *Streptococcal mutans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 137-146. 2005.
- ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C. & MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos, In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. *Métodos em fitopatologia*. Ed. UFV. cap 1. p. 23-50. 2007.

CAPÍTULO 5

Reação de cultivares de alface à aplicação de *Trichoderma* spp. visando à promoção de crescimento

RESUMO

Os efeitos benéficos de *Trichoderma* spp. em plantas compreendem características como a capacidade de antagonizar fitopatógenos, incluindo os habitantes do solo por uma combinação de lise enzimática, secreção de antibióticos e competição por espaço e substratos. O fungo *Trichoderma* também pode interagir intimamente com raízes de plantas, colonizando as camadas externas da epiderme, atuando como oportunistas e simbiosites de plantas. Desta forma, tais organismos podem promover o crescimento vegetal, incrementando a massa de raízes e partes aéreas. O objetivo deste estudo foi averiguar o efeito da aplicação de *Trichoderma* spp. em três cultivares de alface (BRS Lélia, BRS Leila e BRS Mediterrânea).. As suspensões de *Trichoderma* foram preparadas com a concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL e aplicadas no momento da sementeira, junto às sementes no sulco de plantio do vaso. Os isolados de *Trichoderma* utilizados promoveram crescimento nas mudas tratadas, em relação às testemunhas. A cultivar BRS Leila apresentou incremento de 44, 45, 15 e 23,94% nas variáveis: massa fresca de raiz e de parte aérea, altura de planta e comprimento de raiz, com *T. virens*, *T. koningiopsis* e *T. harzianum*. Para 'BRS Lélia' os valores foram de 30, 36,71, 13,72 e 13,33% com *T. asperellum* e *T. asperelloides* e para a cultivar BRS Mediterrânea foram de 75, 78,45, 44,37 e 40,61%, considerando-se as mesmas variáveis, com aplicação de *T. virens*, *T. asperellum* e *T. asperelloides*. O isolado *T. virens* - CEN507 foi o que mais contribuiu para o incremento das variáveis e a cultivar BRS Mediterrânea respondeu melhor às inoculações dos isolados de *Trichoderma*, enquanto 'BRS Lélia' apresentou o menor desempenho nas condições testadas.

Palavras-chave: controle biológico, genótipos de alface, fungos antagonistas, *Lactuca sativa*, microbiolização.

ABSTRACT

The beneficial effects of *Trichoderma* spp. in plants include characteristics such as the ability to antagonize phytopathogens, including soil inhabitants by a combination of enzymatic lysis, antibiotic secretion and competition for space and substrates. The fungus *Trichoderma* can also interact closely with plant roots, colonizing the outer layers of the epidermis, acting as plant opportunists and symbionts. Thus, such organisms can promote plant growth by increasing the mass of roots and aerial parts. The aim of this study was to investigate the effect of *Trichoderma* spp. in three lettuce cultivars (BRS Lélia, BRS Leila and BRS Mediterranean). *Trichoderma* suspensions were prepared with a concentration of 1.0×10^7 conidia/mL and applied at sowing time, along with the seeds in the planting furrow pot. *Trichoderma* isolates promoted growth in the treated seedlings in relation to the control. The cultivar BRS Leila presented an increase of 44, 45, 15 and 23,94% in the variables: fresh root and shoot mass, plant height and root length, with *T. virens*, *T. koningiopsis* and *T. harzianum*. For 'BRS Lélia' the values were 30, 36.71, 13.72 and 13.33% with *T. asperellum* and *T. asperelloides* and for the cultivar BRS Mediterranean were 75, 78.45, 44.37 and 40, 61%, considering the same variables, with the application of *T. virens*, *T. asperellum* and *T. asperelloides*. The isolate *T. virens* - CEN507 contributed the most to the increase of the variables and the cultivar BRS Mediterranean responded better to inoculations of *Trichoderma* isolates, while 'BRS Lélia' presented the lowest performance under the tested conditions.

Key words: biological control, lettuce genotypes, antagonistic fungi, *Lactuca sativa*, microbiolization.

5.1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família Asteraceae, subfamília Cichorioideae e tribo Lactuceae (Ryder, 1999). A Asteraceae (previamente denominada de Compositae) é a maior família dentro das dicotiledôneas e uma das mais importantes hortaliças folhosas cultivadas no mundo. A planta tem porte herbáceo com folhas alternas presas ao caule curto, lisas ou crespas, verdes ou arroxeadas, podendo ou não formar "cabeça", a depender das inúmeras cultivares disponíveis no mercado. Seu ciclo é anual, o que permite o plantio durante todo o ano, em diversos sistemas de produção, e suas sementes podem ser aproveitadas para novos plantios (Ryder, 1999; Sala & Costa, 2016; Azevedo Filho, 2017).

A produção de mudas de alface é feita em sementeira. Todas as sementes produzidas sob ação direta do ambiente podem carregar consigo fungos e bactérias que prejudicam a qualidade fisiológica da semente (Marcos Filho, 2005). Na tentativa de minimizar este processo, existem técnicas que podem prolongar a qualidade fisiológica da semente, dentre elas, o tratamento de sementes. O tratamento de sementes pode ser definido como a aplicação de produtos com o propósito de proteger a semente do ataque de pragas e patógenos ou melhorar a sua capacidade de produzir uma planta normal (Embrapa, 2005). Outros autores definem como sendo a aplicação de processos e substâncias que preservem ou aperfeiçoem o desempenho das sementes, permitindo que as culturas expressem todo seu potencial genético. Inclui a aplicação de defensivos (fungicidas, inseticidas), produtos biológicos, inoculantes, estimulantes, micronutrientes, entre outros, ou a submissão a tratamento térmico ou outros processos físicos (Menten & Moraes, 2010). Dentre os produtos biológicos e estimulantes, estão produtos à base de *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* apresenta espécies que exercem antagonismo contra vários fungos fitopatogênicos, por diversos mecanismos de ação, por isso vem sendo amplamente estudados como agentes de biocontrole. Promoção de crescimento vegetal, é um mecanismo de controle biológico indireto, pelo qual a ação desses fungos traz melhoria na germinação e sanidade de sementes (Ethur *et al.*, 2006), incrementando também o desenvolvimento de raízes e partes aéreas e tornando as plantas mais resistentes à invasão por fitopatógenos. Efeitos positivos na utilização de *Trichoderma* como promotor no crescimento de plantas foi relatado por vários pesquisadores, em um número considerável de espécies agrícolas (Monte, 2001; Lucon, 2009; Junges *et al.*, 2016).

Trichoderma pode ser encontrado em diversos ambientes e há isolados capazes de estabelecer interações simbióticas com as raízes das plantas, possibilitando aumento na qualidade e na produção de biomassa, através da síntese de substâncias estimuladoras de crescimento, como fitohormônios, aumento na disponibilidade de nutrientes pela solubilização de minerais por seus metabólitos secundários, estímulo na absorção desses nutrientes presentes no solo (Harman *et al.*, 2004), reduzindo os gastos com adubação. Diante do exposto, o objetivo deste ensaio foi analisar o efeito de *Trichoderma* spp. em diferentes cultivares de alface, aplicados no sulco de plantio.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Cultivares de alface e isolados de *Trichoderma* utilizados

Foi escolhido as cultivares representantes do tipo varietal crespa por causa dos seus desempenhos no Capítulo 2. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação com os mesmos isolados de *Trichoderma* utilizadas nos capítulos anteriores (Cap 3. e Cap 4.), e com as cultivares de alface BRS Leila, BRS Lélia e BRS Mediterrânea. Os isolados foram

multiplicados em placas de Petri conforme descrito nos capítulos anteriores e incubados em estufa incubadora BOD (Nova Técnica[®]) por sete dias. Após este período, as placas foram retiradas, levadas a câmara de fluxo contínuo e tiveram suas suspensões de esporos obtidas pela raspagem, em água destilada autoclavada, da superfície do meio colonizada pelo fungo. As suspensões fúngicas foram coletadas em tubo falcon e submetidas à agitação em vórtex para a dispersão de esporos e homogeneização. Uma alíquota de 200 µL dessa suspensão homogeneizada foi acondicionada em câmara de Neubauer, para contagem dos esporos.

5.2.2. Testes de promoção de crescimento *in vivo*

As suspensões de *Trichoderma* spp. coletadas como descrito no parágrafo anterior tiveram a concentração de esporos ajustada para 1×10^7 conídios por mL. Vasos de um 1.000 mL de capacidade, contendo substrato autoclavado, foram inoculados com 2 mL de suspensão, com o auxílio de pipeta, no momento da semeadura. Os vasos foram distribuídos ao acaso nas bancadas da casa de vegetação e movimentados a cada 10 dias. Manteve-se uma planta por vaso. As variáveis altura de planta, comprimento de raiz, massa fresca de raiz e de parte aérea foram avaliadas ao final de 30 dias após a semeadura, com o auxílio de uma régua milimetrada e uma balança de precisão (Adaptado Junges *et al.*, 2016).

5.2.3. Delineamento experimental e Análise estatística

O ensaio foi composto por 15 tratamentos, constituídos pelas três cultivares e cinco isolados de *Trichoderma* (CEN01, CEN507, CEN512, CEN1433 e CEN1452), com cinco repetições cada, arrançados em esquema fatorial 3 x 5, em distribuição inteiramente ao acaso. As variáveis peso fresco de raiz e de parte aérea, altura da planta e comprimento de raiz foram analisadas com o modelo ANOVA e as médias comparadas com ajuste de p-valor pelo teste de Tukey. Nestas análises, foi utilizado o pacote Emmeans do software R (Burnhan & Anderson, 2002).

5.3. RESULTADOS

Aos 30 dias após a instalação do experimento, as plantas de alface foram coletadas e foi possível verificar diferença na massa fresca de raiz, massa fresca de parte aérea, altura da planta e comprimento de raiz, com resultados diferentes entre as cultivares e isolados testados. O melhor desempenho em termos de massa fresca de raiz para a cultivar BRS Leila foi obtido com o isolado *T. virens* - CEN507 com média de 11,97 g, e incremento aproximado de 44% em relação à testemunha (Tabela 17). Para a cultivar BRS Lélia não houve diferença estatística entre os isolados utilizados, cujas médias ficaram entre 7,43 a 9,92 g. Já para a cultivar BRS Mediterrânea, novamente o isolado *T. virens* - CEN507 foi superior com média 13,28 g. Contudo, esse não diferiu estatisticamente de *T. koningiopsis* - CEN1452, que apresentou média de 9,94 g. Este, por sua vez, não diferiu significativamente dos isolados *T.harzianum* - CEN01, *T. asperelloides* - CEN1433 e *T.asperellum* - CEN512, com médias de 7,26, 7,88 e 8,60 g, respectivamente.

Tabela 17. Massa fresca de raiz (M.F.R) (g) de diferentes cultivares de alface aos 30 dias após inoculação (DAI) com *Trichoderma* spp. (Brasília, Distrito Federal, 2018)

Isolado de <i>Trichoderma</i>	M.F.R por cultivar (g)		
	‘BRS Leila’	‘BRS Lélia’	‘BRS Mediterrânea’
<i>T. harzianum</i> - CEN01	6,80±1,66b	9,15±2,71a	7,26±2,27bc
<i>T. virens</i> - CEN507	11,97±3,38a	7,43±3,13a	13,28±2,01a
<i>T. asperellum</i> - CEN512	7,90±1,19ab	9,92±1,77a	8,60±1,33b
<i>T. asperelloides</i> - CEN1433	8,18±2,37ab	8,85±2,03a	7,88±2,99b
<i>T. koningiopsis</i> - CEN1452	8,30±2,23ab	8,53±2,22a	9,94±1,22ab
Testemunha	6,72±2,38b	6,96±3,05a	3,30±1,79c

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a nível de 5 % pelo teste Tukey.

Para a massa fresca de parte aérea, não se verificou diferença significativa entre os isolados de *Trichoderma* testados, nas cultivares BRS Leila e BRS Lélia. Já a cultivar BRS

Mediterrânea apresentou melhor resposta em termos de incremento de massa fresca de parte aérea, quando inoculado com *T. virens* - CEN507, de aproximadamente 80% em relação à testemunha, considerando a média de 20,14 g (Tabela 22). Os isolados *T. asperelloides* - CEN1433, *T. asperellum* - CEN512 e *T. koningiopsis* - CEN1452 atingiram médias de 15,14, 16,30 e 16,54 g, respectivamente. O isolado *T. harzianum* - CEN01 foi o que apresentou o menor desempenho com 11,66 g (Tabela 18).

Tabela 18. Massa fresca da parte aérea (M.F.P.A) (g) de diferentes cultivares de alface aos 30 dias após inoculação (DAI) com *Trichoderma* spp. (Brasília, Distrito Federal, 2018).

Isolado de <i>Trichoderma</i> sp.	M.F.P.A por cultivar (g)		
	‘BRS Leila’	‘BRS Lélia’	‘BRS Mediterrânea’
<i>T.harzianum</i> - CEN01	11,62±3,46a	11,57±4,80a	11,66±3,33bc
<i>T.virens</i> - CEN507	13,70±2,02a	9,83±7,63a	20,14±4,66a
<i>T. asperellum</i> - CEN512	10,78±1,33a	15,17±5,79a	16,30±4,35ab
<i>T. asperelloides</i> - CEN1433	10,90±3,73a	12,58±3,05a	15,14±5,31ab
<i>T. koningiopsis</i> - CEN1452	12,40±1,90a	13,20±2,89a	16,54±3,69ab
Testemunha	7,48±2,52a	9,60±4,54a	4,34±2,26c

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a nível de 5 % pelo teste Tukey.

Para a variável altura de planta, novamente a cultivar BRS Mediterrânea apresentou diferença significativa ao ser tratada com diferentes isolados de *Trichoderma* (Tabela 19). Todos os isolados se agruparam de maneira similar e com comportamento superior à testemunha, apresentando médias entre 14,04 e 16 cm de altura, com aumento variando entre 36 a 45% em relação à testemunha. Os resultados obtidos para comprimento de raiz foram os mais heterogêneos entre as cultivares. Para a cultivar BRS Leila, o isolado *T. harzianum* - CEN01 contribuiu para o maior crescimento, correspondente a 17,75 cm e um incremento aproximado de 24% em relação a testemunha, contudo não diferindo significativamente dos isolados *T. virens* - CEN507, *T. asperelloides* - CEN1433, *T. koningiopsis* - CEN1452 e *T.*

asperellum - CEN512. Estes apresentaram médias entre 15,75 a 16,50 cm, exibindo um aumento de 14 a 19% (Tabela 19).

Tabela 19. Altura de planta (A.P) (cm) de diferentes cultivares de alface aos 30 dias após inoculação (DAI) com *Trichoderma* spp. (Brasília, Distrito Federal, 2018).

Isolado de <i>Trichoderma</i> sp.	A.P por cultivar (cm)		
	‘BRS Leila’	‘BRS Lélia’	‘BRS Mediterrânea’
<i>T.harzianum</i> - CEN01	13,00±0,00a	11,78±2,02a	14,04±1,44a
<i>T.virens</i> - CEN507	14,00±0,82a	10,28±3,25a	16,00±1,15a
<i>T. asperellum</i> - CEN512	11,50±1,29a	11,43±1,65a	15,30±1,10a
<i>T. asperelloides</i> - CEN1433	13,00±1,41a	12,75±1,72a	15,30±1,60a
<i>T. koningiopsis</i> - CEN1452	14,25±0,96a	11,83±2,77a	15,06±0,44a
Testemunha	12,10±0,22a	11,00±1,00a	8,90±1,02b

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a nível de 5 % pelo teste Tukey

Conforme a Tabela 20, este grupo não diferiu significativamente da testemunha, com média de 13,50 cm de comprimento de raiz. A cultivar BRS Lélia apresentou resultado similar para todos os isolados de *Trichoderma* spp., não diferindo estatisticamente da testemunha, ainda que o isolado *T. asperellum* - CEN512 apresentasse a maior média (19,50 g). O resultado inferior obtido com esta cultivar foi com o isolado *T. harzianum* - CEN01, cuja média de 15,25 g, foi inferior à testemunha (16,90 g).

A variação no desempenho dos isolados também ocorreu com a cultivar BRS Mediterrânea, onde o isolado *T. asperelloides* - CEN1433 diferiu estatisticamente dos demais, com médias de 22,06 contra 13,10 cm na testemunha, somando um incremento de aproximadamente 40%. O isolado *T. asperellum* - CEN512 diferiu significativamente da testemunha, com média de 17,02 cm, apresentando um aumento de 23% em relação a este tratamento (Tabela 20).

Tabela 20. Comprimento de raiz (C.R.) (cm) de diferentes cultivares de alface aos 30 dias após inoculação (DAI) com *Trichoderma* spp. (Brasília, Distrito Federal, 2018).

Isolado de <i>Trichoderma</i> sp.	C.R. por cultivar (cm)		
	‘BRS Leila’	‘BRS Lélia’	‘BRS Mediterrânea’
<i>T.harzianum</i> - CEN01	17,75±2,75a	15,25±0,76b	16,24±2,15bc
<i>T.virens</i> - CEN507	15,75±2,22ab	18,03±2,00ab	16,58±1,43bc
<i>T. asperellum</i> - CEN512	16,50±1,29ab	19,50±3,27a	17,02±1,15b
<i>T. asperelloides</i> - CEN1433	15,75±2,22ab	17,33±0,52ab	22,06±2,12a
<i>T. koningiopsis</i> - CEN1452	15,75±1,50ab	17,00±1,26ab	15,46±1,34bc
Testemunha	13,50±1,94b	16,90±3,13ab	13,10±3,25c

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a nível de 5 % pelo teste Tukey.

5.4. DISCUSSÃO

Segundo Harman *et al.* (2004) um dos efeitos de *Trichoderma* sobre a planta é a promoção do crescimento, o qual resulta da interação simbiótica estabelecida pelo fungo com espécies vegetais. Os resultados deste estudo mostram maior peso fresco de raiz em duas das cultivares testadas, BRS Leila e BRS Mediterrânea. O potencial de *Trichoderma* spp. em promover o desenvolvimento de raízes de plantas tem sido relatado em outras culturas de importância agrícola, além da alface, como mamoeiro, soja, milho, eucalipto, pepineiro e pimentão (Carvalho Filho, 2008; Tavares, 2009; Fontenelle *et al.*, 2011; Silva *et al.* 2016). Yedidia *et al.* (2001) sugerem que este efeito nas raízes é devido ao aumento proporcionado à área radicular. Raízes mais desenvolvidas permitem que as plantas explorem um volume maior de solo e conseqüentemente absorvem maior quantidade de nutrientes disponíveis.

Em relação à massa fresca de parte aérea, apenas a cultivar BRS Mediterrânea apresentou aumento significativo em comparação com à testemunha. Este efeito benéfico de *Trichoderma* é de grande importância para o aumento da produtividade da alface, visto que o produto final comercializado são as folhas. A aplicação de *Trichoderma* spp. logo no

momento da sementeira, resultou na promoção de crescimento inicial de plantas de alface. Fisiologicamente o crescimento inicial é o momento onde a planta necessita de maior incremento em folhas e caules, para a formação de toda maquinaria fotossintética (Taiz & Zeiger, 2006).

O melhor desempenho de altura de planta obtido com cultivar BRS Mediterrânea está próximo aos valores verificados no estudo conduzido por Silva *et al.* (2015), que alcançaram incremento de 34% em relação à testemunha, com a cultivar Regina, utilizando isolados desse fungo. A habilidade de *Trichoderma* em promover ganhos de altura de plantas têm sido atribuídas à produção de hormônios e à maior eficiência no aproveitamento de nutrientes (Lucon, 2009).

Outro mecanismo de ação que fungos do gênero *Trichoderma* sobre as plantas é a produção de compostos orgânicos voláteis, que têm sido relacionadas com a promoção de crescimento de plantas. Lee *et al.* (2016) identificaram vários terpenos derivados de *Trichoderma*, comprovadamente promotores de crescimento em plantas. A exposição de *Arabidopsis thaliana* a esses compostos induziram o aumento da biomassa vegetal (de 31 a 46%) e no teor de clorofila (82 a 89%) em comparação com as plantas não expostas a esses compostos de *Trichoderma*. Além disso, os autores observaram que essas mudanças mediadas por tais compostos são espécies-específicas e dependentes do isolado de *Trichoderma* utilizado.

Os dados obtidos de acréscimo de comprimento radicular em plantas de alface estão em conformidade com Silva *et al.* (2015). Estes autores sugeriram que *Trichoderma* atua como promotor de crescimento radicular, quando obtiveram ganhos de até 1,58 cm em comparação com as médias da testemunha, aos 21 dias após a sementeira. De acordo com Altomare *et al.* (1999), no solo os nutrientes sofrem equilíbrio dinâmico de solubilização e insolubilização,

influenciado pela microflora, que afeta diretamente a absorção destes pelas raízes das plantas. Estes autores postulam que o crescimento vegetal promovido por *Trichoderma* pode decorrer da capacidade de solubilização de nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas.

Estudos abordando o fungo *Trichoderma* em relação ao crescimento vegetativo e incremento de produção de plantas tem aumentado, principalmente pelo fato de que estes possuem substâncias que podem aumentar o desenvolvimento radicular, fazendo com que a planta absorva melhor os nutrientes essenciais para o seu crescimento. Ousley *et al.* (1993) observaram que alguns isolados de *Trichoderma* inibem a germinação de sementes de alface, mas também promoveram o crescimento das plantas, isto podendo depender também do isolado e do método de preparação e aplicação do inóculo.

Os efeitos benéficos de *Trichoderma* spp. em plantas compreendem características como a capacidade de antagonizar patógenos habitantes do solo por uma combinação de lise enzimática, secreção de antibióticos e competição por espaço e substratos. Além disso, é conhecido que alguns isolados de *Trichoderma* interagem intimamente com raízes de plantas, colonizando as camadas externas da epiderme, e atuando como oportunistas e simbiontes de plantas (Shoresh *et al.*, 2010).

Segundo Cordier & Alabouvette (2009), a introdução de antagonistas no solo provoca alterações na microbiota; Longa *et al.* (2009) afirmam que a aplicação de agentes biocontroladores no ambiente do solo pode afetar temporariamente a densidade das populações naturalmente encontradas nesses ambientes. Para Benítez *et al.* (2004), a habilidade de se desenvolver numa ampla faixa de pH é um importante componente das complexas características de *Trichoderma* spp., fazendo com que o antagonista se sobressaia sobre o restante dos microrganismos ali presentes e que não possuem a capacidade de adaptação a uma ampla faixa de pH.

Vários fatores, como disponibilidade de água e tipo de solo, temperatura, umidade, nutrientes, matéria orgânica e pH do solo influem no crescimento de *Trichoderma* spp. A resposta do fungo a estes fatores é pouco conhecida, podendo ocasionar oscilação de desempenho no controle de doenças em diferentes locais e épocas do ano (Howell, 2003). Nos casos onde o agente de controle biológico apresente resultados inconsistentes em campo, uma abordagem integrada, como a combinação de controle de doenças de plantas com aspectos agronômicos favoráveis à produção vegetal, pode melhorar a eficiência do isolado de *Trichoderma* utilizado (Spadaro & Gullino, 2005).

Os resultados alcançados até aqui, demonstram a importância e a diversidade do uso de fungos do gênero *Trichoderma*. Os isolados destes antagonistas escolhidos tiveram sua eficiência comprovada nos testes de pareamento de culturas contra fitopatógenos e na compatibilidade com fungicidas e inseticidas químicos, *in vitro*. Adicionalmente, estes isolados contribuíram para a promoção de crescimento de plantas de alface (cultivar BRS Leila) em casa de vegetação após 30 de inoculação do fungo. Estes resultados devem contribuir ainda mais para o conhecimento do controle biológico de doenças de plantas, por mecanismos diretos e indiretos de *Trichoderma*.

5.5. CONCLUSÕES

- ✓ O isolado CEN507 foi o que mais contribuiu para o incremento das variáveis analisadas.
- ✓ A cultivar BRS Mediterrânea foi a que melhor respondeu entre as cultivares e BRS Lélia a pior, porém com incremento em todas as variáveis.

5.6. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 7, p. 2926-2933, 1999.
- AZEVEDO FILHO, J. A. A cultura da alface, *In*: COLLARICCIO, A; CHAVES, A. L. R. Boletim Técnico. Aspectos fitossanitários da cultura da alface, Instituto Biológico, n. 29, p. 9-14, 2017.
- BENITÉZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C. & CÓDON, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Internacional Microbiology*, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach; 2nd edition, Springer-Verlag, New York, 488p., 2002.
- CARVALHO FILHO, M.R.; MELLO, S.C.M.; SANTOS, R.P. & MENÊZES, J.E. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 13p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 226).
- CORDIER, C.; ALABOUVETTE, C. Effects of the introduction of a biocontrol strain of *Trichoderma atroviride* on non target soil micro-organisms. *European Journal of Soil Biology*, v. 45, n. 3, p. 267-274. 2009.
- EMBRAPA. Sistemas de Produção, Versão eletrônica Dezembro/2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafr SulMG/glossario.htm>> Acesso em: 06 de abril 2019.
- ETHUR, L. Z.; DA ROCHA, E. K.; MILANESI, P.; MUNIZ, M. F. B. & BLUME, E. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. *Ciência e Natura*, v. 28, n. 2, p. 17-27, 2006.
- FONTENELLE, A.D.B.; GUZZO, S.D.; LUCON, C.M.M.; HAKAKAVA, R. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection*, v.30, p.1492-1500, 2011.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I. & LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, v. 2, p. 43–56. 2004.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, v. 87, p. 4-10, 2003.
- JUNGES, E.; MUNIZ, M. F.; MEZZOMO, R.; BASTOS, B. & MACHADO, R. T. *Trichoderma* spp. na produção de mudas de espécies florestais. *Floresta e Ambiente*, v. 23, n. 2, p. 237-244, 2016.

- LEE, S.; YAP, M.; BEHRINGER, G.; HUNG, R., & BENNETT, J. W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, v. 3, n. 7, p. 2-14, 2016.
- LONGA, C. M. O.; SAVAZZINI, F. S. A.; TOSI, S.; ELAD, Y. & PERTOT, I. Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *Journal Applied Microbiology*, v. 5, p. 49-57. 2009.
- LUCON, C. M. M. 2009. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. (em linha). Infobibos, Informações Tecnológicas. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/Trichoderma/index.htm> Acesso: 04 Fev.2019.
- MARCOS FILHO, J. Fisiologia de semente de plantas cultivadas. Piracicaba, Fealq, 495p. ISBN 85-7133-038-7, 2005.
- MENTEN, J. O.; MORAES, M. H. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefícios. *Informativo ABRATES*, v. 20, n. 3, 20p., 2010.
- MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, v. 4, p. 1-4, 2001.
- OUSLEY, M. A.; LYNCH, J. M. & WHIPPS, J. M. Effect of *Trichoderma harzianum* on plant growth; a balance between toxicity and growth promotion. *Microbiology ecology*, v. 26, p. 277-285, 1993.
- RYDER, E. J. Lettuce, Endive and Chicory: crop production science in Horticulture, 9. 1 ed. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Salinas, California. CABI Publishing, New York, p. 224, 1999.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P. Melhoramento de alface, *In*: NICK, C.; BÓREM, A. Melhoramento de Hortaliças, (eds.) UFV, Viçosa, MG, 2016.
- SHORESH, M.; HARMAN, G. E. & MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, v. 48, p. 21-43, 2010.
- SILVA, G. B. P.; HECKLER, L. I.; SANTOS, R. F.; DURIGON, M. R. & BLUME, E. Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Revista Caatinga*, v. 28, n. 4, p. 33-42, 2015.
- SILVA, L. R. DA SILVA.; GUIMARAES, M. G.; FREITAS, R. J.; PELÁ, A. & CARVALHO, D. D. C. Ácidos húmicos para obtenção de maior massa fresca inicial em plantas de feijão comum 'Pérola'. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 11, n. 2, p. 6-10, 2016.
- SPADARO, D.; GULLINO, M. L. Improving the efficacy of biocontrol agents against soil-borne pathogens. *Crop Protection*. v. 24, p. 601-613, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 720p., 2004.
- TAVARES, G.M. Podridão do pé do mamoeiro: infestação em solos de cultivo, controle alternativo com indutores de resistência e *Trichoderma* e avaliação dos mecanismos de

defesa envolvidos. (Tese) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 113p., 2009.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças de plantas precisam ser controladas, haja vista a demanda por qualidade e a abundância de alimentos para a população, em todo o mundo. Diferentes abordagens podem ser usadas para prevenir, mitigar ou controlar doenças de plantas, incluindo práticas agronômicas e de sanitização. Entretanto, os produtores muitas vezes dependem fortemente de fertilizantes e produtos químicos, ainda que todo sistema de produção tem suas exceções e limitações ao uso dos mesmos.

Diante desse fato, o controle de fitopatógenos presente no solo continua sendo um desafio para pequenos e grandes produtores. Mas, com o avanço da pesquisa na agricultura, fomentado por órgãos governamentais (empresas estatais e universidades) e em alguns casos por iniciativas privadas, novas tecnologias têm sido inseridas no mercado produtivo. Dentre estas, destacam-se os produtos de base biológica, principalmente os agentes de biocontrole, entre os quais se inserem os fungos do gênero *Trichoderma*.

O efeito de *Trichoderma* no desenvolvimento de plantas tem importantes implicações econômicas, tais como diminuir o período de crescimento e, portanto, de permanência das mudas nos viveiros, melhoria do vigor de plantas, aumento da produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos. Ainda sobre este fungo, existe uma variabilidade intraespecífica muito grande, comprovada por vários autores na literatura, a ser explorada. Vale, portanto, dizer que o sucesso no controle biológico depende em grande parte da escolha da linhagem do fungo e do conhecimento de suas interações com a espécie vegetal de interesse.

A respeito de ensaios com produtos químicos, é importante frisar que eles devem estar registrados para a cultura testada no MAPA. A busca por isolados de *Trichoderma* compatíveis com moléculas químicas, devem sempre utilizar o produto comercial puro e tomar por base a dose comercial recomendada para o controle do fitopatógeno estudado. Isso

faz com que as respostas sejam mais claras quanto à capacidade do isolado de crescer e esporular quando este é inoculado em meio BDA suplementado com tais produtos.

À medida que os bancos genéticos e coleções de culturas existentes no país forem explorados, novas espécies e linhagens procedentes dos diferentes nichos com potencial de biocontrole serão descobertas e disponibilizadas para o desenvolvimento de bioprodutos. Caracterização e avaliação do potencial de uso, aliadas aos estudos de compatibilidade com produtos químicos nas diversas interações plantas hospedeiras, patógenos e agentes de biocontrole, certamente dará novos *insights* sobre a utilidade desses agentes de biocontrole na agricultura moderna.

CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO

Todas as hipóteses foram respondidas e os objetivos foram alcançados com sucesso, embora os resultados esperados no controle da murcha-de-esclerócio (*S. rolfsii*) em casa de vegetação, com o uso de *T. asperelloides* e *T. koningiopsis*, não tenham se confirmado.

As sementes de alface representantes dos grupos varietais: americana, lisa e crespa foi submetida aos testes de germinação por diferentes métodos. Os métodos testados, ágar-água, papel Germitest e papel filtro, se mostraram eficientes na germinação das sementes, sem causar nenhum dano ao desenvolvimento de plântulas, após 10 dias de incubação a 26 °C. É importante lembrar que, em ensaios envolvendo sementes, os testes de germinação devem preceder quaisquer testes, evitando lotes de sementes de baixo potencial germinativo e, também, testes em sementeiras, quando se tratarem de sementes provenientes de bancos de germoplasmas ou com prazo de validade expirada, em especial tratando-se da alface, que exige o transplante das mudas para o campo ou canteiros definitivos.

Todos os isolados dos fungos fitopatogênicos advindos de campos de produção de alface e feijoeiro de diferentes regiões do Brasil, foram patogênicos à cultura da alface. Porém, estes isolados apresentaram diferentes percentuais de danos às sementes das cultivares testadas. As cultivares Mauren e Vitória de Santo Antão foram as mais afetadas e a cultivar BRS Leila a menos afetada, quando inoculadas artificialmente com os isolados dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*, em placas de Petri. O patógeno que mais causou danos foi *S. rolfsii*, considerando-se ambos os isolados. Ensaios de patogenicidade *in vitro* demonstraram ser viáveis para avaliar a germinação de sementes de alface na presença de fungos fitopatogênicos. Esta técnica pode ser utilizada para testar outras espécies vegetais.

Os isolados de *Trichoderma* utilizados no pareamento de culturas *in vitro* apresentaram diversidade no antagonismo aos isolados de fungos fitopatogênicos advindos de diferentes

cultivos de alface e feijoeiro. Todos os antagonistas foram capazes de reduzir o crescimento micelial dos fitopatógenos testados. Porém, os isolados dos patógenos *R. solani* – RHI23 e *P. ultimum* – PYT555, também foram competidores no meio BDA e não foram inibidos completamente em alguns confrontos. O isolado do antagonista que mais se destacou nos pareamentos de cultura foi *T. asperellum* – CEN512.

Os resultados alcançados com isolados de *T. asperelloides* (CEN1433) e *T. koningiopsis* (CEN1452) selecionados para os testes de casa de vegetação para suprimir a murcha-de-esclerócios (*S. rolfsii*) em mudas de alface, não foram eficientes, mesmo diante a aplicação de diferentes quantidades da suspensão de conídios/mL, ao substrato infestado com *S. rolfsii*–CEN1531. Contudo, a sobrevivência de 50% das mudas tratadas com 20 e 25 mL de *T. asperelloides* – CEN1433 pode ser um indicativo de que uma maior quantidade do antagonista presente no substrato infestado com este patógeno pode contribuir para a sobrevivência das mudas de alface nas condições testadas. Portanto, os ensaios em casa de vegetação devem ser mais aprofundados.

Observações do desenvolvimento das colônias de *Trichoderma* spp. em diferentes meios suplementado com diferentes fontes de carbono e nitrogênio foi suficiente para averiguar o aspecto colonial e contribuíram para a escolha do meio BDA para a suplementação com produtos químicos, nos testes de compatibilidade *in vitro*. Nesses estudos de compatibilidade, todos os isolados foram eficientes em colonizar o meio BDA suplementados com boscalida, iprodiona e imidacloprido, mesmo na presença de doses mais elevadas do ingrediente ativo. Somente o isolado *Trichoderma* sp. – CEN1441 demonstrou ser 100% compatível com os ingredientes ativos testados, exceto com tiabendazol, com o qual nenhum isolado foi compatível. Estudos de compatibilidade entre *Trichoderma* spp. e produtos químicos também devem incluir testes em campo.

Nos ensaios para observar a reação das sementes das cultivares de alface BRS Lélia, BRS Mediterrânea e BRS Leila inoculadas com *Trichoderma* spp., todos os isolados demonstraram capacidade de promover o aumento de massa fresca de raiz e de parte aérea, altura de planta e comprimento de raiz. Entretanto, as cultivares BRS Leila e BRS Lélia sofreram um decréscimo de altura e comprimento de raiz, quando tratadas com *T. asperellum* – CEN512 e *T. harzianum* - CEN01, respectivamente, em relação à testemunha não inoculada. A cultivar BRS Mediterrânea foi a que apresentou melhores respostas quanto à aplicação dos isolados, destacando-se o isolado *T. virens* – CEN507, como promotor de crescimento desta cultivar.

ANEXOS

ANEXO 1.

Tabela 21. Componentes e modo de produção dos meios de cultura utilizados nos ensaios do Capítulo 4.

Meio de cultivo	Componente	Quantidade (g e mL)	Uso
Ágar-Água	Ágar	20g	Germinação de esporos e para iscas e fragmentos de tecidos lesionados para organismos menos exigentes
	Água destilada	1000 mL	
Batata-dextrose-ágar (BDA sintético) Merck KGaA	Extrato de batata	19,5g	Suporta crescimento para a maioria dos fungos, para isolamento e manutenção de culturas.
	Ágar	2g	
	Água destilada	500 mL	
V8 20% (Suco de vegetais) Campbell's	Suco V8	200 mL	Crescimento e esporulação de várias espécies de fungos.
	CaCO ₃	3g	
	Ágar	20g	
	Água destilada	1000 mL	
Ágar Czapec Dox (Semi-sintético) Himedia	Sacarose, ágar, nitrato de sódio, fosfato dipotássico, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, sulfato de ferro	40g	Cultivo de fungos filamentosos, bolores e leveduras.
	Água destilada	1000 mL	
Martin (Modificado por Hameehin, 1984)	Fosfato de potássio	1 g	Seletivo para contagem de fungos em amostras de solo. Também seletivo para o isolamento de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> . Inibidor de fungos com crescimento rápido.
	Sulfato de magnésio	0,5 g	
	Dextrose	10 g	
	Peptona	5 g	
	Rosa de Bengala	0,03 g	
	Ágar	15 g	
	Clorophenicol	0,250 g	
	Água destilada	1000 mL	
Malte-Ágar	Extrato de malte	25g	Detecção, isolamento e contagem de leveduras e bolores.
	Ágar	20g	
	Água destilada	1000 mL	
Extrato de malte	Maltose	20 g	Detecção, isolamento e contagem de leveduras e bolores.

Ágar		Dextrose	20 g	
		Peptona	1 g	
		Ágar	20 g	
		Água destilada	1000 mL	
Cornmeal ágar	dextrose	Farinha de milho (fubá)	50 g	Cultivo de fungos e demonstração de clamidósporos
		Dextrose	2 g	
		Ágar	15 g	
		Água destilada	1000 mL	
Sacarose ágar	nutriente	Fosfato de potássio	1 g	Morfologia e caracterização de fungos.
		Nitrato de potássio	1 g	
		Sulfato de magnésio	0,5 g	
		Cloreto de magnésio	0,5 g	
		Glucose	0,2 g	
		Sacarose	0,2 g	
		Ágar	20 g	
		Água destilada	1000 mL	
Murashige & Skoog (Sintético) Labs	Caisson	Com macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e glicina, conforme descrito por Murashige e Skoog, 1962.	4,43 g	Morfogênese, cultura de meristemas e regeneração de plantas.
		Ágar	12 g	
		Água destilada	1000 mL	
Sabouraud Ágar 4%	Dextrose	Peptona	10 g	Cultivo de leveduras, bolores e microrganismos aciduricos. Ideal para crescimento de fungos fitopatogênicos
		Dextrose	40 g	
		Extrato de levedura	10 g	
		Ágar	20 g	
		Água destilada	1000 mL	

Fonte: Zauza, Alfenas & Mafia, 2007.

ANEXO 2.

Tabela 22. Dados gerais, composição, classificação e indicação dos produtos fitossanitários utilizados neste estudo.

Produtos utilizados	Ingrediente ativo (i.a)	Grupo Químico (GQ)	Indicação de uso
Evidence [®]	Imidacloprido	Neonicotinóide	<i>Bemisia tabaci</i> raça B e <i>Dactynotus sonchi</i>
Provado 200 SC [®]	Imidacloprido	Neonicotinóide	<i>Myzus persicae</i> , <i>Thrips tabaci</i> e <i>Frankliniella schultzei</i>
Rovral SC [®]	Iprodiona	Dicarboximida	<i>S. sclerotiorum</i>
Sialex 500 [®]	Procimidona	Dicarboximida	<i>S. sclerotiorum</i>
Cantus [®]	Boscalida	Piridina-carboxamida	<i>Botrytis cinerea</i> e <i>S. sclerotiorum</i>
Tecto SC [®]	Tiabendazol	Benzimidazol	<i>Fusarium oxysporum</i>

Fonte: Agrofit, FRAC e IRAC, 2019.

ANEXO 3.

Tabela 23. Dados gerais das cultivares de alface utilizada nos ensaios de germinação por diferentes métodos (Ágar-água, papel filtro e papel Germitest), patogenicidade *in vitro* (Capítulo 2), na avaliação de *Trichoderma* spp. na supressão da podridão de raízes em casa de vegetação (Capítulo 3) e na aplicação de *Trichoderma* spp. visando à promoção de crescimento (Capítulo 5).

Cultivares	Tipo Varietal e coloração	Dados agronômicos principais
‘Rubi’	Mimosa e roxa	Cultivo o ano todo, todas as regiões, sub e tropical, sol pleno, todas as estações e 70 dias. Fonte: https://www.tocadoverde.com.br/alface-rubi-mimosa.html
‘Veneza’	Crespa e verde-roxa	Cultivo o ano todo, em especial no verão, resistência ao pendoamento precoce. Fonte: http://www.cientifica.org.br/index.php/cientifica/article/viewFile/259/146
‘Laurel’	Americana e verde	Cultivo de verão, alta resistência a doenças foliares e ciclo de 70-80 dias. Fonte: https://www.horticultores.com.br/produtos/folhosas/alface/alface-laurel
‘Donna’	Romana e verde escura	Cultivo o ano todo, excelente uniformidade e boa formação de cabeça, ciclo de 80 dias. Fonte: http://www.plantseed.com.br/produtos/premium/semente-alface-romana-donna.php
‘Verônica’	Crespa e verde	Cultivo o ano todo, em especial no verão, resistência ao pendoamento precoce. Fonte: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/783588/1/cot75.pdf
‘Raider Plus’	Amerina e verde	Cultivo o ano todo, resistência a Tip-burn, tolerância ao pendoamento e ciclo de 75-80 dias. Fonte: https://www.mercadodasemente.com.br/produto/267/semente-alface-

americana-raider-plus-5-000-sementes---seminis		
‘Vanda’	Crespa e verde	Cultivo o ano todo, resistente a deficiência de Ca e LMV-II com ciclo de 55 dias. Fonte: https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-1080737950-sementes-alface-crespa-vanda-sakata-7500-sementes-_JM
‘Vitória de Santo Antão’	Lisa e verde	Cultivo o ano todo, tolerante ao calor e ao espigamento, com ciclo de 60-70 dias. Fonte: https://www.biosementes.com.br/loja/item/Alface-Vitoria-de-Santo-Antao-%28Manteiga%29-10-g-sementes.html
‘Regina’	Lisa e verde-clara	Cultivo o ano todo, tolerante ao pendoamento precoce, indicada para hidroponia, resistente ao LMV, com ciclo de 70 dias. Fonte: https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-704547615-semente-de-alface-lisa-regina-500-peletizada-10000-sementes-_JM?quantity=1
‘Gizele’	Crespa e verde-clara	Cultivo o ano todo, tolerância ao pendoamento precoce e LMV, com ciclo de 70 dias. Fonte: http://www.plantseed.com.br/produtos/premium/semente-alface-crespa-gizele.php
‘Elisa’	Lisa e verde-clara	Cultivo o ano todo, resistência ao LMV-II e pendoamento, também indicada para hidroponia e ciclo de 58 dias. Fonte: https://www.tocadoverde.com.br/sementes-organica-alface-lisa-elisa.html
‘Mauren’	Americana e verde	Cultivo o ano todo, indicada para hidroponia, tolerante ao LMV e míldio, ciclo de 65-75 dias. Fonte: https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-1053677624-alface-americana-mauren-1000-sementes-peletizadas-_JM

'Hanson'	Crespa repolhuda e verde-clara	Cultivo o ano todo e ciclo de 70-90 dias. Fonte: https://isla.com.br/produto/Alface-Hanson-Crespa-Repolhuda/29
'BRS Lélia	Crespa e verde oliva	Cultivo o ano todo, tolerante a deficiência de Ca e altas temperaturas, a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> (raça 1), <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i> e LMV, ciclo de 35-45 dias. Fonte: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162554/1/digitalizar0208.pdf
'BRS Mediterrânea	Crespa e verde oliva	Cultivo o ano todo, tolerante ao calor, bons níveis de resistência a <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i> e LMV, ciclo de 35-45 dias. Fonte: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162555/1/digitalizar0207.pdf
'BRS Leila'	Crespa e verde-clara	Cultivo o ano todo, tolerante a deficiência de Ca e florescimento precoce, resistente a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> (raça 1), <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i> e LMV, ciclo de 35-45 dias. Fonte: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/160741/1/digitalizar0195.pdf

