

***Trichoderma asperellum* na produção de mudas contra a fusariose do pepineiro**

LUCIANA ZAGO ETHUR^{1*}; MANOELI LUPATINI²; ELENA BLUME³; MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ⁴; ZAIDA INÊS ANTONIOLLI⁵; LEANDRO H. LORENTZ⁶

¹Prof.^a. Adjunto, Curso de Agronomia/Campus de Itaqui/UNIPAMPA, Rua Luiz Joaquim de Sá Britto s.n., Bairro Promorar, CEP 97650-000, Itaqui/RS. E-mail: lucianaethur@unipampa.edu.br. *Autor para correspondência

²Engenheiro Agrônomo, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/UFSM, Santa Maria/RS. E-mail: mlupatini@gmail.com

³Prof.^a. Adjunto, Departamento de Fitossanidade/UFSM, Santa Maria/RS. E-mail: elenablu@gmail.com

⁴Prof.^a. Adjunto, Departamento de Fitossanidade/UFSM, Santa Maria/RS. E-mail: marlove@smail.ufsm.br

⁵Prof.^a. Adjunto, Departamento de Solos/UFSM, Santa Maria/RS. E-mail: zaida@smail.ufsm.br

⁶Prof. Adjunto, Campus São Gabriel/UNIPAMPA, São Gabriel/RS. E-mail: leandrolorentz@unipampa.edu.br

RESUMO

A fusariose no pepineiro é uma doença difícil de ser controlada e o uso de antagonistas fúngicos é uma alternativa para o manejo integrado de doenças. O objetivo desta pesquisa foi verificar a ação de *Trichoderma asperellum* no desenvolvimento e na proteção de mudas de pepineiro contra a fusariose. Foram realizados testes de germinação, emergência e desenvolvimento de mudas, com sementes tratadas com três isolados e mix (mistura dos três isolados) de *T. asperellum*. Para avaliar o controle da fusariose do pepineiro, utilizou-se o tratamento de sementes com os isolados de *T. asperellum* e fungicida (thiram) e realizou-se experimento com transplante de mudas cultivadas em substrato ou sementes tratadas com isolados de *T. asperellum*. Observou-se que não ocorreram diferenças significativas para germinação e emergência do pepineiro; porém, o isolado TA1 de *T. asperellum* promoveu maior desenvolvimento de parte aérea. Nos experimentos com tratamento de sementes, os isolados de *T. asperellum* e o fungicida apresentaram níveis significativos de controle; contudo, o isolado TA3 apresentou índice elevado (87%) de incidência de fusariose, em um dos experimentos. No transplante de mudas, a microbiolização de sementes apresentou redução de 30% na incidência da fusariose comparado com o tratamento de substrato. Conclui-se que isolados de *T. asperellum* podem ser indicados, principalmente no tratamento de sementes, contra a fusariose do pepineiro, mesmo interferindo variavelmente na emergência e desenvolvimento de mudas do pepineiro.

Palavras-chave: *Cucumis sativus*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, microbiolização de sementes.

ABSTRACT

***Trichoderma asperellum* in the production of seedlings against fusariosis of cucumber**

Fusariosis of cucumber is a difficult disease to be controlled, and the use of antagonistic fungi is an alternative to the integrated disease management. This study aimed to examine the action of *T. asperellum* in the development and protection of cucumber seedlings against fusariosis. Tests of germination, emergence and seedling development were carried out, using seeds treated with three isolates and a mix (mixture of three isolates) of *T. asperellum*. Experiments were conducted to evaluate the control of fusariosis of cucumber, using seed treatment with isolates of *T. asperellum* and fungicide (thiram). Another experiment was conducted with transplanted seedlings grown in substrate or seeds treated with isolates of *T. asperellum*. No significant differences in germination and emergence of cucumber were

SAP 5347

Data do envio: 22/06/2011

Data do aceite: 15/08/2011

observed, but the isolate TA1 *T. asperellum* presented greater plant development. In the experiments with seed treatment, the isolates of *T. asperellum* and the fungicide showed significant levels of control, but the isolate TA3 presented high incidence of fusariosis (87%) in one of the experiments. The microbiolization showed a reduction of 30% in the incidence of fusariosis compared with the treatment of substrate. It was concluded that isolates of *T. asperellum* can be indicated, especially in seed treatment, against fusariosis of cucumber, even interfering variably with the emergence and development of cucumber seedlings.

Keywords: *Cucumis sativus*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, seed microbiolization.

INTRODUÇÃO

A fusariose ou murcha do pepineiro (*Cucumis sativus* L.), causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl: Fries f. sp. *cucumerinum* Owen, figura como uma das principais doenças para o pepineiro cultivado a campo. Em ambiente protegido, como estufas comerciais, torna-se ainda mais comum e agressiva (BLANCARD *et al.*, 1996; ZAMBOLIM *et al.*, 2000), podendo ser considerada uma das principais doenças do pepineiro no estado de São Paulo (MELO & PICCININ, 1999), ocorrendo em vários países, principalmente China, Grécia, Espanha, França, Israel, Japão e Estados Unidos (AHN *et al.*, 1998; VAKALOUNAKIS *et al.*, 2004).

As medidas de controle para *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* envolvem várias práticas, como rotação de culturas (TOKESHI, 1997; FILGUEIRA, 2003); calagem e uso de sementes livre de patógenos (ZITTER *et al.*, 1996; VIDA *et al.*, 2004); retirada de plantas doentes e de restos culturais infectados; esterilização do solo com vapor; desinfecção do material utilizado para sementeira e cultivo (BLANCARD *et al.*, 1996) e, principalmente, uso de cultivares tolerantes ou resistentes (MELO & PICCININ, 1999; CARVALHO *et al.*, 2003). Porém, essas medidas apresentam restrições, pois todas as variedades comerciais de pepino apresentam níveis de sensibilidade à murcha de fusário (BLANCARD *et al.*, 1996) e a adoção de porta-enxerto resistente (ZITTER *et al.*, 1996; VIDA *et al.*, 2004) torna o método trabalhoso e oneroso (SINGH *et al.*, 1999). Por outro lado o controle químico, no tratamento de sementes, não apresenta efeito prolongado e quando utilizado diretamente no colo da planta infectada atua apenas como paliativo (BLANCARD *et al.*, 1996). Assim, o controle biológico constitui-se de uma alternativa para o controle da fusariose do pepineiro.

Existem relatos sobre o controle biológico da fusariose em pepineiro utilizando bactérias (SINGH *et al.*, 1999) ou fungos (YEDIDIA *et al.*, 2001; CHATTERTON *et al.*, 2008). A ação de isolados do fungo *Trichoderma* spp. contra outros fungos como *F. oxysporum* pode ocorrer principalmente por: competição (SOBOWALE *et al.*, 2007; INAM-UL-HAQ *et al.*, 2009) exsudações liberadas pela raiz, sendo que a maior densidade populacional de *Trichoderma* ocorre na extremidade das raízes que é o local mais acessível à infecção por *Fusarium oxysporum*; antibiose (VINALE *et al.*, 2008; CHRISTOPHER *et al.*, 2010); micoparasitismo (HOWELL, 2003; VINALE, 2008); e indução de defesa do hospedeiro (YEDIDIA *et al.*, 2001; VINALE *et al.*, 2008; CHRISTOPHER *et al.*, 2010).

A habilidade de *Trichoderma* em controlar fungos de solo varia consideravelmente, sendo possível melhorar a eficiência desses agentes pela seleção de isolados com maior potencial de antagonismo, principalmente contra fitopatógenos que interferem na produção de mudas. No entanto, processos como: germinação, emergência, desenvolvimento de plantas e florescimento podem ser influenciados pelo uso de isolados de *Trichoderma* spp. (MELO, 1996; HARMAN *et al.*, 2004; RESENDE *et al.*, 2004; VINALE *et al.*, 2008; CHRISTOPHER *et al.*, 2010; HAJIEGHRARI, 2010).

De acordo com o exposto, o objetivo desta pesquisa foi verificar a ação de isolados de *Trichoderma asperellum* no desenvolvimento e na proteção de mudas de pepineiro contra a fusariose do pepineiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Formulação de inóculo do fitopatígeno e do agente de controle biológico

O isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* e os isolados de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf & Nirenberg foram provenientes de campo experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), localizada em latitude 29°43' 28"S, longitude 53°43'11"W e 102m de altitude. Cujo solo pertence à unidade de mapeamento Santa Maria classificado como Brunizem Hidromórfico pelo Sistema de Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 1999). O clima da região, segundo a classificação de Köppen (MORENO, 1961) é do tipo Cfa – temperado chuvoso, com chuvas bem distribuídas ao longo do ano e subtropical.

Para obtenção do inóculo de *F. o. cucumerinum* quatro discos de meio BDA (batata, dextrose, ágar) contendo micélio e conídios do patógeno, foram colocados em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 g de arroz previamente autoclavados (40 min). Após a colonização do arroz pelo patógeno, adicionaram-se 200 mL de água destilada e esterilizada por erlenmeyer e triturou-se em liquidificador durante 5 min, sendo que para cada mL dessa suspensão foram encontradas 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) do patógeno.

Os isolados de *Trichoderma* foram identificados em nível de espécie como *T. asperellum* utilizando-se da biologia molecular (DAHMER, 2009). Para formulação do pó dos isolados de *T. asperellum*, discos de BDA contendo micélio e esporos foram colocados em frascos erlenmeyers contendo arroz previamente autoclavados e posteriormente colocados em estufa, em temperatura de 35 °C. Após a secagem o material foi triturado em liquidificador e peneirado (ETHUR et al., 2005), encontrando 10^8 UFC de *T. asperellum* para cada grama de pó.

Germinação, emergência e desenvolvimento de plantas

Para o teste de germinação e desenvolvimento de plântulas foi realizado o tratamento de sementes de pepino com os isolados TA1, TA2, TA3 e MIX (mistura dos três isolados anteriores) de *T. asperellum*, tendo um tratamento testemunha sem a adição do agente de biocontrole. Foram utilizadas 200 sementes de pepino para conserva por tratamento, com quatro repetições de 50 sementes, onde foram aplicados 0,03 g de pó de *T. asperellum* (300 g de pó para 60 Kg de sementes). Em seguida, as sementes tratadas foram colocadas em caixas de acrílico do tipo *gerbox* sobre duas folhas de papel filtro, umedecidas com água destilada e esterilizada. As caixas *gerbox* foram colocadas em câmara climatizada, em temperatura de 23 °C, por 14 dias.

A primeira avaliação foi realizada no quarto dia (BRASIL, 1992) após a implantação do experimento e constou do número de sementes germinadas; a segunda avaliação ocorreu após oito dias e constou do número de sementes com germinação normal, anormal, sementes mortas, comprimento de raízes e da parte aérea das plântulas (NAKAGAWA, 1999).

Para o teste de emergência e desenvolvimento de mudas utilizaram-se 96 sementes por tratamento, nas quais foram aplicadas 0,015 g de pó (300 g de pó para 60 Kg de sementes) dos três isolados e do mix de *T. asperellum*. As sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno com capacidade de 128 células, contendo substrato Plantmax[®], as quais foram mantidas em estufa plástica, com temperaturas entre 12 a 22 °C e irrigadas diariamente. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso (bandeja), com cinco tratamentos e com seis repetições de 16 plantas.

As avaliações constaram do índice de velocidade de emergência, emergência, massa seca de cinco mudas (secagem em estufa a 45 °C até peso constante), comprimento de parte aérea (do colo até a inserção da última folha) e comprimento de raiz das mudas. O índice de velocidade de emergência foi obtido pelo cálculo do número de plântulas emergidas diariamente, dividido pelo número de dias transcorridos da semeadura até a data de cada avaliação, e as demais avaliações foram realizadas aos 30 dias após a semeadura.

Tratamento de sementes na produção de mudas contra a fusariose do pepineiro

Comprovando-se através do experimento de emergência e desenvolvimento de mudas que os isolados e o mix de *T. asperellum* não causaram deficiências nas mesmas, os referidos isolados foram utilizados em experimentos no controle biológico da fusariose do pepineiro.

Foram realizados experimentos utilizando-se bandejas de polipropileno e sacos de polietileno próprios para a produção de mudas, para verificar a ação dos isolados de *T. asperellum* em substrato contendo o fitopatógeno, na produção de mudas contra a fusariose do pepineiro.

Os sete tratamentos constituíram-se dos isolados TA1, TA2, TA3 e MIX (mistura dos três isolados) de *T. asperellum*, fungicida com princípio ativo thiram e dois tratamentos testemunhas: testemunha em substrato contendo o fitopatógeno e testemunha em substrato não infestado.

As sementes de pepino de cada tratamento foram umedecidas com 0,3 mL de água destilada e esterilizada e tratadas com pó de cada um dos três isolados e mix de *T. asperellum* (300 g de pó para 60 Kg de sementes) e as concentrações para as sementes tratadas com o fungicida de princípio ativo thiram foi de acordo com Gimenes-Fernandes (1998), ou seja, 250 g para 100 Kg de sementes. Entretanto, nos tratamentos testemunha as sementes foram apenas umedecidas.

Para o experimento realizado em bandejas, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições (cinco bandejas), sendo cada repetição composta por quatro covas, com três plantas cada.

Utilizaram-se bandejas de polipropileno com dimensões de 29 x 43 x 8 cm preenchidas com 1,5 Kg de substrato para mudas Plantmax® onde foram incorporados 100 mL da suspensão de *F. o. cucumerinum*, três dias antes da semeadura. Posteriormente, semearam-se três sementes de pepino em cada uma das quatro covas. Enquanto que as sementes não tratadas dos tratamentos testemunha foram semeadas em bandejas com e sem substrato infestado com o fitopatógeno. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento com temperaturas de 23 ± 2 °C, durante 30 dias.

Posteriormente, em experimento usando sacos de polietileno o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um saco contendo três plantas.

Utilizaram-se sacos de polietileno preto indicados para produção de mudas, preenchidos com 250 g de substrato Plantmax® e infestados com 10 mL da suspensão de *F. o. cucumerinum*, três dias antes da semeadura. Foram semeadas três sementes por saco que receberam os tratamentos com pó de isolados de *T. asperellum* indicados para o experimento em bandejas. Os sacos plásticos foram mantidos em câmara de crescimento com temperaturas de 23 ± 2 °C durante 30 dias.

Em ambos os experimentos foram avaliadas a incidência, de acordo com a percentagem de plantas com sintomas da doença, e severidade da fusariose do pepineiro, aos 30 dias após a semeadura, com base na escala de notas estabelecida por Cotxarrera *et al.* (2002), onde receberam as notas: zero para plantas sem sintomas; 1 para plantas com menos de 50% das folhas amareladas (cloróticas) ou murchas; 2 para as plantas com mais de 50% das folhas amareladas (cloróticas) ou murchas (plantas vivas) e 3 para as plantas tombadas ou mortas.

Transplante de mudas tratadas via semente ou substrato com *T. asperellum* para solo infestado com *F. o. cucumerinum*

Os isolados de *T. asperellum* foram utilizados na produção de mudas do pepineiro no tratamento de sementes ou de substrato, com o objetivo de avaliar o potencial de proteção no transplante dessas mudas para solo infestado com o fitopatógeno. Sendo que este procedimento é padrão para o cultivo desta olerícola.

Esse experimento constituiu-se de um fatorial onde foram aplicados os isolados TA1, TA2, TA3 e mix de *T. asperellum* sobre o substrato ou no tratamento de sementes para a produção de mudas de pepineiro.

A primeira etapa do experimento foi a produção de mudas de pepineiro, sendo que para as mudas produzidas com tratamento de substrato, bandejas de poliestireno (128 células) foram preenchidas com 250 g de substrato Plantmax® tratado com 2 g de pó de cada um dos três isolados e do mix de *T. asperellum*, separadamente. Foram semeadas 18 sementes para cada um dos tratamentos de substrato, utilizando uma semente por célula.

Para as mudas produzidas com tratamento de sementes e mudas utilizadas para os dois tratamentos testemunha foi utilizado substrato não tratado. As sementes de pepino foram umedecidas com 0,3 mL de água destilada e esterilizada e tratadas com pó (300 g de pó para 60 Kg de semente) dos três isolados e do mix de *T. asperellum* e as utilizadas para os tratamentos testemunha foram apenas umedecidas. Foram semeadas 18 sementes para cada um dos tratamentos, utilizando uma semente por célula. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento com temperaturas de 23 ± 2 °C, durante 15 dias.

A segunda etapa do experimento foi a avaliação da população de *Trichoderma* spp. na rizosfera das mudas dos pepineiros antes de serem transplantadas. Para tanto, antes do transplante das mudas foi retirada uma amostra de substrato rizosférico de seis mudas de cada um dos seis tratamentos, além da amostra do substrato Plantmax® puro, para realizar-se a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Trichoderma* spp. Foram pesados 2 g de substrato de cada amostra dos diferentes tratamentos para realizarem-se diluições em meio seletivo para *Trichoderma* sp. (PAPAVIZAS, 1982).

A terceira etapa do experimento foi o transplante de mudas de pepineiro. Três mudas de pepineiro com 15 dias, produzidas em substrato ou sementes submetidas aos tratamentos, foram transplantadas para vasos de polipropileno (capacidade de 550 g) contendo substrato Plantmax® infestados com *F. o. cucumerinum* (10 mL), três dias antes do transplante. Um dos tratamentos testemunha ocupou vasos com substrato não infestado.

Os vasos foram mantidos em câmara de crescimento com temperaturas de 23 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h. As avaliações de incidência e severidade (COTXARRERA et al., 2002) da fusariose do pepineiro foram realizadas aos 20 dias após o transplante.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e ao teste de Duncan para a comparação de médias. Foram realizadas as transformações $Y^* = \arcsen \sqrt{Y/100}$ e $\text{LOG}_{10}(\text{UFC} + 1)$ para dados obtidos em percentagem e para o número de UFC de *Trichoderma* sp, respectivamente, seguido do teste de comparação múltipla de médias de Duncan a 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SOC/NTIA (EMBRAPA, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação, Emergência e desenvolvimento de planta

A maior parte dos tratamentos com os isolados de *T. asperellum* inibiram a germinação e o desenvolvimento de parte aérea e raiz das plântulas de pepineiro (Tabela 1). Entretanto, para emergência não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, e para o desenvolvimento de mudas o isolado TA1 apresentou maior comprimento de parte aérea do que o tratamento testemunha (Tabela 2).

Com relação à emergência, os resultados encontrados estão de acordo com Ethur *et al.* (2006), que utilizando formulado a base de *Trichoderma* spp., observaram que o mesmo não interferiu na emergência de mudas de nabo forrageiro; embora Kleifeld & Chet (1992) e Yedidia *et al.* (2001) tenham observado aumento de 20% no comprimento de mudas de pepineiros com o uso de *T. harzianum* e maior desenvolvimento de plantas com a adição de *T. harzianum* e micronutrientes no cultivo de pepineiro em meio hidropônico e em estufa, respectivamente. Portanto, o experimento de emergência que foi realizado em substrato para mudas apresentou

resultado diferenciado ao da germinação, evidenciando que *Trichoderma* por ser um fungo de solo e encontrando-se fora de seu *habitat* natural pode acabar agindo, até mesmo, como apodrecedor de sementes. Resultado semelhante, utilizando os mesmos testes, foi observado por Ethur *et al.* (2008) em tratamento de sementes de tomate com isolados de *Trichoderma*; Hajieghrari (2010), usando tratamento de sementes de milho e solo com diferentes isolados e espécies de *Trichoderma*, constatou que o efeito dos isolados sobre a taxa de germinação e vigor de plântulas em papel absorvente, quando os isolados atuaram como apodrecedores de sementes, não se repetiu no experimento com solo.

TABELA 1. Germinação e desenvolvimento de plântulas com sementes de pepineiro tratadas com isolados e mix de *Trichoderma asperellum*.

Tratamentos	PCG (%)	GN (%)	GA (%)	SM (%)	CH (cm)	CR (cm)
TA3	23,0*a	51,0 b	23 b	26 a	3,3 ab	5,7 a
TA2	0,5 b	0,5 d	72 a	27 a	0,2 c	0,6 c
TA1	23,0 a	58,0 ab	14 b	27 a	4,3 a	6,2 a
MIX	0,0 b	11,0 c	71 a	17 a	2,8 b	3,8 b
Testemunha	22,0 a	69,0 a	15 b	19 a	4,2 a	6,9 a
Média	14,0	37,0	39,0	23,0	2,9	4,6
CV	41%	12%	18%	32%	27%	19%

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade de erro;

TA1, TA2 e TA3: isolados de *T. asperellum*; MIX: mistura dos três isolados de *T. asperellum*; Testemunha: sementes sem tratamento. PCG: germinação primeira contagem; GN: germinação normal; GA: germinação anormal; SM: sementes mortas; CH: comprimento hipocótilo; CR: comprimento radícula.

TABELA 2. Emergência e desenvolvimento de mudas com sementes de pepineiro tratadas com isolados e mix de *Trichoderma asperellum*.

Tratamentos	IVE	Emergência (%)	Massa seca* (g)	CPA (cm)	CR (cm)
TA3	1,23** a	70,8 a	1,1 b	4,1 d	7,1 b
TA2	1,24 a	73,9 a	1,7 ab	4,8 ab	7,6 ab
TA1	1,21 a	72,9 a	2,4 a	5,1 a	8,4 a
MIX	1,10 a	61,5 a	1,7 ab	4,3 cd	8,3 a
Testemunha	1,11 a	70,8 a	1,9 ab	4,6 bc	7,6 ab
Média	1,18	70	1,8	4,6	8,1
CV	21,5%	18%	41%	8,3%	12%

*Massa seca de cinco mudas;

**Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade de erro;

TA1, TA2 e TA3: isolados de *T. asperellum*; MIX: mistura dos três isolados de *T. asperellum*; Testemunha: sementes sem tratamento. IVE: Índice de velocidade de emergência; CPA: comprimento parte aérea; CR: comprimento raiz.

Controle da fusariose do pepineiro

Para o experimento realizado em bandejas todos os tratamentos com isolados de *T. asperellum* e o tratamento fungicida foram eficientes no controle da fusariose quando comparados com o tratamento testemunha (com inóculo no substrato e sementes não tratadas) (Tabela 3). Porém, para o experimento realizado em sacos de polietileno para mudas, o tratamento com o isolado TA2 apresentou 87% de incidência da fusariose do pepineiro, apresentando o menor controle que foi de 13%. O tratamento testemunha, para os experimentos

1 e 2, contendo substrato sem inóculo do patógeno e sementes não tratadas apresentaram plantas sem incidência e severidade de quaisquer doenças.

TABELA 3. Incidência (%) e severidade (nota) da fusariose em mudas de pepineiros produzidas com sementes tratadas com isolados de *T. asperellum* e fungicida, em bandejas (1º experimento) e sacos de polietileno (2º experimento), contendo substrato infestado com *F.o.cucumerinum*.

Tratamento	1º Experimento		2º Experimento	
	Incidência (%)	Severidade (notas)	Incidência (%)	Severidade (notas)
Testemunha	95,75 a*	2,87 a	100,00 a	3,00 a
TA1	54,25 b	1,60 b	53,20 b	2,00 b
TA2	73,00 b	1,67 b	66,80 b	2,00 b
TA3	68,75 b	1,67 b	86,80 ab	2,60 ab
MIX	72,75 b	2,10 ab	66,80 b	2,00 b
Fungicida	68,75 b	1,60 b	73,60 b	2,00 b
C.V.	20,5%	12,9%	27,6%	15,1%

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Testemunha – com inóculo, não tratada; TA1, TA2 e TA3: isolados de *T. asperellum*; MIX: mistura dos três isolados de *T. asperellum*; Fungicida: princípio ativo thiram, na proporção de 250 g para 100 Kg de sementes.

A eficiência de isolados de *Trichoderma* sobre fitopatógenos fúngicos de solo é comprovada. Segundo Lucon *et al.* (2009), isolados de *Trichoderma* das espécies *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. spirale* e *T. asperellum* foram utilizados contra o tombamento de mudas de pepineiro por *Rhizoctonia solani* e proporcionaram redução de mais de 85 % da doença; de acordo com Christopher *et al.* (2010) isolado de *T. virens* em tratamento de sementes proporcionou uma redução de 55 % na incidência da fusariose no tomateiro causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, constatando que ocorreu indução de defesa do hospedeiro devido ao aumento da atividade das enzimas peroxidase, polifenol oxidase e fenilalanina amônia-liase. Houssien *et al.* (2010) que constataram uma eficiência de 100 % no controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tratamento de solo e de raízes de mudas com isolado de *T. harzianum* e ácido salicílico, promovendo a ativação de defesa no hospedeiro. De acordo com Gonzáles-Cárdenas *et al.* (2005), isolado de *Trichoderma* spp. apresentou controle de 100 % da podridão de mudas de mamão (*Carica papaya* L.) causada por *F. oxysporum*, utilizando tratamento de raízes de plântulas.

Existem vários fatores que interferem no controle biológico de doenças de plantas causadas por fitopatógenos de solo. De acordo com Vinale *et al.* (2008), o sucesso dos agentes de biocontrole depende da complexa interação entre os microrganismos benéficos com os patógenos e plantas, no ecossistema solo. Além disso, outros fatores podem influenciar a ação de biocontrole, tais como: pH, temperatura, umidade, concentração de inóculo, concentração do agente de controle biológico, formulação (RESENDE *et al.*, 2004; VINALE *et al.*, 2008) e constituição física e química do solo, pois segundo Inam-Ul-Haq *et al.* (2009), isolados de *Trichoderma* apresentaram comportamento diferenciado quanto ao controle de *Fusarium oxysporum ciceri* em solos franco-argiloso-areno e argiloso, diminuindo a população do patógeno de 40 a 90 % e de 20 a 60 %, respectivamente.

Produção de mudas cultivadas com *T. asperellum* e o controle da fusariose do pepineiro

Nos resultados para a incidência e severidade da fusariose, no transplante de mudas tratadas com isolados e mix de *T. asperellum* não ocorreram interações entre os fatores: forma de aplicação e isolados, mas ocorreram diferenças significativas para os fatores em separado

(Tabela 4). A testemunha sem inóculo do patógeno evidenciou que não existiam patógenos no substrato e nas sementes utilizadas no experimento. A testemunha com inóculo não foi utilizada para a comparação com os demais tratamentos porque deveriam ter sido realizados dois tratamentos testemunhas com inóculo, visando à aplicação dos agentes de biocontrole via sementes e outra via substrato. Contudo, entre os tratamentos com diferentes isolados de *T. asperellum* e o MIX ocorreu inibição de até 42% da incidência contra a fusariose do pepineiro (Tabela 4 – A). Inbar *et al.* (1994), observaram redução de 67% no tombamento de mudas de pepineiro, em plântulas crescidas em substrato tratado com o isolado T203 de *T. harzianum* e transplantadas para estufa comercial infestada com *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. Assim como Akram *et al.* (2009) que usando isolados de *T. harzianum* e *T. asperellum* observaram controle de até 61% no tombamento de mudas do feijoeiro causado por *Fusarium solani*; e Cotxarrera *et al.* (2002) que observaram menor severidade em substrato tratado com isolados de *T. asperellum* contra a fusariose do tomateiro.

TABELA 4. Incidência (%) e severidade (notas) da fusariose em mudas de pepineiro que receberam tratamento de semente ou substrato, com isolados e mix de *T. asperellum*, transplantadas para substrato infestado com o patógeno.

A – Isolados de <i>T. asperellum</i>	Pepineiro	
	Incidência (%)	Severidade (notas)
TA1	62,50 a* **	1,92 a
TA2	87,62 a	2,59 a
TA3	87,62 a	2,50 a
Mix (3 isolados)	58,37 a	1,64 a
B - Formas de aplicação dos isolados de <i>T. asperellum</i>	Pepineiro	
	Incidência (%)	Severidade (notas)
Substrato	85,50 a*	2,57 a
Semente	62,56 b	1,76 b

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade;

**Testemunha com inóculo do patógeno apresentou 93% de incidência e nota 3 de severidade em pepineiro.

A microbiolização das sementes apresentou melhores resultados, com incidência em torno de 30% menor do que o tratamento de substrato (Tabela 4-B). A habilidade de agentes de biocontrole em colonizar a espermosfera e alcançar altas densidades populacionais durante as primeiras 24 h da germinação é importante para a proteção das sementes por infecção de patógenos (NELSON, 2004).

Com relação ao número de UFC de *Trichoderma* sp. em solo rizosférico de mudas de pepineiro, pode-se observar que nos tratamentos testemunha, tanto para semente quanto para substrato, nos quais não foram adicionados isolados e mix de *T. asperellum* ocorreu o desenvolvimento desse gênero fúngico. Certamente os propágulos de *Trichoderma* spp. encontrados no substrato comercial (3,12 Log) desenvolveram-se na rizosfera dos pepineiros. O mesmo foi constatado por Resende *et al.* (2004), que encontraram o fungo *Trichoderma* presente tanto nas raízes das plantas de milho oriundas de sementes não tratadas como aquelas que foram tratadas com isolado de *T. harzianum*. *Trichoderma* spp. é um fungo com habilidade em colonizar a raiz (HARMAN *et al.*, 2004) e desenvolver-se na rizosfera, sendo encontrado por Viterbo *et al.* (2004) isolados de *T. asperellum* colonizando raízes de pepineiros.

Ocorreu interação entre os fatores formas de aplicação do agente de biocontrole e os isolados de *T. asperellum*. A quantidade significativamente maior de UFC de *Trichoderma* spp. foi encontrada nos tratamentos TA1 (3,38 Log – semente e 3,98 Log - substrato) e mix (3,31 Log

– semente e 4,36 Log – substrato) de *T. asperellum*, tendo sido mais elevada significativamente no tratamento de substrato. De acordo com esses resultados pode-se inferir que a quantidade de UFC do agente de biocontrole na rizosfera não é decisiva para o controle da doença, pois observaram-se que as menores médias de incidência e severidade da fusariose do pepineiro foram encontradas para o tratamento de sementes (Tabela 4-B) e essa forma de aplicação para *T. asperellum* foi a que apresentou menor quantidade de UFC na rizosfera das mudas.

CONCLUSÃO

Os isolados de *T. asperellum* testados podem ser indicados, principalmente no tratamento de sementes, contra a fusariose do pepineiro mesmo interferindo variavelmente na emergência e desenvolvimento de mudas dessa cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, I.P.; CHUNG, H.S.; LEE, Y.H. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, p.244-246, 1998.

AKRAM, M.; IBRAHIMOV, A.Sh.; ZAFARI, D.M.; VALIZADEH, E. Control *Fusarium* rot of bean by combination of by *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in greenhouse condition. **Agricultural Journal**, v.4, p.121-123, 2009.

BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las cucurbitáceas**. Observar, identificar, luchar. Madrid, Barcelona, México: Mundi-prensa, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992.

CARVALHO, A.O.; JACOB, NETO J.; CARMO, M.G.F. Alterações do pH da solução nutritiva pela fonte de nitrogênio e seus efeitos sobre a colonização de plantas de tomate por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.295, 2003.

CHATTERTON, S.; JAYARAJ, J.; PUNJA, Z.K. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. **Biological Control**, Canadá, v.46, p.267-278, 2008.

CHRISTOPHER, D.J.; RAJ, S.T.; RANI, S.U.; UDHAYAKUMAR, R. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Biopesticides**, Tamilnadu/India, v.3, p.158-162, 2010.

COTXARRERA, L.; TRILLAS-GAY, M.I.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.34, p.467-476, 2002.

DAHMER, S. F. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; LUPATINI, M.; ETHUR, L.Z. Caracterização genética de isolados de *Trichoderma* utilizados no biocontrole de fusariose em pepineiro. In: JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA, XXIV, 2009, Santa Maria-RS. **Anais...** Santa Maria, RS, 2009.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura (Campinas, SP). **Ambiente de software NTIA: versão 4.2.2: manual do usuário - ferramental estatístico**. Campinas, 1997.

- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema brasileiro de classificação dos solos**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. 412p.
- ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; SILVA, A.C.F.; STEFANELO, D.R.; ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.127-134, 2005.
- ETHUR, L.Z.; 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**, Santa Maria, v.28, p.17–27, 2006.
- ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; CAMARGO, R.F.; FLORES, M.G.V.; CRUZ, J.L.G.; MENEZES, J.P. *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v.30, p.57-69, 2008.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003.
- GIMENES – FERNANDES, N. et al. **Guia de fungicidas agrícolas**. 2 ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1998. 220p.
- GONZÁLES-CÁRDENAS, J.C., MARURI-GARCÍA, J.; GONZÁLES-ACOSTA, A. Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plântulas em papaya (*Carica papaya* L.) em Tuxpan, Veracruz, México. **Revista UDO Agrícola**, Oriente/Venezuela, v.5, n.1, p.45-47, 2005.
- HAIJEGHRARI, B. Effects of some Iranian *Trichoderma* isolates on maize seed germination and seedling vigor. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.9, n.28, p.4342-4347, 2010.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v.2, p.42-56, 2004.
- HOUSSEIN, A.A.; AHMED, S.M.; ISMAIL, A.A. Activation of tomato plant defense response against Fusarium wilt disease using *Trichoderma harzianum* and salicylic acid under greenhouse conditions. **Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v.6, n.3, p.328-338, 2010.
- HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, St. Paul, v.87, p.4-10, 2003.
- INAM-UL-HAQ, M.; JAVED, N.; KHAN, M.A.; JASKANI, M.J. Role of temperature, moisture and *Trichoderma* species on the survival of *Fusarium oxysporum ciceri* in the rainfed areas of Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v.41, n.4, p.1965-1974, 2009.
- INBAR, J.; ABRAMSKY, M.; COHEN, D.; CHET, I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.100, p.337-346, 1994.
- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**, Australia, v.144, p.267-272, 1992.
- LUCON, C.M.M.; KOIKE, C.M.; ISHIKAWA, A.I.; PATRÍCIO, F.R.A.; HARAKAVA, R.

- Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, p.1-9, 2009.
- MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.261-295, 1996.
- MELO, I.S.; PICCININ, E. Toxic metabolites from culture filtrate of *Fusarium oxysporum* and its effects on cucumber cells and plantlets. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p.23-26, 1999.
- MORENO, J.A. **Clima no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1961. 41p.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.
- NELSON, R.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review Phytopathology**, St. Paul, v.42, p.271-309, 2004.
- PAPAVIZAS, G.C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea bean rhizospheres. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, p.1212, 1982.
- RESENDE, M.L.; DE OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, R.G.; VIEIRA, A.R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.28, n.4, p.793-798, 2004.
- SINGH, P.P.; SHIN, Y.C.; PARK, C.S.; CHUNG, Y.R. Biological control of fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, p.92-99, 1999.
- SOBOWALE, A.A.; ODEBODE, A.C.; CARDWELL, K.F.; BRONDYOPADHYAY, R. Suppression of growth of *Fusarium verticillioides* Niren. using strains of *Trichoderma harzianum* from maize (*Zea mays*) plant parts and its rhizosphere. **Journal of Plant Protection Research**, Polônia, v.49, n.4, p.452-459, 2007.
- TOKESHI, H. Doenças do tomateiro. In: KIMATI et al. (eds.) **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 871p.
- VAKALOUNAKIS, D.J.; WANG, Z.; FRAGKIADAKIS, G.A.; SKARACIS, G.N.; LI, D-B. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAPD. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, p.645-649, 2004.
- VIDA, J.B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMANM, D.J.; BRANDÃO FILHO, D.J.; VERZIGNASSIN, J.R.; CAIXETA, M.P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p.355-372, 2004.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R. *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.40, p.1-10, 2008.
- VITERBO, A.; HAREL, M.; CHET, I. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.238, p.151-158, 2004.

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

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; LOPES, C.A.; VALE, F.X.R. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas – Hortaliças**. Viçosa. UFV. 2000. p.373-407

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit disease**. St. Paul. APS Press, 1996.