

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ALTERNATIVAS QUÍMICAS E BIOLÓGICA
PARA O MANEJO INTEGRADO DE DAMPING-OFF (*Pythium* spp.) EM MUDAS
DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TATIANA DE MORAES LIMA

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Julho de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ALTERNATIVAS QUÍMICAS E BIOLÓGICA
PARA O MANEJO INTEGRADO DE DAMPING-OFF (*Pythium* spp.) EM MUDAS
DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)**

TATIANA DE MORAES LIMA
(ENGENHEIRA AGRÔNOMA – UFRRJ)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Julho de 2010

TATIANA DE MORAES LIMA
ENGENHEIRA AGRÔNOMA
UFRRJ

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

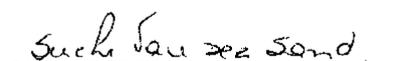
Porto Alegre (RS), Brasil

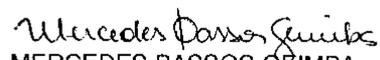
Aprovada em: 06 / 08 / 2010
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 28 / 10 / 2010
Por:

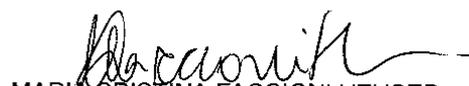

ADRIANO BRANDELLI
Orientador ICTA-UFRGS


JOSÉ CARLOS GERMANI
Coordenador do PPGMAA


SUELI TERESINHA VAN DER SAND
PPGMAA - UFRGS


MERCEDES PASSOS GEIMBA
MICROBIOLOGIA/PUCRS


IRVING JOSEPH BERGER
SOUZA/CRUZ SJA


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

DEDICATÓRIA

Ao grande amor da minha vida, minha família,
pois sem ela eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e companhia.

A minha família, mas principalmente ao meu pai (*in memoriam*) por todos os direcionamentos e ensinamentos de vida. A minha tia Selma por me fazer à pessoa mais importante do mundo, cuidando sempre de mim. A minha mãe por dizer que me ama todas as vezes que nos falamos e por apoiar minhas decisões, mesmo quando eu era ainda uma criança.

As Fernandas (Castro e Viana) e a Cíntia Chermont por toda a amizade e companheirismo em muitos momentos bons e naqueles não muito agradáveis. Amizades que nem o tempo ou mesmo à distância conseguiu enfraquecer.

A Souza Cruz por acreditar e apoiar o conhecimento técnico-científico, fazendo com que a ciência auxilie a Pesquisa Agrícola na busca do equilíbrio sócio-econômico-ambiental da cadeia de tabaco. E principalmente por todo o apoio aos inúmeros “primeiro emprego” e/ou “únicos” da carreira de muitos profissionais.

A Professora Claudia Rossetto e ao Professor Elson Viegas da UFRRJ pelos ensinamentos práticos da agronomia/ tecnologia de sementes/ fitotecnia/ fitopatologia, além de muitos outros não descritos nos tantos livros que já pesquisei. Os pupilos não superam os mestres, mas aprendem com eles.

Ao Professor Adriano pela tranqüilidade, compreensão e confiança nesta jornada, mas principalmente por aceitar esta orientação.

As minhas amigas gaúchas, Sabrine, Luciana e Eliandra pelo acolhimento. Em especial a “Sa” por me ajudar em momentos difíceis aqui no Sul e por me fazer membro de sua família.

Ao Irving por todo seu admirável conhecimento técnico-científico e pelo excelente profissionalismo. A Mariangela pela amizade e carinho, além do enorme apoio técnico que jamais esquecerei. Ao laboratório de Fitomicrobiologia, mas principalmente ao Rafa pelo apoio nas atividades e ao Pascoalotto pelo admirável conhecimento em produção de mudas e pela humildade em ensinar.

Ao Professor Germani por ensinar aos seus alunos que o conhecimento vai muito além das salas de aula. E que a teoria tem que ser empregada na prática. Ao Professor Enilson por me mostrar diversos caminhos da microbiologia aplicada. A Professora Patrícia Valente pela sua capacidade de fazer o aluno aprender ensinando.

Enfim, agradeço a todos os meus carinhosos amigos que deixaram o Rio de Janeiro em busca de nova experiência e aqui no RS formaram uma “nova família”.

Estudos *in vitro* e *in vivo* de alternativas químicas e biológica para o manejo integrado de damping-off (*Pythium* spp.) em mudas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)¹

Autor: Tatiana de Moraes Lima

Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo estudar alternativas de controle químico e biológico de isolados de *Pythium* para aplicação na formação de mudas de tabaco. Estudou-se por meio de bioensaios a compatibilidade de duas cepas de *Trichoderma harzianum* (ESALQ 1306 e 1316) com sete fungicidas. Os mesmos fungicidas foram avaliados quanto à capacidade de inibição de quatro isolados de *Pythium* spp. A atividade antagônica das cepas de *T. harzianum* foram testadas *in vitro*, em três momentos de inoculação a 23 e 28°C para quatro isolados de *Pythium* spp. A eficiência de controle *in vivo* de *Pythium* sp., bem como germinação, massa seca e mudas aptas foram avaliadas em condições de casa de vegetação, com os fungicidas químicos Ridomil Gold MZ e Infinito, e biológicos Trichodermil 1306 e o produto experimental Trichodermil 1316. As cepas de *T. harzianum* apresentaram compatibilidade com todos os fungicidas testados. Todos os isolados de *Pythium* foram inibidos pelos fungicidas Censor, Amistar WG 500, Infinito e Ridomil Gold MZ em ensaios. A cepa ESALQ 1316 apresentou maior eficiência de inibição dos isolados de *Pythium*, em cultivo pareado, sendo 100% eficiente, independente do momento de inoculação, após 14 dias. Isoladamente o Trichodermil cepa ESALQ 1306 foi mais eficiente que o produto experimental Trichodermil cepa ESALQ 1316 no controle de *Pythium* sp. em mudas de tabaco. A combinação do Ridomil Gold MZ ou Infinito com o Trichodermil 1316 apresentou maior eficiência de controle de *Pythium* sp. quando comparada ao agente de biocontrole isoladamente em mudas de tabaco.

Palavras-chave: tabaco, *Trichoderma harzianum*, fungicidas, manejo integrado.

1/ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (72 p.) Julho, 2010.

***In vitro* and *in vivo* biological and chemical alternatives for the integrated management of damping-off (*Pythium* spp.) in seedlings of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)¹**

Author: Tatiana de Moraes Lima

Advisor: Adriano Brandelli

ABSTRACT

The present work aims to study alternatives for chemical and biological control of *Pythium* isolates for application in tobacco seedlings. It was studied by bioassays the compatibility of two strains of *Trichoderma harzianum* (ESALQ 1306 and 1316) with seven fungicides. The same fungicides were evaluated for their ability to inhibit four isolates of *Pythium* sp. The antagonistic activity of strains of *T. harzianum* were tested *in vitro* on three different occasions inoculation at 23 and 28 ° C for four isolates of *Pythium* sp. The control efficiency *in vivo* of *Pythium* sp. and germination, seedling dry weight and suitable conditions were evaluated in a greenhouse with chemical fungicides Ridomil Gold MZ and Infinito, and biological products, Trichodermil 1306 and Trichodermil 1316. The strains of *T. harzianum* showed compatibility with all fungicides tested. All the isolates of *Pythium* were inhibited by fungicides Censor, Amistar WG 500, Infinito and Ridomil Gold MZ in trials. The strain ESALQ 1316 was more efficient inhibition of isolates *Pythium* in paired culture, being 100% effective, regardless of time of inoculation, after 14 days. On average Trichodermil 1306 was more efficient than the experimental product Trichodermil 1316 in the control of *Pythium* sp. in tobacco seedlings. The combination of Ridomil Gold MZ or Infinito with Trichodermil 1316 was more effective control of *Pythium* sp. compared with the biological control agent alone in tobacco seedlings.

Keywords: tobacco, *Trichoderma harzianum*, fungicides, integrated management

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (72 p.) July, 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
RELAÇÃO DE TABELAS	x
RELAÇÃO DE FIGURAS	xii
RELAÇÃO DE ABREVIACÕES	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivo específico	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1..Manejo de doenças em “sistema float”.....	6
3.2..Damping-off	7
3.3. Controle químico de doenças	9
3.3.1. Controle químico de <i>Pythium</i>	11
3.4. Controle biológico de doenças	12
3.5. O gênero <i>Trichoderma</i>	13
3.5.1. <i>Trichoderma</i> como agente de biocontrole	13
3.6. Manejo integrado	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Fungicidas utilizados	16
4.1.1. Fungicidas químicos	16
4.1.2. Fungicidas biológicos	18
4.2. Cepas de <i>Trichoderma harzianum</i>	19
4.3. Isolados de <i>Pythium</i> sp.	21
4.4. Compatibilidade de <i>Trichoderma harzianum</i> cepas ESALQ 1306 e 1316 com diferentes fungicidas químicos <i>in vitro</i>	20
4.5. Efeito de fungicidas químicos no controle <i>in vitro</i> de isolados de <i>Pythium</i> sp.	21
4.6. Cultivo pareado <i>in vitro</i> de isolados de <i>Pythium</i> sp. com cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> ESALQ 1306 e 1316	22
4.7. Teste de patogenicidade de <i>Pythium</i> spp. em mudas de tabaco	24
4.7.1. Produção de mudas	24
4.7.2. Produção de zoósporos	25
4.7.3. Avaliação da patogenicidade de isolados de <i>Pythium</i> sp. em mudas de tabaco	25

4.8. Avaliação <i>in vivo</i> do controle de <i>Pythium</i> sp. em mudas de tabaco	26
4.8.1. Semeação	28
4.8.2. Inoculação de zoósporos de <i>Pythium</i> sp.	29
4.8.3. Adubação e outros tratos culturais	29
4.8.4. Aplicação dos fungicidas	30
4.8.5. Avaliação <i>in vivo</i>	31
4.8.5.1. Controle de <i>Pythium</i> sp. em mudas de tabaco	31
4.8.5.2. Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas	31
4.8.5.3. Características agronômicas das mudas	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Compatibilidade de <i>Trichoderma harzianum</i> cepas ESALQ 1306 e 1316 com diferentes fungicidas químicos <i>in vitro</i>	34
5.2. Efeito de fungicidas químicos no controle <i>in vitro</i> de isolados de <i>Pythium</i> sp.	36
5.3. Cultivo pareado <i>in vitro</i> de isolados de <i>Pythium</i> sp. com cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> ESALQ 1306 e 1316	42
5.4. Patogenicidade de <i>Pythium</i> spp. em mudas de tabaco	47
5.5. Avaliação <i>in vivo</i>	48
5.5.1. Controle de <i>Pythium</i> sp. em mudas de tabaco	48
5.5.2. Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas	50
5.5.3. Características agronômicas das mudas	51
6. CONCLUSÕES	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE	64

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Informações dos isolados.....	19
Tabela 2. Doses utilizadas por fungicida.....	20
Tabela 3. Quantidade de zoósporos/mL utilizadas no teste de patogenicidade.	26
Tabela 4. Descrição dos tratamentos.....	27
Tabela 5. Dosagem, modo de aplicação e número máximo de aplicações dos fungicidas químicos utilizados.	30
Tabela 6. Raio médio de inibição do crescimento micelial, em centímetros, do isolado <i>Pythium</i> sp. 9241.	38
Tabela 7. Raio médio de inibição do crescimento micelial, em centímetros, do isolado <i>Pythium</i> sp. 15671(2).	38
Tabela 8. Raio médio de inibição do crescimento micelial, em centímetros, do isolado <i>Pythium</i> sp. 11641(1).	39
Tabela 9. Raio médio de inibição do crescimento micelial, em centímetros, do isolado <i>Pythium</i> sp. 16243(i).	39
Tabela 10. Porcentagem média da eficiência de antagonismo do isolado de <i>Pythium</i> sp. 9241 por <i>T. harzianum</i> cepas ESALQ 1306 e 1316, aos 7, 14 e 21 dias, a 23 e 28°C.	45
Tabela 11. Porcentagem média da eficiência de antagonismo do isolado de <i>Pythium</i> sp. 15671(2) por <i>T. harzianum</i> cepas ESALQ 1306 e 1316, aos 7, 14 e 21 dias, a 23 e 28°C.	45
Tabela 12. Porcentagem média da eficiência de antagonismo do isolado de <i>Pythium</i> sp. 11641(1) por <i>T. harzianum</i> cepas ESALQ 1306 e 1316, aos 7, 14 e 21 dias, a 23 e 28°C.	46
Tabela 13. Porcentagem média da eficiência de antagonismo do isolado de <i>Pythium</i> sp. 16243(i) por <i>T. harzianum</i> cepa ESALQ 1306 e 1316, aos 7, 14 e 21 dias, a 23 e 28°C.	46
Tabela 14. Porcentagem média da eficiência de antagonismo de isolados de <i>Pythium</i> em presença do <i>T. harzianum</i> cepas ESALQ 1306 e 1316, a 23 e	47

28°C.....

Tabela 15. Porcentagem de mudas de tabaco mortas..... 47

Tabela 16. Porcentagem de eficiência dos tratamentos no controle *Pythium* sp. isolado 9241. 49

Tabela 17. Porcentagem de germinação e massa seca das plântulas, em gramas, avaliadas no momento do repique/desbaste..... 50

Tabela 18. Porcentagem de mudas aptas ao final do ciclo de produção de mudas. 51

Tabela 19. Massa seca da parte aérea, em gramas, ao final do ciclo de produção. 52

Tabela 20. Massa seca do sistema radicular, em gramas, ao final do ciclo de produção. 52

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1.** Resultado da compatibilidade representado pela ausência de halo de inibição, de colônia de *T. harzianum* cepa ESALQ 1306, em meio de cultura contendo discos de papel impregnados com duas vezes a dosagem recomendada do fungicida químico Positron Duo aos 7 dias de incubação, sendo (A) frente e (B) verso da placa de Petri. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010..... 35
- Figura 2.** Resultado da compatibilidade representado por ausências de halos de inibição, de colônia de *T. harzianum* cepa ESALQ 1316, em meio de cultura contendo discos de papel impregnados com a dosagem recomendada dos fungicidas químicos aos 7 dias de incubação, sendo pareado com (A) Censor, (B) Ridomil Gold MZ e (C) Cobre Atar BR. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010..... 36
- Figura 3.** Inibição do isolado de *Pythium* sp. 9241, após 7 dias de incubação, em meio de cultura contendo discos de papel impregnados com três dosagens do fungicida químico Infinito. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010..... 40
- Figura 4.** Inibição do isolado de *Pythium* sp. 15671(2), após 7 dias de incubação, em meio de cultura contendo discos de papel impregnados com três dosagens do fungicida químico Censor. (A) frente e (B) verso da placa de Petri, da esquerda para a direita metade da dose, dose recomendada e o dobro da dose, respectivamente para A e B. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010..... 43

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFUBRA – Associação dos Fumicultores do Brasil

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários

F – Teste de F Snedecor

GL – Grau de Liberdade

i.a. – Ingrediente Ativo

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MIP – Manejo Integrado de Pragas

Pr – Probabilidade

QM – Quadrado Médio

SINDITABACO – Sindicato da Indústria do Tabaco da Região Sul do Brasil

SQ – Soma do Quadrado

TMV – Tobacco Mosaic Vírus

U.S. EPA – United State Environmental Protection Agency

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de tabaco e líder em exportações desde 1993 devido à qualidade e integridade do tabaco brasileiro, que atende os mais exigentes padrões internacionais. Para o Sul do país, a cultura é uma das atividades agroindustriais mais significativas. Está presente em 730 municípios, envolve mais de 186 mil pequenos produtores e dá origem a 30 mil empregos diretos nas indústrias de beneficiamento (Sinditabaco, 2009). Mais de 90 % do tabaco brasileiro é produzido nos três estados do Sul. Do total cultivado na região, o Rio Grande do Sul fica com a maior participação, com 54% da área, seguido de Santa Catarina, com 29%, enquanto o Paraná compõe os restantes 17%, com crescimento leve de 2 a 6% o que indica a tendência da safra 2009/2010 (Sinditabaco, 2010).

O cultivo de tabaco no Sul do Brasil tem como base as pequenas propriedades, em média com 16,1 hectares, sendo que destes, apenas 15% (2,4 hectares) são dedicados à produção de tabaco. Apesar da pequena área utilizada,

o cultivo representa 65% da renda familiar dos agricultores, conforme dados da Associação dos Fumicultores do Brasil. As demais culturas /atividades são desenvolvidas, basicamente, para subsistência, comercializando apenas os eventuais excedentes (40% do total) que lhe garantem uma receita adicional equivalente a 22% da obtida com tabaco (Afubra, 2010).

De acordo com Vencato *et al.* (2009), o sistema integrado de produção de tabaco protagonizou verdadeira revolução durante a década de 1990. Mediante a preocupação com o meio ambiente e com os acordos ambientais que determinaram a erradicação do brometo de metila, amplamente utilizado na desinfestação do solo para os canteiros convencionais de produção de mudas de tabaco, como também em diversas outras culturas, estudos foram aprofundados e a tecnologia do “sistema Float” para produção de mudas de tabaco em bandejas foi difundido e implantado. Dentre as principais vantagens do “sistema Float” destacam-se a facilidade de manejo (semeadura, repicagem, podas e tratamentos fitossanitários), a redução da mão-de-obra e do uso de defensivos agrícolas, a maior uniformidade das mudas e conseqüentemente, lavouras igualmente mais uniformes, o que facilita todas as demais operações.

O sucesso da introdução do “sistema float” depende de quatro fatores: escolha da melhor bandeja, emprego do substrato mais adequado, irrigação mais prática e a melhor forma de semear. Este último fator acabou sendo um dos mais sérios. O caminho foi o da peletização, ou seja, o recobrimento das sementes com materiais inertes. Foi possível aumentar o tamanho das sementes e empregar semeadoras mais rústicas, destinando-se uma única semente a cada célula da

bandeja. Com isso foram obtidas vantagens técnicas e econômicas, como o melhor controle da adubação das mudas (Neumann *et al.*, 1999).

A obtenção de mudas sadias é essencial e o primeiro passo do processo de produção de tabaco (Gutierrez *et al.*, 1997). Neste período, as mudas precisam receber cuidados especiais para evitar pragas e doenças, pois no estágio de plântulas elas são tenras e suscetíveis (Neumann *et al.*, 2003). Cuidados constantes do agricultor são necessários, principalmente em relação ao ataque de pragas e doenças que chegam a acarretar prejuízos totais ou reduzir drasticamente a qualidade da colheita (Gutierrez *et al.*, 1997).

Fusarium oxysporum f. sp. *nicotianae*, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Pythium* spp., *Peronospora tabacina*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.), *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum nicotianae* e *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* são os principais fungos fitopatogênicos que ocorrem em sementeiras (Lucas, 1958). Quando presentes causam doenças como o tombamento de pós-emergência, podendo atingir perdas de até 60% na produção de mudas.

O tabaco é uma das culturas que menos utiliza defensivos agrícolas no Brasil (aproximadamente 1 Kg de ingrediente ativo (i.a.)/ha), conforme pesquisa realizada pela União da Indústria da Cana de açúcar (UNICA). No entanto, segundo Carvalho *et al.* (2008), para as futuras safras, um desafio ambientalmente correto é a substituição de defensivos químicos (Vencato *et al.*, 2009) ou a redução através do uso de agentes de controle biológico. Com todos os avanços, o surgimento de doenças mais agressivas ameaça constantemente qualquer

metodologia de produção de mudas, com elevado potencial para comprometer sua eficiência e questionar o futuro do sistema.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo estudar alternativas de controle químico e biológico de *Pythium* spp. para aplicação na fase de formação de mudas de tabaco.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação da compatibilidade de *Trichoderma harzianum* cepa ESALQ 1306 E 1316 com diferentes fungicidas químicos *in vitro*;

Avaliação do efeito de fungicidas químicos no controle *in vitro* de isolados de *Pythium* sp.;

Avaliação do antagonismo de *in vitro* de isolados de *Pythium* sp. com cepas de *T. harzianum* ESALQ 1306 e 1316;

Avaliação *in vivo* do controle de *Pythium* sp. em mudas de tabaco

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MANEJO DE DOENÇAS EM “SISTEMA FLOAT “

A introdução do “sistema float” revolucionou a produção de mudas de tabaco. O “sistema float” oferece uma série de vantagens sobre a produção de mudas tradicional, mas também cria condições ideais para algumas doenças importantes. Alta umidade neste sistema, tipo hidropônico, praticamente favorece a infecção de raízes e folhas por patógenos de plantas, assim como a alta densidade populacional normalmente associada ao sistema. Neste contexto, a prevenção é a parte mais importante no manejo de doenças no “sistema float”, ou qualquer outro sistema de produção devido ao ambiente propício a doenças e a de relativa falta de ferramentas de fungicidas para evitar ou retardar a propagação das mesmas, uma vez iniciada (Pearce *et al.*, 2009).

Bandejas de poliestireno para produção de mudas em uma solução nutritiva apresentam desafios no controle de fitopatógenos em água, tais como

Pythium spp. que podem se difundir no substrato ou na água por motilidade dos zoósporos flagelados (Shew, 1991).

Manter uma boa circulação do ar através da utilização de aberturas laterais e manter o nível adequado de água auxilia a criação de um ambiente desfavorável para fitopatógenos, bem como longos períodos de molhamento foliar favorecem doenças no “sistema float”. O controle de temperatura é crítico, pois o excesso de calor pode levar a problemas como mancha aureolada e mela, enquanto as temperaturas mais frias favorecem a podridão do colo e mofo azul. No entanto, o bom fluxo de ar, a não sobrecarga de irrigação, a secagem rápida das folhas e a aplicação de fungicidas no início do dia promovem a criação de condições menos favoráveis para doenças como a mancha aureolada, podridão do colo, mofo azul e mela (Pearce *et al.*, 2009).

Mudas livres de doença são mais vigorosas e menos propensas ao ataque de patógenos no campo. A utilização de uma estratégia que integra a gestão do meio ambiente, saneamento e fungicidas devem ser desenvolvidas antes da cultura plantada (Mila & Radcliff, 2008). Embora não seja possível evitar completamente as doenças, práticas de manejo integrado devem reduzir significativamente o impacto das doenças no “sistema float” (Pearce *et al.*, 2009).

3.2. “DAMPING-OFF “

O gênero *Pythium* Pringsheim possui representantes terrestres e aquáticos, parasitas ou sapróbios, sendo a maioria deles cosmopolitas (Rosa, 2007). Segundo Kirk *et al.* (2001), o gênero está compreendido por mais de 127

espécies, das quais muitas são responsáveis por sérios problemas em plantas de interesse econômico, causando apodrecimento de frutas, raízes, troncos e tombamento de pré e pós-emergência (“damping-off”) sendo encontradas causando doenças pelo mundo (Hendrix & Campbell, 1973; Middleton, 1943; Van der Plaats Niterink, 1981).

“Damping-off” é causado por um grupo de espécies de *Pythium* que incluem *Pythium aphanidermatum* como a espécie mais importante e mais agressiva, seguido pelo *P. ultimum* var *ultimum* e *P. myriotylum* (Mila & Radcliff, 2010).

Controlar “damping-off” por *Pythium* na produção de culturas hidropônicas geralmente é um desafio. Os recentes avanços no conhecimento e na compreensão da etiologia e epidemiologia da podridão radicular, e em métodos e abordagens para o controle da doença, estão fornecendo grandes melhorias no manejo do “damping-off” e na produtividade dos cultivos hidropônicos (Sutton *et al.*, 2006).

Na cultura do tabaco muitas doenças em casa de vegetação são causadas por *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pythium* e *Erwinia* spp. (Mila & Radcliff, 2010). Estes patógenos, em função do sintoma, possibilitam em alguns casos, confundir o problema, como a *Rhizoctonia solani* que causa damping-off antes do início das podas e *Sclerotinia sclerotiorum* que causa após poda. No entanto, o “Damping-off” provocado por *Pythium* é precedido pelo extenso amarelecimento das mudas de tabaco.

Em fase de lavoura, Mila & Radcliff (2010) observaram que *Pythium* afeta as plantas de tabaco somente nas fases iniciais de crescimento, após serem transplantadas, causando tombamento, podridão de raiz e caule, e necrose das raízes de nutrição. No entanto, na Carolina do Norte, nos últimos anos, *Pythium* também foi detectado afetando o tabaco em diferentes estágios de desenvolvimento no campo. Os sintomas da podridão de *Pythium* são muito semelhantes aos causados pela canela preta, causando perdas de difícil estimativa. Na maioria dos casos, podridão do colo por *Pythium* afeta algumas raízes ao nível da linha do solo e na parte mais baixa do caule, causando uma lesão preta que vai continuar a crescer para cima do caule. Murcha das plantas e clorose, também são observadas em plantas afetadas pelo *Pythium* em condições de campo.

3.3. CONTROLE QUÍMICO DE DOENÇAS

A proteção de plantas com métodos convencionais, por meio do uso de defensivos agrícolas, apresenta características bastante atraentes, como a simplicidade, a previsibilidade e a necessidade de pouco entendimento dos processos básicos do agroecossistema para sua aplicação (Bettioli & Ghini, 2009).

O cultivo do tabaco, como a produção de quase todas as outras culturas, exige adequadas medidas para proteger a planta de forma a garantir a qualidade desejada e aceitável rendimento, bem como para preservar a cultura após colheita (Coresta, 2008).

Os defensivos agrícolas utilizados no setor do tabaco também são usados regularmente na produção de alimentos (McDaniel *et al.*, 2005), contudo, poucos defensivos estão registrados para controle de doenças na fase de produção de mudas de tabaco. De acordo com Seebold (2010) em Kentucky apenas podridão por *Pythium*, mofo azul e mancha aureolada são alvos destes produtos. No entanto, no Brasil, segundo informações obtidas no Agrofitec (2010), podridão por *Pythium*, podridão por esclerotínia, mofo azul e mancha de alternaria tem sido os principais alvos para registro de produtos para mudas de tabaco. Assim como em Kentucky (Seebold, 2010), no Brasil produtos recomendados para utilização em “sistema float” devem possuir registro para esta finalidade. Para o manejo das doenças no “sistema float”, e em especial, para aquelas que não existem fungicidas disponíveis, boas práticas agrícolas, em particular a sanitização, deve ser adotada primeiro.

Apesar dos defensivos agrícolas contribuírem com a produção de tabaco e alimentos, a exposição a eles pode prejudicar os seres humanos, portanto, as agências reguladoras, como a U.S EPA (United State Environmental Protection Agency) podem definir limites para a quantidade de resíduos de defensivos agrícolas permitidos nos alimentos e tabaco, além de estabelecer normas para os trabalhadores que os manuseiam (U.S. GAO, 2003).

Os defensivos agrícolas são um importante instrumento utilizado pelos agricultores no controle de pragas. No entanto, a regulamentação ambiental, a resistência de pragas a estes e interesses dos consumidores têm reduzido o uso e

a disponibilidade drasticamente limitando à introdução de novas substâncias químicas de controle (Jacobsen, 2009).

3.3.1. Controle químico de *Pythium*

Poucos são os fungicidas registrados para uso em tabaco no “sistema float” no Brasil (Agrofit, 2010). O ingrediente ativo mancozeb é amplamente utilizado em tabaco para controle de mancha aureolada, “damping-off” e mofo azul em Kentucky (Seebold, 2010). No Brasil este i.a. está registrado para controle de *Peronospora tabacina* (mofo azul) e *Pythium ultimum* quando em formulação com *metalaxil-M*. Atualmente foram registrados no Brasil os ingredientes ativos cloridrato de propamocarbe e fluopicolide, formulação do produto Infinito para o controle de *Pythium ultimum*. Este produto comercial foi liberado para uso em tabaco no estado do Paraná apenas em março de 2010.

Devido à pequena disponibilidade de i.a. a resistência de organismos aos produtos químicos usados para o seu controle tem sido um sério problema em diversas áreas, tanto na saúde pública quanto na agricultura. Quando surgem problemas de resistência na agricultura as consequências podem ser desastrosas para os vários segmentos da sociedade envolvidos na cadeia produtiva (Souza & Dutra, 2003).

A aplicação contínua, tanto no tempo como no espaço, de um determinado fungicida, aumentará as chances do desenvolvimento de resistência (Souza & Dutra, 2003).

3.4. CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS

Doenças de plantas precisam ser controladas para manter a qualidade e a abundância de alimentos, rações e fibras produzidas pelos produtores em todo o mundo. Diferentes abordagens como mitigação e controle podem ser utilizadas para sua prevenção (Pal & McSpadden Gardener, 2006).

Ainda hoje “damping-off” pré e pós-emergência causado por fungos em muitas culturas principais são rotineiramente controladas por fungicidas (Lutchemeah & Cooke, 1985). A busca por agentes de controle biológico efetivo para o manejo de doenças de plantas tem intensificado nos últimos anos a fim de reduzir a dependência de produtos químicos perigosos (Harman, 2000). Algumas espécies do gênero *Trichoderma* têm sido usadas como agentes de biocontrole contra fungos fitopatogênicos de solo, foliar e pós-colheita (Chet 1987, 1990), sendo 90% das aplicações realizadas com diferentes cepas do fungo (Benitez *et al* 2004). Estes fungos benéficos também podem promover o crescimento das plantas (Inbar *et al.*, 1994; Bjorkman *et al.*, 1998) e podem colonizar a superfície radicular e o córtex (Kleifeld, 1992; Yedidia, 1999).

Trichoderma harzianum Rifai estirpe 22 (T22) tem sido amplamente utilizada em todo o mundo como um agente de controle biológico contra muitas doenças de plantas (Lumsden & Locke, 1989; Zimand *et al.*, 1996, Mao *et al.*, 1998; Harman, 2000; Howell, 2002).

O controle biológico isolado raramente oferece melhor controle do que um bom fungicida (Chet *et al.*, 1982; Lifshitz *et al.*, 1985), no entanto, a combinação de agentes de controle biológico com número reduzido de aplicações

de fungicidas, através da estratégia de manejo integrado, promove um grau de supressão da doença similar ao alcançado com o tratamento fungicida completo (Monte, 2001).

3.5. O GÊNERO *Trichoderma*

Segundo Ramirez *et al.* (1995), o gênero *Trichoderma* Persson foi descrito em 1794, considerando quatro espécies de fungos. Em 1969, foi novamente classificado por Rifai. De acordo com Melo (1991), as espécies de *Trichoderma* dentro de um mesmo grupo ou secção apresentam características sobrepostas, o que torna difícil a classificação de isolados. O gênero *Trichoderma* é considerado anamorfo de *Hypocrea* Fr. (Chaverri *et al.*, 2000), sendo classificado como imperfeito, e conforme Vera *et al.*(2007) pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (Mohamed & Haggag 2006, Fortes *et al.* 2007).

3.5.1. *Trichoderma* como agente de biocontrole

De acordo com Morandi & Bettiol (2009), a primeira publicação sobre o uso do *Trichoderma* como agente de biocontrole de doenças de plantas no Brasil

foi na década de 50 , quando Foster descreveu a inativação do vírus do mosaico do tabaco (TMV) por filtrados da cultura de *Trichoderma* sp. Entretanto, somente em 1987, trinta e sete anos após a primeira publicação, um produto a base de *Trichoderma viride* foi usado comercialmente no Brasil contra a podridão de raízes e colo em macieira, causada por *Phytophthora cactorum* (Valdebenito- Sanhueza, 1991).

Devido a seu amplo espectro de ação, propriedades físico-químicas e a versatilidade na adaptação aos mais diversos ambientes, fungos antagônicos do gênero *Trichoderma* (Pers.) vêm sendo largamente estudados como agentes de biocontrole de diversos fungos fitopatogênicos (Silva, 2000).

O *Trichoderma* pode interagir com o patógeno de diversas maneiras, tais como antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação ou indução de defesa do hospedeiro (Gauch, 1996). Algumas espécies do gênero também possuem potencial para disponibilizar nutrientes na rizosfera a ponto de reduzir a necessidade de adubação nas culturas (Harman, 2000).

Algumas espécies *Trichoderma* apresentam características que são essenciais para um agente de biocontrole, tais como: ser inócuo ao ser humano e não apresentar impacto negativo ao meio ambiente, assim como apresentar estruturas de reprodução de fácil propagação (Spiegel & Chet, 1998).

3.6. MANEJO INTEGRADO

Manejo integrado de pragas (MIP) é uma estratégia baseada na ciência que fornece respostas a importantes problemas de controle de pragas através da

identificação e introdução de novas ferramentas de controle para os agricultores, enfatizando produtos de base biológica e princípios ecológicos. MIP é definido como uma abordagem sustentável as pragas através da combinação de ferramentas biológica, cultural, física e química de uma maneira que minimize riscos econômicos, de saúde e ambientais (Jacobsen, 2009).

A substituição de um produto químico por um biológico não é a situação adequada, mas sim caminhar para o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e, portanto, menos dependentes do uso de defensivos agrícolas (Morandi & Bettiol, 2009).

Apesar da grande polêmica sobre os defensivos agrícolas, sabe-se que seu uso ainda é necessário (Alves, 1986; Brice, 1991). Dentro do controle integrado, o uso de fungicidas, em menor escala, pode ser um fator de contribuição para a idéia de complementaridade e não de sucessão (Reifschneider, 1987).

De acordo com Lopes (2009), o sucesso do controle biológico não depende apenas da disponibilidade de produtos microbianos no mercado. O agricultor não deve entender esta modalidade de controle como uma simples substituição do produto químico convencional pelo biológico. Trata-se de uma mudança mais profunda e que deve ser encarada com uma visão mais ampla, dentro de um contexto de manejo integrado. Desse modo, é importante que o insumo biológico não seja comercializado e utilizado como um simples produto, e sim como um pacote tecnológico ou processo de controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia na estrutura de Laboratório e Casa-de-vegetação da área de Pesquisa Aplicada do centro de excelência em Pesquisa & Tecnologia de Fumo da Souza Cruz S.A., localizado em Cachoeirinha – Rio Grande do Sul.

4.1. Fungicidas utilizados

4.1.1. Fungicidas Químicos

1) Produto comercial: **Ridomil Gold MZ**

Ingrediente ativo (i.a.): Metalaxil M + Mancozeb

Concentração do i.a. (p/p): 4% de Metalaxil M e 64% de Mancozeb

Modo de Ação: Metalaxil M – contato e Mancozeb – sistêmico

Classe: Fungicida

Classe toxicológica: III

Formulação: Grânulos dispersíveis em água

Dose recomendada pelo fabricante: 1,25g/m²

Fabricante: Bayer S.A.

2) Produto comercial: Positron Duo

Ingrediente ativo (i.a.): Propinebe + Iprovalicarbe

Concentração do i.a. (m/m): 61,3% de Propinebe e 5,5% de Iprovalicarbe

Modo de Ação: Iprovalicarbe – contato e Propinebe – sistêmico

Classe: Fungicida

Classe toxicológica: III

Formulação: Pó molhável

Dose recomendada pelo fabricante: 0,2* e 0,3 kg/ 100L

Fabricante: Bayer S.A.

* dose utilizada neste trabalho.

3) Produto comercial: Censor

Ingrediente ativo (i.a.): Fenamidona

Concentração do i.a. (g/L): 500

Modo de Ação: Efeito translaminar

Classe: Fungicida

Classe toxicológica: III

Formulação: Suspensão concentrada

Dose recomendada pelo fabricante: 0,8 mL/m²

Fabricante: Bayer S.A.

4) Produto comercial: Infinito

Ingrediente ativo (i.a.): Cloridrato de propamocarbe + fluopicolide

Concentração do i.a. (g/L): 625 de Cloridrato de propamocarbe e 62,5 de Fluopicolide

Modo de Ação: Sistêmico

Classe: Fungicida

Classe toxicológica: II

Formulação: Suspensão concentrada

Dose recomendada pelo fabricante: 45mL/ 14,7 m² (comunicação pessoal)*

Fabricante: Bayer S.A.

* Necessidade de alteração da bula para dosagem em canteiros float

5) Produto comercial: Amistar WG 500

Ingrediente ativo (i.a.): Azoxistrobina

Concentração do i.a. (m/m): 50%

Modo de Ação: Sistêmico

Classe: Fungicida

Classe toxicológica: IV

Formulação: Grânulo dispersível

Dose recomendada pelo fabricante: 1,0 kg/ ha

Fabricante: Syngenta

6) Produto comercial: Cobre Atar BR

Ingrediente ativo (i.a.): Óxido cuproso I

Concentração do i.a. (g/kg): 560

Modo de Ação: Contato

Classe: Bactericida - Fungicida

Classe toxicológica: IV

Formulação: Pó molhável

Dose recomendada pelo fabricante: 1,0* a 2,0 kg/ ha

Fabricante: Atar do Brasil Defensivos Agrícolas LTDA

* dose utilizada neste trabalho.

7) Produto comercial: Rovral

Ingrediente ativo (i.a.): Iprodiona

Concentração do i.a. (g/kg): 500

Modo de Ação: Contato

Classe: Fungicida

Classe toxicológica: IV

Formulação: Pó molhável

Dose recomendada pelo fabricante: 1000 g/ ha

Fabricante: Bayer S.A.

4.1.2. Fungicidas Biológicos**1) Produto comercial: Trichodermil 1306 ®**

Ingrediente ativo (i.a.): *Trichoderma harzianum* Rifai cepa ESALQ 1306

Concentração do i.a. (g/kg): 5×10^8 conídios viáveis/ kg

Modo de Ação: Utiliza-se um ou mais mecanismos, que são basicamente a antibiose (antibióticos, toxinas e enzimas que afetam o desenvolvimento dos fungos), parasitismo e competição.

Classe: Fungicida microbiológico

Classe toxicológica: III

Formulação: Pó molhável

Fabricante: Itaforte BioProdutos

2) Produto em experimentação pelo fornecedor: Trichodermil 1316 ® *

Ingrediente ativo (i.a.): *Trichoderma harzianum* Rifai cepa ESALQ 1316

Concentração do i.a. (g/kg): 4×10^{10} conídios viáveis/ kg

Modo de Ação: Utiliza-se um ou mais mecanismos, que são basicamente a antibiose (antibióticos, toxinas e enzimas que afetam o desenvolvimento dos fungos), parasitismo e competição.

Classe: Fungicida microbiológico

Classe toxicológica: III
 Formulação: Suspensão concentrada emulsionável
 Fabricante: Itaforte BioProdutos
 Observação: em avaliação na Itaforte

4.2. Cepas de *Trichoderma harzianum*

As duas cepas de *T. harzianum* Rifai foram obtidas a partir do produto comercial Trichodermil ® cepa ESALQ 1306 e da formulação em avaliação na Itaforte Bioproductos, Trichodermil ® cepa ESALQ 1316. Amostras cedidas gentilmente pela Itaforte BioProdutos.

4.3. Isolados de *Pythium* sp.

Isolados de *Pythium* sp. foram obtidos de mudas, solo, raízes e caule de tabaco (Tabela 1). Os isolados 9241, 15671(2), 11641(1) e 16243(i) estavam preservados no banco de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Souza Cruz S.A.

Tabela 1. Informações dos isolados de *Pythium* sp. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Isolados	Data do isolamento	Procedência	Amostras	Identificação
9241	1994	Águas Frias/ Santa Catarina	caule/raízes	<i>Pythium</i> sp.
15671(2)	2004	Abelardo Luz/ Santa Catarina	mudas	<i>Pythium</i> sp.
11641(1)	1998	Patos/ Paraíba	solo/raízes	<i>Pythium</i> sp.
16243(i)	2008	Passo do Sobrado/ Rio Grande do Sul	solo	<i>Pythium</i> sp.

4.4. Compatibilidade de *Trichoderma harzianum* cepas ESALQ 1306 e 1316 com diferentes fungicidas químicos *in vitro*

O efeito do fungicida sobre os isolados de *T. harzianum* foi avaliado pelo crescimento do fungo na presença dos fungicidas através do método de cultura pareada (Dennis & Webster, 1971), à semelhança de antibiogramas (Romeiro, 2001), utilizando-se discos de papel de 0,6 cm de diâmetro impregnados com fungicidas e discos de colônias de 0,6 cm de diâmetro inoculados com os isolados em estudo. Utilizou-se placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura ágar dextrose batata (BDA) acidificado com ácido láctico (3 gotas/ 100 mL), de acordo com Pandolfo (2007).

Os tratamentos foram compostos de duas cepas de *T. harzianum*, sete fungicidas em três dosagens (metade da dose, dose recomendada pelo fabricante, dobro da dose) e a testemunha composta apenas do *T. harzianum* Rifai em meio de cultura pareado com disco de papel contendo apenas água destilada estéril.

Tabela 2. Doses utilizadas por fungicida. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Produto comercial	Dosagem recomendada pelo fabricante
Ridomil Gold MZ	1,25 g/m ²
Positron Duo	0,2 kg/100L
Censor	0,8 mL/m ²
Infinito	45mL/ 14,7m ²
Amistar WG 500	1,0 kg/ ha
Cobre Atar BR	1,0 kg/ ha
Rovral	1000g/ ha

Nota: Para fins de cálculo as dosagens foram preparadas considerando uma calda de 10L.

Os discos de colônia contendo os isolados de *T. harzianum* Rifai foram colocados em placa de Petri a uma distância de 4 cm do disco de papel filtro embebido em solução fungicida.

As placas de Petri foram mantidas em câmaras de crescimento tipo BOD (Biological Oxygen Demand) com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após 7 dias avaliou-se a formação de halo de inibição ao redor do disco de papel.

Utilizou-se o delineamento experimental fatorial inteiramente ao acaso, 7 x 3 (fungicidas x dosagens), com duas testemunhas adicionais e quatro repetições, para as cepas de *Trichoderma harzianum* Rifai ESALQ 1306 e ESALQ 1316.

4.5. Efeito de fungicidas químicos no controle *in vitro* de isolados de *Pythium* sp.

O efeito dos fungicidas sobre isolados de *Pythium* foi avaliado pelo crescimento dos isolados 9241, 15671(2), 11641(1) e 16243(i) na presença dos fungicidas através do método de cultura pareada (Dennis & Webster, 1971), à semelhança de antibiogramas (Romeiro, 2001), utilizando-se discos de papel de 0,6 cm de diâmetro impregnados com fungicidas e discos de colônias de 0,6 cm de diâmetro contendo o oomiceto. Conforme Pandolfo (2007), utilizou-se placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo como meio de cultura BDA acidificado com ácido láctico (3 gotas/ 100 mL).

Os tratamentos foram compostos de quatro isolados de *Pythium* sp., sete fungicidas em três dosagens (metade da dose, dose recomendada pelo fabricante, dobro da dose) e as testemunhas compostas apenas dos isolados de *Pythium* em meio de cultura pareado com disco de papel contendo apenas água destilada estéril.

Os discos de colônia contendo os isolados foram colocados em placa de Petri a uma distância de 4 cm do disco de papel filtro embebido em solução fungicida repetindo-se quatro vezes cada tratamento.

As placas de Petri foram mantidas em câmaras de crescimento tipo BOD sob temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após 7 dias, avaliou-se o raio, em centímetros, do halo de inibição ao redor dos discos de papel impregnados com a solução fungicida.

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial inteiramente ao acaso, 7 x 3 (fungicidas x dosagens), para cada isolado de *Pythium*, utilizando-se os tratamentos testemunha como contraste e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de variância e ao teste de Duncan a 5% de probabilidade.

4.6. Cultivo pareado *in vitro* de isolados de *Pythium* sp. com cepas de *Trichoderma harzianum* ESALQ 1306 e 1316

Para estudar o efeito antagônico das cepas de *T. harzianum* sobre o crescimento de quatro isolados de *Pythium*, discos de micélio de 0,6 cm de diâmetro de *T. harzianum* e *Pythium* foram inoculados em lados opostos da placa

de Petri contendo BDA acidificado com ácido láctico (3 gotas/ 100 mL).a uma distância de 4,0 cm,

Os isolados de *Pythium* sp. (9241, 15671(2), 11641(1) e 16243(i)) foram confrontados com as cepas de *T. harzianum* Rifai (ESALQ 1306 e 1316) da seguinte forma:

1. *T. harzianum* inoculado 48 horas antes dos isolados de *Pythium*;
2. *T. harzianum* inoculado simultaneamente com os isolados de *Pythium*;
3. *T. harzianum* inoculado 48 horas após os isolados de *Pythium*;
4. Testemunhas formadas pelos isolados de *Pythium* sem a presença do agente de controle biológico.

As placas de Petri foram mantidas em câmaras de crescimento tipo BOD com temperaturas de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias de incubação, e conforme Silva *et al.* (2008), determinou-se o raio das colônias dos patógenos por meio de uma régua milimetrada.

Para verificar a eficiência de inibição de crescimento dos isolados de *Pythium* pelas cepas de *T. harzianum* Rifai foi realizado cálculo da eficiência de inibição do crescimento micelial aplicando-se a fórmula de Abbott (1925): % inibição = $[(\text{CR}_{\text{test}} - \text{CR}_{\text{trat}}) / \text{CR}_{\text{test}}] \times 100$, onde: CR_{test} = crescimento radial da testemunha e CR_{trat} = crescimento radial do tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial inteiramente ao acaso, 3 x 3 x 2 (momento de inoculação x período de avaliação x temperatura), com quatro repetições, para cada isolado de *Pythium*. Os dados obtidos foram

submetidos à análise estatística de variância e ao teste de Duncan a 5% de probabilidade.

4.7. Teste de patogenicidade de *Pythium* spp. em mudas de tabaco

4.7.1. Produção das mudas

Para a produção das mudas foram utilizadas sementes da Cultivar Souza Cruz CSC 230 de tabaco tipo Burley suscetível ao “damping-off”, doença causada por diferentes agentes causais, dentre os quais destacam-se oomicetos do gênero *Pythium*.

As sementes foram semeadas em bandejas plásticas divididas em células preenchidas com substrato Carolina (Carolina Soil do Brasil) composto de turfa canadense e vermiculita expandida com a adição de calcário, gesso e adubo solúvel (NPK + micros).

Foram utilizadas mudas com 18 dias de idade, em período coincidente com o recomendado para repicagem e desbaste das mudas de tabaco sob as condições comerciais de produção no Estado do Rio Grande do Sul. Optou-se pela utilização das mudas no momento da repicagem e desbaste por ser esta uma das etapas mais críticas à entrada de doenças, principalmente por ocasião do manuseio e facilidade do ferimento das mesmas através do arranquio do substrato. Para homogeneização e potencialização da condição acima, todas as mudas passaram pelo processo de arranquio e posterior lavagem para garantia de ferimento.

4.7.2. Produção de zoósporos

Os quatro isolados de *Pythium* em estudo foram utilizados para a produção de zoósporos conforme metodologia adaptada de Rahimian & Banihashemi (1979), onde os patógenos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura V8 (100mL de suco de tomate V8 acrescido de 2g de CaCO_3 / 1000 mL, 16 g de ágar e 900 mL de água destilada) e em seguida incubados à 35°C por 48 horas. Posterior a este período utilizou-se um estilete estéril para que fossem feitas tiras do meio de cultura com colônia do patógeno. Metade das tiras compostas pelo meio de cultura contendo colônia do patógeno foram transferidas para outras placas de Petri. Adicionou-se 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa contendo metade das tiras do meio de cultura com colônia dos patógenos, cobrindo assim o meio de cultura contendo o micélio. As placas foram mantidas por 24 horas à 35°C novamente. Após este período, a água foi trocada novamente e as placas foram incubadas à 35°C por quatro horas. Decorrido este período a suspensão de zoósporos de micélio dos isolados de *Pythium* foi homogeneizada em um Becker e posteriormente realizada a contagem do número de zoósporos/ mL em câmara de Neubauer.

4.7.3. Avaliação da patogenicidade de isolados de *Pythium* sp. em mudas de tabaco

Posterior a produção dos zoósporos, 10 mL de uma suspensão de aproximadamente 10^3 zoósporos/ mL (Tabela 2) foi distribuída em copos plásticos totalizando cinco repetições por tratamento. Os tratamentos foram compostos dos

quatro isolados de *Pythium* spp. e um controle apenas com água destilada estéril. Cada repetição recebeu três mudas de tabaco.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se cinco repetições, sendo cada repetição representada por três mudas em um copo plástico.

Avaliou-se a porcentagem de mudas mortas ao longo de três dias de incubação sob temperatura de 28°C.

Tabela 3. Quantidade de zoósporos/mL utilizadas no teste de patogenicidade. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Identificação dos isolados de <i>Pythium</i> sp.	Zoósporos/mL
9241	4,2 10 ³
11641(1)	*
15671(2)	4,6 10 ³
16243(i)	3,0 . 10 ³

* Não houve produção de zoósporos

4.8. Avaliação *in vivo* do controle de *Pythium* sp. em mudas de tabaco

Para a avaliação do controle de *Pythium* sp. em mudas de tabaco foram utilizadas sementes de Burley da cultivar CSC230, zoósporos do patógeno isolado 9241, Trichodermil cepa 1306 e produto experimental Trichodermil cepa 1316, substrato agrícola comercial Carolina, bandejas plásticas de 25 células, fungicidas químicos Ridomil Gold MZ e Infinito.

A avaliação foi realizada em triplicata. As duas formulações do Trichodermil contendo a cepa ESALQ 1306 e ESALQ 1316, assim como os fungicidas químicos Ridomil Gold MZ e Infinito, foram avaliados separadamente ou

em combinação quanto à capacidade de controlar o “damping-off” em mudas de tabaco ao final do ciclo de produção de mudas, de acordo com os tratamentos na Tabela 4.

Tabela 4. Descrição dos tratamentos. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Tratamentos	Descrição dos tratamentos
1	Controle (Sem <i>Pythium</i> e Sem <i>Trichoderma</i>)
2	<i>Pythium</i> sp. isolado 9241
3	<i>Pythium</i> sp. isolado 9241+ Ridomil Gold MZ
4	<i>Pythium</i> sp. isolado 9241+ Infinito
5	Trichodermil cepa ESALQ 1306 adicionado ao substrato antes do semeio + <i>Pythium</i> sp. isolado 9241
6	Trichodermil cepa ESALQ 1306 adicionado ao substrato antes do semeio + <i>Pythium</i> sp. isolado 9241 + Ridomil Gold MZ
7	Trichodermil cepa ESALQ 1306 adicionado ao substrato antes do semeio + <i>Pythium</i> sp. isolado 9241 + Infinito
8	Trichodermil cepa ESALQ 1316 adicionado ao substrato antes do semeio + <i>Pythium</i> sp. isolado 9241
9	Trichodermil cepa ESALQ 1316 adicionado ao substrato antes do semeio + <i>Pythium</i> sp. isolado 9241 + Ridomil Gold MZ
10	Trichodermil cepa ESALQ 1316 adicionado ao substrato antes do semeio + <i>Pythium</i> sp. isolado 9241 + Infinito

Os tratamentos foram dispostos dentro da casa de vegetação conforme croquis abaixo, através do sorteio dos tratamentos dentro dos blocos, para alocação dos 10 tratamentos em delineamento de Blocos ao acaso com três repetições.

Croquis 1. Alocação do experimento e disposição dos tratamentos. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Bloco I	Bloco II	Bloco III
T03	T07	T03
T04	T06	T10
T10	T02	T01
T05	T01	T07
T08	T09	T05
T09	T10	T02
T07	T05	T09
T02	T03	T04
T06	T08	T06
T01	T04	T08

4.8.1. Semeação

Por ocasião da semeação, três sacos de substratos Carolina foram homogeneizados em betoneira para uniformização do pH e da Condutividade Elétrica (CE) com a finalidade de evitar que o substrato fosse fator adicional a ser considerado nas avaliações. Foram obtidos pH de 5,57 e CE de 0,5 mS/cm. Posterior à homogeneização do substrato, 4,0 g do Trichodermil cepa ESALQ 1306 (pó molhável na concentração mínima de 5×10^8 conídios viáveis/kg)

(Tatagiba *et al.*, 2005) e 0,05g do Trichodermil cepa ESALQ 1316 (suspensão concentrada emulsionável na concentração mínima de 4×10^{10} conídios viáveis/kg) foram diluídos em água com 2,0 mL de Tween 80% para cada litro de substrato.

Bandejas de plástico de 25 células foram preenchidas com substratos adicionados ou não das formulações de Trichodermil. Em seguida foram semeadas 24 horas após, com duas sementes por células e colocadas dentro de bandejas plásticas contendo 250 mL de água potável para condução através do “sistema float”.

4.8.2. Inoculação de zoósporos de *Pythium sp.*

A inoculação do isolado *Pythium sp.* 9241 foi realizada um dia após ao desbaste e repique, onde todas as plântulas foram retiradas do substrato (arranquio) de modo a garantir o ferimento radicular e retornando apenas uma única plântula por célula.

Para inoculação das plântulas uma suspensão de zoósporos do isolado 9241 foi preparada na concentração de $2,7 \times 10^3$ zoósporos/ mL e 2,0 mL dessa suspensão foi adicionada a cada célula contendo uma plântula.

4.8.3. Adubação e outros tratamentos culturais

A adubação foi realizada na água da bandeja adicionando-se 1g do adubo Peters Professional 20-10-20 General Purpose por litro de água um dia após a inoculação dos zoósporos. A segunda adubação ocorreu por ocasião do

surgimento do segundo para de folhas e após a avaliação dos primeiros sintomas da doença.

Durante a fase de produção das mudas houve necessidade da realização de quatro podas, cortando-se o ápice das folhas.

4.8.4. Aplicação dos fungicidas

As aplicações dos fungicidas foram realizadas de acordo com a Tabela 5, conforme registro no MAPA e informação do fabricante (comunicação pessoal) devido ao processo de atualização da bula no MAPA para o fungicida Infinito.

Tabela 5. Dosagem, modo de aplicação e número máximo de aplicações dos fungicidas químicos utilizados. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Produto comercial	Fabricante	Dosagem	Modo de aplicação	Número máximo de aplicações
Ridomil Gold MZ	Syngenta	20g/float	rega	4
Infinito	Bayer	45mL/float	rega	4

Para a verificação da eficiência curativa dos fungicidas, os mesmos foram aplicados posterior a observação dos primeiros sintomas (três dias após inoculação do patógeno) sendo reaplicados a cada 7 dias por quatro vezes.

4.8.5. Avaliações *in vivo*

4.8.5.1. Controle de *Pythium* sp. em mudas de tabaco

Ao final do ciclo de produção de mudas, a eficiência dos tratamentos foi obtida mediante utilização do mesmo conceito da fórmula de Abbott (1925) onde % de Eficiência de controle = $[(\text{Testemunha} - \text{Tratamento}) / \text{Testemunha}] \times 100$, sendo Testemunha = número de mudas mortas/não aptas na testemunha (*Pythium* spp. somente) e Tratamento = número de mudas mortas/não aptas em cada um dos tratamentos (*Pythium* sp. + Trichodermil ou *Pythium* sp. + Trichodermil + fungicida ou *Pythium* sp. + fungicida).

Para a avaliação da eficiência de controle do patógeno ao final do ciclo de produção de mudas, adotou-se o delineamento experimental Fatorial 3 x 3 (Trichodermil x fungicidas) com três blocos Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de variância e ao teste de Duncan a 5% de probabilidade.

4.8.5.2. Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas

Para avaliar a germinação das sementes todas as plântulas foram retiradas e contadas por bandeja 25 dias após a semeadura.

Para análise dos dados foram consideradas as porcentagens de sementes germinadas por tratamento, tomando como base o cálculo sobre 50 sementes (2 sementes por célula; 25 células).

Para determinação da massa seca, 10 plântulas inteiras de cada tratamento foram lavadas e levemente secas em papel toalha. Posteriormente

foram acondicionadas em sacos de papel kraft, em três repetições, sendo logo após, colocadas em estufa a 65°C por 24 horas, de acordo com Hurng & Kao (1993). Após este período de secagem, foram pesadas em balança de precisão para determinação da massa seca total das plântulas posterior à germinação. Os resultados foram expressos em gramas para 10 plântulas.

Para a avaliação da germinação e massa seca de plântulas, adotou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso com 3 blocos e 3 tratamentos, sendo cada tratamento com 3 repetições dentro do bloco. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de variância e ao teste de Duncan a 5% de probabilidade.

4.8.5.3. Características agronômicas das mudas

Ao final do ciclo de produção, as mudas de todos os tratamentos foram avaliadas quanto à aptidão para serem transplantadas ou não. As mudas livres de doenças e com desenvolvimento normal foram consideradas aptas. Esta avaliação foi realizada visualmente com relação à sanidade, ao enraizamento das mesmas, qualidade da parte aérea e rusticidade do caule.

Para determinação da massa seca, 10 mudas de cada tratamento foram lavadas, divididas em parte aérea e sistema radicular sendo levemente secas com papel toalha. Posteriormente foram acondicionadas em sacos de papel Kraft separadamente, em três repetições, e logo após, colocadas em estufa a 65°C por 24 horas. Após período de secagem, as mesmas foram pesadas em balança

de precisão para determinação da massa seca total das partes das mudas. Os resultados foram expressos em gramas para 10 mudas.

Para a avaliação das mudas aptas ao transplante e massa seca ao final do ciclo de produção de mudas, adotou-se o delineamento experimental Fatorial 3 x 3 (Trichodermil x fungicidas) com três blocos, utilizando-se o tratamento branco (Tratamento 1) como contraste. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de variância e ao teste de Duncan a 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Compatibilidade de *Trichoderma harzianum* cepas ESALQ 1306 e 1316 com diferentes fungicidas químicos *in vitro*

As cepas ESALQ 1306 e 1316 de *T. harzianum* apresentaram compatibilidade com todos os fungicidas testados, quando expostas à metade da dose, dose recomendada pelo fabricante e o dobro da dose a 28°C (Figuras 1 e 2). Esses resultados indicam a viabilidade de realização de ensaios para uso das cepas estudadas em programas de manejo integrado de doenças em produção de mudas de tabaco. Experimentação adicional de eficiência de controle *in vitro* e *in vivo* de patógenos alvo ajudarão a determinar a viabilidade prático-econômica de adoção desta alternativa.

Na maioria das vezes, fungicidas produzem efeitos indesejáveis em organismos não-alvo (Benítez, *et al.*, 2004). Por outro lado, há relatos onde os agentes de biocontrole, que podem tolerar fungicidas até um certo nível, foram

misturados com fungicidas resultando na erradicação de doenças (Khan & Shahzad, 2007).

Seja no caso dos bioinseticidas como dos biofungicidas, a maior parte da comercialização desses produtos no país é voltada à agricultura convencional. Esses produtos podem ser associados às diferentes táticas de controle de pragas e doenças, inclusive com os defensivos agrícolas, em um sistema de manejo (Lopes, 2010).

Informações sobre compatibilidade dos produtos químicos com os microrganismos devem ser consideradas para a utilização de estratégias de manejo integrado para o controle de doenças. No entanto, nem sempre tais informações são disponibilizadas pelas empresas de produtos biológicos ou avaliações são atualizadas com novas moléculas químicas introduzidas no mercado.

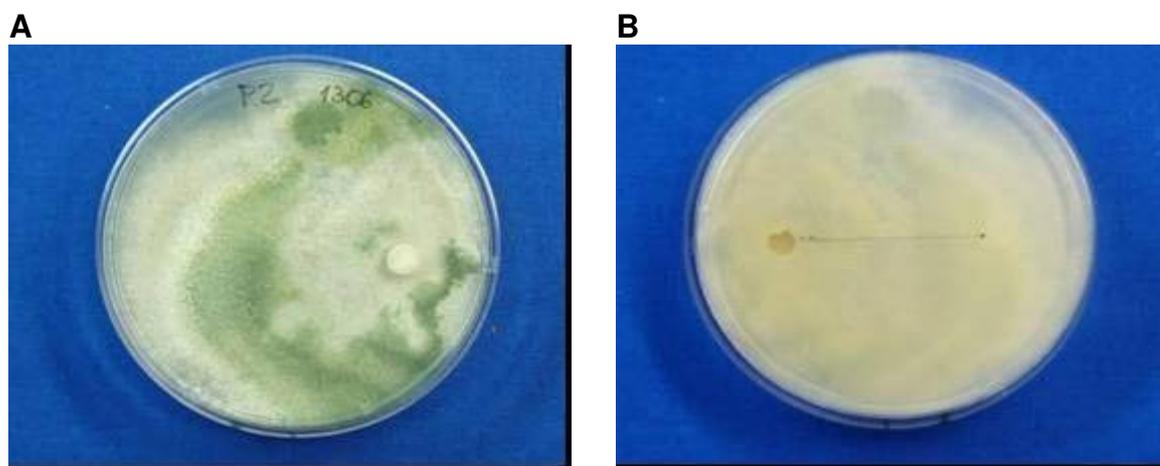


Figura 1. Resultado da compatibilidade representado pela ausência de halo de inibição, de colônia de *T. harzianum* cepa ESALQ 1306, em meio de cultura contendo discos de papel impregnados com duas vezes a dosagem recomendada do fungicida químico Positron Duo aos 7 dias de incubação, sendo (A) frente e (B) verso da placa de Petri. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

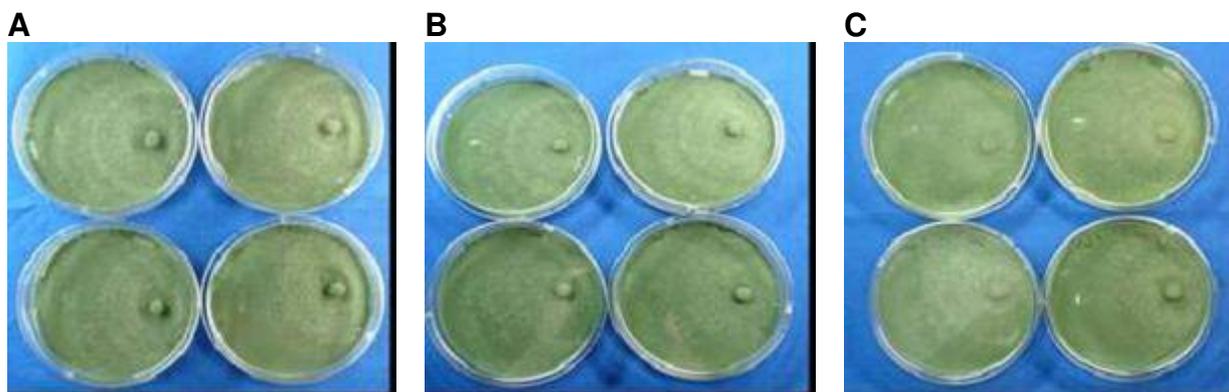


Figura 2. Resultado da compatibilidade representado por ausências de halos de inibição, de colônia de *T. harzianum* cepa ESALQ 1316, em meio de cultura contendo discos de papel impregnados com a dosagem recomendada dos fungicidas químicos aos 7 dias de incubação, sendo pareado com (A) Censor, (B) Ridomil Gold MZ e (C) Cobre Atar BR. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

5.2. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de isolados de *Pythium* sp.

Os fungicidas Censor, Amistar WG 500, Infinito e Ridomil Gold MZ apresentaram inibição do desenvolvimento dos isolados de *Pythium* 9241, 15671(2), 11641(1) e 16243(i) (Tabelas 6, 7, 8 e 9). Dentre estes, observou-se que o Censor, fungicida a base de fenamidona, apresentou maior inibição dos patógenos, para todos os isolados nas dosagens testadas. Ilustrações dos resultados de ensaios para Infinito e Censor encontram-se nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Os resultados sugerem que o produto Censor apresenta potencial para ser utilizado como opção de controle de *Pythium* spp. em rotação ou consórcio de ingrediente ativo, caso seja registrado pelo fabricante para a cultura do tabaco. O Amistar WG 500, produto que também apresentou inibição dos isolados do patógeno, passa a ser potencial ferramenta para utilização em lavoura, pois

segundo o fabricante (comunicação pessoal) este produto quando utilizado na fase de produção de mudas acarretará fitotoxicidade. O produto encontra-se em processo de inclusão da cultura do tabaco para fase de lavoura.

Atualmente o Ridomil Gold MZ e o Infinito são as duas únicas alternativas de defensivos agrícolas disponíveis comercialmente (registrados para a cultura do tabaco e com alvo biológico *Pythium ultimum*).

Cobre Atar BR, Rovral e Positron Duo foram os únicos fungicidas que apresentaram inibição nula para todos os quatro isolados de *Pythium* sp., independente da dosagem testada (Tabelas 6, 7, 8 e 9).

Em função da cultura do tabaco utilizar os fungicidas Cobre Atar e Rovral para *Alternaria tenuissima* e *Sclerotinia sclerotiorum*, buscou-se avaliar a ação dos mesmos para *Pythium* spp. apesar de não se conhecer relatos da eficiência dos mesmos no controle deste patógeno

Para o Positron Duo há relatos de campo (comunicação pessoal) confirmando a ação *in vivo* no controle de *Pythium* spp. Considerando, adicionalmente, que o iprovalicarbe afeta o crescimento do tubo germinativo dos zoósporos e esporângios, crescimento do micélio e esporulação de oomicetos e o propinebe é um fungicida “multi-site” com amplo espectro de ação sobre fungos e oomicetos (Tomlin, 2003), este produto deveria ter ação *in vitro* contra os isolados testados.

Tabela 6. Raio médio de inibição do crescimento micelial, em centímetros, do isolado *Pythium* sp. 9241. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Fungicidas	Dosagem			Média
	0,5	1,0	2,0	
Ridomil Gold MZ (g/L)	0,9	0,4	0,9	0,7 d
Positron Duo (kg/ L)	0,0	0,0	0,0	0,0 e
Censor (mL/ L)	3,1	2,9	3,2	3,1 a
Infinito (mL/ L)	1,1	1,0	1,4	1,2 c
Amistar WG 500 (kg/ L)	2,2	2,5	2,6	2,5 b
Cobre Atar BR (kg/ L)	0,0	0,0	0,0	0,0 e
Rovral (g/ L)	0,0	0,0	0,0	0,0 e
Média	1,0 B	1,0 B	1,2 A	
Média do Fatorial = 1,1 a				
Média da Testemunha = 0,0 b				
C.V. (%) = 22,8				

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 7. Raio médio de inibição do crescimento micelial, em centímetros, do isolado *Pythium* sp. 15671(2). Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Fungicidas	Dosagem			Média
	0,5	1,0	2,0	
Ridomil Gold MZ (g/L)	1,9 b	1,0 c	2,0 b	1,6
Positron Duo (kg/ L)	0,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0
Censor (mL/ L)	3,1 a	2,9 a	3,0 a	3,0
Infinito (mL/ L)	1,0 c	1,4 c	1,4 c	1,3
Amistar WG 500 (kg/ L)	1,3 c	2,1 b	2,2 b	1,9
Cobre Atar BR (kg/ L)	0,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0
Rovral (g/ L)	0,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0
Média	1,0 A	1,1 A	1,2 A	
Média do Fatorial = 1,1 a				
Média da Testemunha = 0,0 b				
C.V. (%) = 32,9				

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 8. Raio médio de inibição do crescimento micelial, em centímetros, do isolado *Pythium* sp. 11641(1). Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Fungicidas	Dosagem			Média
	0,5	1,0	2,0	
Ridomil Gold MZ (g/L)	0,0 d	0,9 c	1,9 c	0,9
Positron Duo (kg/ L)	0,0 d	0,0 d	0,0 e	0,0
Censor (mL/ L)	3,0 a	3,0 a	3,1 a	3,0
Infinito (mL/ L)	0,8 c	1,1 c	1,5 d	1,1
Amistar WG 500 (kg/ L)	1,6 b	2,1 b	2,6 b	2,1
Cobre Atar BR (kg/ L)	0,0 d	0,0 d	0,0 e	0,0
Rovral (g/ L)	0,0 d	0,0 d	0,0 e	0,0
Média	0,6 B	0,7 B	1,0 A	
Média do Fatorial = 1,0 a				
Média da Testemunha = 0,0 b				
C.V. (%) = 15,3				

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 9. Raio médio de inibição do crescimento micelial, em centímetros, do isolado *Pythium* sp. 16243(i). Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Fungicidas	Dosagem			Média
	0,5	1,0	2,0	
Ridomil Gold MZ (g/L)	0,0 d	0,5 d	1,4 c	0,7
Positron Duo (kg/ L)	0,0 d	0,0 e	0,0 e	0,0
Censor (mL/ L)	2,2 a	2,5 a	2,6 a	2,4
Infinito (mL/ L)	1,0 c	0,9 c	1,1 d	1,0
Amistar WG 500 (kg/ L)	1,5 b	1,8 b	2,2 b	1,8
Cobre Atar BR (kg/ L)	0,0 d	0,0 e	0,0 e	0,0
Rovral (g/ L)	0,0 d	0,0 e	0,0 e	0,0
Média	0,5 B	0,6 B	0,8 A	
Média do Fatorial = 0,8 a				
Média da Testemunha = 0,0 b				
C.V. (%) = 18,1				

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.



Figura 3. Inibição do isolado de *Pythium* sp. 9241, após 7 dias de incubação, em meio de cultura, contendo discos de papel impregnados com três dosagens do fungicida químico Infinito Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

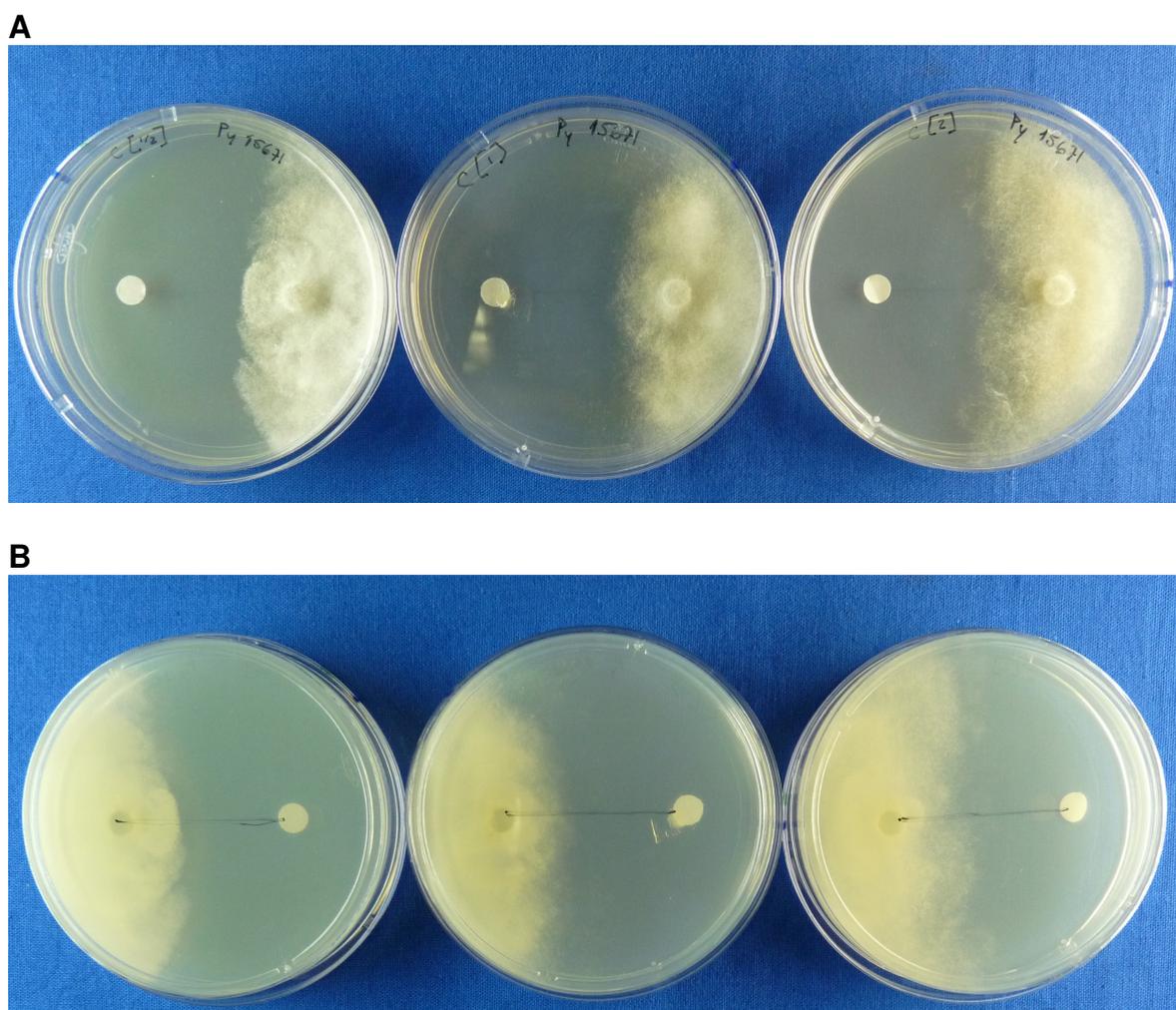


Figura 4. Inibição do isolado de *Pythium* sp. 15671(2), após 7 dias de incubação, em meio de cultura contendo discos de papel impregnados com três dosagens do fungicida químico Censor. (A) frente e (B) verso da placa de Petri, da esquerda para a direita metade da dose, dose recomendada e o dobro da dose, respectivamente para A e B. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

5.3. Cultivo pareado *in vitro* de isolados de *Pythium* sp. com cepas de *Trichoderma harzianum* ESALQ 1306 e 1316

Para os estudos de antagonismo a confrontação direta através do cultivo pareado foi apresentada em porcentagem média da eficiência de antagonização das cepas de *T. harzianum* contra isolados de *Pythium* sp.

Na Tabela 10, independente da temperatura, na presença do *T. harzianum* cepa ESALQ 1316 todos os tratamentos foram 100% eficientes a partir dos 14 dias. O mesmo comportamento não pode ser observado com a cepa ESALQ 1306. Para ambas as temperaturas e cepas de *T. harzianum*, as porcentagens médias de eficiência dos tratamentos foram significativamente superiores após os 14 dias de inoculação.

Diferença significativa foi observada entre os tratamentos, aos 7 dias após a inoculação do *Trichoderma* cepas ESALQ 1306 e 1316 a 23°C e para a cepa ESALQ 1306 a 28°C, mostrando que o antagonismo através do tratamento preventivo *in vitro* (48 horas antes) apresentou maior eficiência de inibição de *Pythium* sp. 15671(2) (Tabela 11). A 23°C a cepa ESALQ 1306 apresentou 100% de eficiência de inibição do isolado de *Pythium* 15671(2), independente do tratamento. Após 14 dias de inoculação esse mesmo comportamento foi observado para a cepa ESALQ 1316 na temperatura de 28°C. Para ambas as cepas de *Trichoderma*, na temperatura de 23°C, as porcentagens médias de eficiência dos tratamentos foram significativamente superiores após os 14 dias de inoculação. A mesma resposta não ocorreu para as demais médias e cepas a 28°C, observando-se que a cepa ESALQ 1316 a 28°C apresentou alta eficiência de controle já aos 7 dias de inoculação, não diferindo estatisticamente do resultado aos 14 e 21 dias.

Aos 7 dias, observou-se que no tratamento 48 horas após a inoculação, da cepa ESALQ 1316, a eficiência de inibição do patógeno diferiu estatisticamente dos tratamentos inoculação simultânea e 48 horas antes dos isolados 9241

(Tabela 10), 15671(2) (Tabela 11), 11641(1) (Tabela 12) e 16243(i) (Tabela 13) de *Pythium*, apresentando eficiência inferior aos demais tratamentos. Para todos os isolados de *Pythium*, 9241, 15671(2), 11641(1) e 16243(i), verificou-se que a cepa de *Trichoderma harzianum* cepa ESALQ 1316 apresentou maior eficiência de inibição nas temperaturas testadas (Tabela 14).

Com os resultados obtidos observou-se que o tratamento preventivo é a melhor estratégia de controle no caso de infecção de *Pythium* em tabaco. Para a maioria dos isolados do fitopatógeno o tratamento com *T. harzianum* 48 horas antes da infecção apresentou o melhor controle (Tabelas 10, 11, 12 e 13).

Na condição de 28°C, considerada ideal para o desenvolvimento de *Pythium ultimum* (Lucas, 1975), a cepa de *T. harzianum* ESALQ 1316 mostrou-se mais agressiva e com eficiência de 100% no tratamento inoculado 48 horas antes do patógeno, para todos os isolados de *Pythium* (Tabelas 10, 11, 12 e 13).

O método de cultivo pareado com disco de ágar é o mais largamente utilizado em estudos de antagonismo *in vitro*, com relatos de sucesso na seleção de microrganismos, visando ao controle biológico de fitopatógenos (Mariano, 1993). É um método que permite mensurar o crescimento micelial, bem como os tipos de interação, como hiperparasitismo, formação de clamidósporos, dentre outros (Faria *et al.*, 2002).

O ambiente, por sua vez, influencia todas as etapas das interações hospedeiro-patógeno-agentes de controle e, assim, torna estudos de antagonismo *in vivo* bastante complexos. As variáveis climáticas (umidade, temperatura, vento e UV, entre outros) interferem na incidência de doenças, pois afetam o

crescimento, a reprodução e a dispersão das plantas, dos patógenos e dos agentes de biocontrole. Além disto, o clima afeta os organismos com os quais a planta, o patógeno e os antagonistas interagem, como microrganismos endofíticos e saprofiticos. Dessa forma, as mudanças climáticas afetarão os agentes de biocontrole e, por conseguinte, interferirão na ocorrência das doenças de plantas (Bettioli & Ghini, 2009).

Trichoderma é um fungo com alta capacidade de tolerar ampla faixa de temperatura (McBeat & Adelma, 1991), sendo mais efetivo em temperaturas mais baixas. Contudo, ressalta-se a importância de se trabalhar com cepas que sejam eficientes em temperaturas ótimas ao desenvolvimento dos patógenos, além da compatibilidade com fungicidas.

Importante salientar que de nada serve selecionar o melhor antagonista para um determinado patógeno, se em seguida por uma má aplicação este não pode exercer um efetivo controle. Uma das chaves para o sucesso dos agentes de biocontrole está na aplicação na hora certa, lugar certo e durante um tempo suficiente (Mondino, 2006).

Uma das características gerais dos métodos de biocontrole é que, em sua maioria, carecem de capacidade curativa e devem ser aplicados preventivamente para que atuem efetivamente (Mondino, 2006).

Tabela 10. Porcentagem média da eficiência de antagonismo do isolado de *Pythium* sp. 9241 por *T. harzianum* cepas ESALQ 1306 e 1316, aos 7, 14 e 21 dias, a 23 e 28°C. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

<i>T.harzianum</i> Cepa	Inoculação	Eficiência (%)					
		23 °C			28 °C		
		7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
ESALQ 1306	48h antes	46,5 a	70,9 b	92,0 a	52,0 a	70,2 a	70,8 a
	Simultânea	27,4 a	56,2 b	67,0 b	26,1 b	35,7 b	33,9 c
	48h após	37,4 a	100,0 a	100,0 a	27,3 b	40,2 b	47,9 b
	Média	37,1 B	75,7 A	86,3 A	35,1 B	48,7 A	50,8 A
ESALQ 1316	48h antes	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
	Simultânea	82,3 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
	48h após	38,9 b	100,0 a	100,0 a	46,9 b	100,0 a	100,0 a
	Média	73,7 B	100,0 A	100,0 A	82,3 B	100,0 A	100,0 A
C.V. (%) =		18,9			13,5		

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 11. Porcentagem média da eficiência de antagonismo do isolado de *Pythium* sp. 15671(2) por *T. harzianum* cepas ESALQ 1306 e 1316, aos 7, 14 e 21 dias, a 23 e 28°C. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

<i>T.harzianum</i> Cepa	Inoculação	Eficiência (%)					
		23 °C			28 °C		
		7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
ESALQ 1306	48h antes	76,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
	Simultânea	58,4 b	100,0 a	100,0 a	74,2 b	88,4 b	100,0 a
	48h após	41,9 c	100,0 a	100,0 a	38,9 c	40,2 b	54,7 b
	Média	58,8 B	100,0 A	100,0 A	71,0 B	76,2 AB	84,9 A
ESALQ 1316	48h antes	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
	Simultânea	84,7 b	100,0 a				
	48h após	43,6 c	94,2 a	100,0 a	79,8 a	100,0 a	100,0 a
	Média	76,1 B	98,1 A	100,0 A	93,3 A	100,0 A	100,0 A
C.V. (%) =		11,1			13,1		

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 12. Porcentagem média da eficiência de antagonismo do isolado de *Pythium* sp. 11641(1) por *T. harzianum* cepas ESALQ 1306 e 1316, aos 7, 14 e 21 dias, a 23 e 28°C. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

<i>T.harzianum</i> Cepa	Inoculação	Eficiência (%)					
		23 °C			28 °C		
		7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
ESALQ 1306	48h antes	59,3 a	100,0 a	100,0 a	65,2 a	94,4 a	94,4 a
	Simultânea	28,4 c	30,9 b	27,9 b	47,4 ab	64,7 b	67,8 b
	48h após	40,3 b	94,1 a	94,1 a	28,4 b	29,9 c	30,1 c
	Média	42,7 B	75,0 A	74,0 A	47,0 B	63,0 A	64,1 A
ESALQ 1316	48h antes	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
	Simultânea	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
	48h após	46,2 b	94,1 a	100,0 a	55,6 b	100,0 a	100,0 a
	Média	82,0 B	98,0 A	100,0 A	85,0 A	100,0 A	100,0 A
C.V. (%) =		7,6			22,9		

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 13. Porcentagem média da eficiência de antagonismo do isolado de *Pythium* sp. 16243(i) por *T. harzianum* cepa ESALQ 1306 e 1316, aos 7, 14 e 21 dias, a 23 e 28°C. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

<i>T.harzianum</i> Cepa	Inoculação	Eficiência (%)					
		23 °C			28 °C		
		7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
ESALQ 1306	48h antes	47,8 a	72,6 b	80,7 b	51,1 ab	56,1 b	57,3 b
	Simultânea	44,3 a	100,0 a	100,0 a	74,0 a	100,0 a	100,0 a
	48h após	23,2 b	100,0 a	100,0 a	23,9 b	22,6 c	38,6 c
	Média	38,4 B	90,9 A	93,6 A	49,7 B	59,6 B	65,3 A
ESALQ 1316	48h antes	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
	Simultânea	100,0 a	100,0 a	100,0 a	85,7 a	100,0 a	100,0 a
	48h após	44,1 b	94,2 a	100,0 a	52,4 b	100,0 a	100,0 a
	Média	81,4 B	98,1 A	100,0 A	79,4 B	100,0 A	100,0 A
C.V. (%) =		7,2			13,5		

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 14. Porcentagem média da eficiência de antagonismo de isolados de *Pythium* em presença do *T. harzianum* cepas ESALQ 1306 e 1316, a 23 e 28°C. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

<i>T.harzianum</i>	Eficiência (%)							
	<i>Pythium</i> sp. 9241		<i>Pythium</i> sp. 15671(2)		<i>Pythium</i> sp. 11641(1)		<i>Pythium</i> sp. 16243(i)	
	23°C	28°C	23°C	28°C	23°C	28°C	23°C	28°C
Cepa								
ESALQ 1306	66,4 b	44,9 b	86,3 b	77,4 b	63,9 b	58,0 b	74,3 b	58,2 b
ESALQ 1316	91,2 a	94,1 a	91,4 a	97,8 a	93,0 a	95,0 a	93,1 a	93,1 a
C.V. (%) =	18,9	13,5	11,1	13,1	7,6	22,9	7,2	13,5

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

5.4. Patogenicidade de *Pythium* spp. em mudas de tabaco

Avaliados em ensaio prático de patogenicidade, todos os isolados que produziram zoósporos através de estímulo térmico *in vitro* provocaram infecções nas mudas de tabaco e acarretaram morte das mesmas (Tabela 15). Por não produzir este esporo capaz de se locomover na água, apenas o isolado 11641(1) não causou danos às mudas.

Tabela 15. Porcentagem de mudas de tabaco mortas. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Tratamentos	% Mudas mortas
Controle (sem <i>Pythium</i> sp.)	0
<i>Pythium</i> sp. 16243(i)	100
<i>Pythium</i> sp. 9241	100
<i>Pythium</i> sp. 15671(2)	100
<i>Pythium</i> sp. 11641(1)*	0

* O isolado não produziu zoósporos

5.5. Avaliação *in vivo*

5.5.1. Controle de *Pythium* sp. em mudas de tabaco

Mediante a avaliação da eficiência isolada ou combinada dos fungicidas Ridomil Gold MZ e Infinito, e do produtos Trichodermil cepa ESALQ 1306 e Trichodermil experimental cepa ESALQ 1316, verificou-se que, a aplicação dos fungicidas proporcionou eficiência de controle na ausência dos produtos a base de *T. harzianum* Rifai. Quando se utilizou o Trichodermil experimental cepa ESALQ 1316, observou-se efeito combinado de controle, sendo provável o de proteção através do *Trichoderma* inoculado no substrato, além do efeito curativo decorrente da aplicação posterior dos fungicidas. Contudo, não houve efeito protetor da cepa ESALQ 1316 isoladamente, sugerindo efeito sinérgico da cepa com os fungicidas testados. Quando utilizado o Trichodermil a base da cepa ESALQ 1306, não houve diferença significativa, isoladamente ou em combinação com os fungicidas químicos (Tabela 16).

Segundo dados do sistema Agrofit, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), atualmente existem no país dois diferentes produtos registrados contra podridão radicular, causado por *Pythium ultimum*, para a cultura do tabaco, o Ridomil Gold MZ e o Infinito. Infinito é um fungicida sistêmico e translaminar, com princípio ativo cloridrato de propamocarbe + fluopicolide, indicado no tratamento de doenças radiculares nas culturas de batata, tabaco e tomate. O Ridomil Gold MZ é um fungicida de contato e sistêmico indicado para as culturas da batata, cebola, tabaco, rosa, tomate e uva. Ambas

formulações contêm ingrediente ativo que agem sobre microrganismos do grupo oomicota.

É importante salientar que apenas um produto a base de *T. harzianum* está registrado no Brasil, o Trichodermil SC 1306 (Agrofit, 2010), sendo difícil o registro de produtos a base de agentes de biocontrole, pois a legislação adotada é a mesma para defensivos agrícolas.

Tabela 16. Porcentagem de eficiência dos tratamentos no controle de *Pythium* sp. isolado 9241. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Tratamento	Fungicida			Média
	Sem	Ridomil Gold MZ	Infinito	
Sem Trichodermil	0,0 B	72,2 A	45,0 A	39,0 a
Trichodermil cepa ESALQ 1306	33,5 A	71,3 A	47,0 A	50,6 a
Trichodermil cepa ESALQ 1316	17,3 B	78,9 A	79,9 A	58,7 a
Média	16,9	74,1	57,3	
C.V. (%) = 36,2				

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

5.5.2. Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas

A aplicação do Trichodermil cepa ESALQ 1306 no substrato proporcionou aumento na germinação das sementes de tabaco. Resultado semelhante foi obtido por Windham *et al.* (1986) relatando um aumento significativo na taxa de germinação de sementes em solo tratado com *T. koningii*. Contudo, não houve diferença estatística que refletisse no desenvolvimento inicial, através da massa seca das plântulas (Tabela 17). Efeitos observados, no entanto, não formalmente registrados de desuniformidade/ velocidade de germinação e consequente desenvolvimento inicial das plântulas poderiam explicar ao menos

parcialmente o alto coeficiente de variação encontrado para a variável massa seca e conseqüentemente a contribuição limitada de diferenciação da análise de variância.

Um dos mecanismos de ação de *Trichoderma* sp. é a capacidade de certos isolados promoverem o crescimento de plantas e aumentarem a germinação e emergência de sementes (Melo, 1998). A promoção de crescimento pode ser induzida de diversas formas por fungos e bactérias: por produção de hormônios vegetais, produção de vitaminas ou conversão de materiais a uma forma útil à planta, absorção e translocação de minerais e por controle de patógenos. A aplicação de *Trichoderma* sp. tem levado a aumentos significativos na porcentagem e na precocidade de germinação, na massa seca e na altura das plantas (Melo, 1996).

Tabela 17. Porcentagem de germinação e massa seca (gramas) das plântulas, avaliadas no momento do desbaste/repique. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Tratamento	Germinação (%)	Massa Seca (g)
Sem Trichodermil	82,9 b	0,0773 a
Trichodermil cepa ESALQ 1306	90,9 a	0,0355 a
Trichodermil cepa ESALQ 1316	82,9 b	0,1124 a
C.V. (%) =	2,9	73,9

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

5.5.3. Características agronômicas das mudas

A maior porcentagem de mudas aptas ao transplante foi observada quando utilizados os fungicidas químicos em combinação com o produto experimental Trichodermil cepa ESALQ 1316 ou sem Trichodermil. Apenas

quando utilizado o Trichodermil cepa ESALQ 1306 não foi observada diferença estatística entre os tratamentos com ou sem fungicida. Na média, os produtos a base de *T. harzianum* cepas ESALQ 1306 e 1316 no substrato, em combinação ou não com fungicidas, não resultaram em diferença significativa quando comparados com o tratamento sem a adição do mesmo (Tabela 18).

Tabela 18. Porcentagem de mudas aptas ao final do ciclo de produção de mudas. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Tratamento	Fungicida			Média
	Sem	Ridomil Gold MZ	Infinito	
Sem Trichodermil	52,0 B	86,7 A	77,3 A	72,0 a
Trichodermil cepa ESALQ 1306	68,0 A	86,7 A	74,7 A	76,4 a
Trichodermil cepa ESALQ 1316	56,0 B	92,0 A	90,7 A	79,6 a
Média	58,7	88,4	80,9	
Média do fatorial = 76,0 b				
Média do controle = 100,0 a				
C.V. (%) = 11,7				

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Obteve-se maior ganho de massa seca da parte aérea e do sistema radicular em mudas aptas nos tratamentos onde foram aplicados os fungicidas em combinação com os produtos a base de *Trichoderma* no substrato (Tabelas 19 e 20). Tanto o Trichodermil cepa ESALQ 1306 quanto 1316, isoladamente, proporcionaram o incremento da massa seca do sistema radicular (Tabela 20). Resultado semelhante foi obtido por Benitez *et al.* (2004) verificando a estimulação do crescimento radicular em mudas de tabaco pela cepa CECT 2413 de *T. harzianum*. Na Tabela 19, para a avaliação de incremento de massa seca da parte aérea, verificou-se que a utilização do produto experimental Trichodermil cepa

ESALQ 1316 isoladamente ou em combinação com a utilização dos fungicidas não possibilitou a diferença entre os tratamentos. Em outro estudo, Windham *et al.* (1986), obteve maior uniformidade do que os controles, e aumento da massa da raiz e da parte aérea, quando o solo foi inoculado com *T. koningii*.

Tabela 19. Massa seca da parte aérea, em gramas, ao final do ciclo de produção. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Tratamento	Fungicida			Média
	Sem	Ridomil	Infinito	
Sem Trichodermil	0,7968 B	0,8993 AB	0,9970 A	0,8977 b
Trichodermil cepa ESALQ 1306	0,8944 B	1,0498 A	1,1516 A	1,0319 a
Trichodermil cepa ESALQ 1316	1,0472 A	1,0523 A	1,0761 A	1,0585 a
Média	0,9128	1,0004	1,0749	
Média do fatorial = 0,9961 a				
Média do controle = 0,8831 b				
C.V. (%) = 9,0				

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 20. Massa seca do sistema radicular, em gramas, ao final do ciclo de produção. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Tratamento	Fungicida			Média
	Sem	Ridomil	Infinito	
Sem Trichodermil	0,1897 A	0,2503 A	0,2654 A	0,2351 b
Trichodermil cepa ESALQ 1306	0,2382 A	0,3012 A	0,3132 A	0,2842 a
Trichodermil cepa ESALQ 1316	0,2700 A	0,3343 A	0,3163 A	0,3068 a
Média	0,2326	0,2953	0,2983	
Média do fatorial = 0,2754 a				
Média do controle = 0,2868 a				
C.V. (%) = 14,3				

Nota: Médias acompanhadas de pelo menos uma letra igual, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1. As cepas de *T. harzianum* ESALQ 1306 e 1316 apresentaram compatibilidade com todos os fungicidas testados em ensaios *in vitro*;
2. Os isolados 9241, 15671(2), 11641(1) e 16243(i) de *Pythium* spp. foram inibidos pelos fungicidas Censor, Amistar WG 500, Infinito e Ridomil Gold MZ em ensaios *in vitro*. O Censor foi o produto que apresentou melhor resultado de inibição. Positron Duo, Cobre Atar BR e Rovral não apresentaram ação sobre os isolados;
3. A cepa ESALQ 1316 de *Trichoderma harzianum* apresentou maior eficiência de inibição dos isolados *Pythium*, 9241, 15671(2), 11641(1) e 16243(i), em cultivo pareado à 23°C e 28°C;
4. Isoladamente o Trichodermil cepa ESALQ 1306 apresentou eficiência no controle de *Pythium* sp. em mudas de tabaco não diferindo da aplicação combinada com o Ridomil Gold MZ e o Infinito;

5. A combinação do Ridomil Gold MZ ou Infinito com o produto experimental Trichodermil cepa ESALQ 1316 apresentou maior eficiência de controle de *Pythium* sp. quando comparada ao agente de biocontrole isoladamente em mudas de tabaco;
6. A aplicação do Trichodermil cepa ESALQ 1306 no substrato proporcionou aumento na germinação das sementes de tabaco;
7. Ganhos de massa seca da parte aérea e do sistema radicular foram obtidos quando se utilizou produtos a base de *T. harzianum* combinados ou não com os fungicidas Ridomil Gold MZ e Infinito.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Medidas de controle de doenças de plantas tais como o uso de variedades resistentes, fungicidas químicos e microrganismos antagonistas podem funcionar bem quando empregadas em conjunto, de modo integrado (Paula Júnior *et al.* 2008).

A utilização de técnicas disponíveis através de recomendações de forma unificada, conceitualizando o termo manejo integrado de pragas, combina o conhecimento biológico com a tecnologia disponível para alcançar as modificações necessárias. Na prática, o desenvolvimento de métodos de controle adaptados às tecnologias disponíveis e compatíveis levará em conta, igualmente, os aspectos econômicos e ecológico-ambientais. Este conjunto de práticas contínuas do controle de doenças busca reduzir o custo de produção e taxa de progresso da doença mantendo a redução da produção abaixo do limiar de dano

econômico, sem ao mesmo tempo, prejudicar o homem, os animais, as plantas e o meio ambiente (Filho & Amorim, 1996).

Tanto na prevenção e no tratamento de doenças a eficiência dos métodos e seus custos devem ser considerados. Para o M.I.P. a utilização de fungicidas torna-se uma ferramenta valiosa considerando que o custo do método empregado deve ser menor que o prejuízo causado pela doença.

Conhecer os produtos disponíveis no mercado e trabalhar as formas de utilização deve fazer parte do programa de manejo integrado. Assim, pode-se buscar a prevenção através da sanitização e da ferramenta de controle biológico e utilização dos fungicidas de forma curativa ou para manejo de resistência de fungos a fungicidas através da prática de rotação ou consórcio de i.a. Esta prática contribuirá com a manutenção ou mesmo a redução da carga de i.a. na cultura do tabaco, auxiliando na administração do cenário regulatório altamente restritivo de defensivos agrícolas, na atuação responsável no que diz respeito à qualidade do tabaco produzido e nos impactos desta fatia do agrobusiness no meio ambiente. A escolha e o uso inteligente de medidas de controle fitossanitário produzirão consequências favoráveis para o produtor, para a sociedade e para o meio ambiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide, **Journal of Economic Entomology**, College Park, v,18, p. 265-266, 1925.

AFUBRA. Associação dos Fumicultores do Brasil. Julho de 2010. Disponível em: http://www.afubra.com.br/principal.php?acao=conteudo&u_id=1&i_id=1&menu_sit_e_id=19. Data de acesso: 04 de julho de 2010.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasil. Disponível em :http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Data de acesso 30 de julho de 2010.

ALVES, H. T. Legislação sobre defensivos agrícolas no Brasil: passado, presente e futuro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 4-6, 1986.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v. 7, p. 249 – 260, 2004.

BETTIOL, W. & GHINI, R. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas In: BETTIOL, W. & MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas, **EMBRAPA Meio Ambiente**, Jaguariúna, p. 29 – 48, 2009.

BJORKMAN, T.; BLANCHARD, L. M.; HARMAN, G.E. Growth enhancement of shrunken-(sh2) sweet maize by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of environmental stress. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123, p.35–40, 1998.

BRICE, I. G. Impacto ambiental – Os defensivos agrícolas em perspectiva. (**Documento Especial**), 1991. 10 p.

CARVALHO, C. De. *et al.* **Anuário brasileiro de tabaco 2008**, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2008. 136 p.

CHAVERRI, P., SAMUELS, G.J. & STEWART, E.L. Convergent evolution of *Gliocladium* morphology in *Hypocrea*. Abstract. Inoculum. Newsletter of the Mycological Society of America. Mycologia, p. 51-24, 2000.

CHET, I.; ELAD, Y.; KALFON, A.; HADAR, Y.; KATAN, J. Integrated control of soilborne and bulbborne pathogens in iris. **Phytoparasitica**, Tel Aviv, v. 10, p. 229 - 236, 1982

CHET, I. *Trichoderma*: Application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. Ed. **Innovative Approaches to Plant Disease Control**, New York, p. 137–160, 1987

CHET, I. Biological control of soilborne pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments. In: HORNBY, D.; COOK, R. J.; HENIS, Y.; KO, W.H.; ROVIRA, A. D.; SCHIPPERS, B.; SCOTT P. R., eds. Biological Control of Soilborne Pathogens, **CAB Publishing House**, New York, p. 15–25, 1990.

.CORESTA. Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco. The concept and implementation of agrochemical guidance residue levels, June 2008. Disponível em : [http://www.coresta.org/Guides/Guide-No1-GRLs\(2nd-Issue-June08-Addendum-June10\).pdf](http://www.coresta.org/Guides/Guide-No1-GRLs(2nd-Issue-June08-Addendum-June10).pdf). Data de acesso: 22 de fevereiro de 2010.

DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III, Hyphal interactions, **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, p. 359-363, 1971.

FARIA, A. Y. K.; CASSETARI NETO, D.; ALBUQUERQUE, M. C. A. Atividade antagônica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* a patógenos de sementes de algodoeiro. **Revista Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 6, n. 1, p. 59-68, 2002.

FILHO, A. B. & L. AMORIM. **Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1996. 289 p.

FORTES, F.O., SILVA, A.C.F., ALMANÇA, M.A.K. & TEDESCO, S.B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. Rev. Árvore, v. 31, n. 2, p.221-228, 2007.

GAUCH, F. **Micoparasitismo de espécies de *Pythium* com oogônio equinulado e o controle de *Pythium ultimum* Trow causador de tombamento**

de mudas, em hortaliças. 94 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 1996.

GUTIERREZ, W. A.; SHEW, H. D.; MELTON, T. A. Sources of inoculum and management for *Rhizoctonia solani* and damping-off on tobacco transplants under greenhouse conditions, **Plant disease**, Saint Paul, v. 81, p. 604-606, 1997.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22, **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, p. 377 - 393, 2000.

HENDRIX, F. F.; CAMPBELL, W. A. *Pythium* as plant pathogens, **Annual Review in Phytopathology**, Palo Alto, v.11, p. 77–98, 1973.

HOWELL, C. R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp, and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p.177– 180, 2002.

HURNG, W. P. & KAO, C. H. Growth responses of tobacco to flooding. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, Taiwan, v. 34, p. 243-247, 1993.

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.

JACOBSEN, B. USDA Integrated Pest Management Initiative. **Radcliffe's IPM World Text Book**. November 20, 2009. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/jacobsen.htm>, Data de acesso: 10 de maio de 2010.

KHAN, M. O. & SHAHZAD, S. Screening of *Trichoderma* species for tolerance to fungicides. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, n. 3, p. 945-951, 2007.

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

LIFSCHITZ, R.; LIFSCHITZ, S.; BAKER, R. Decrease in incidence of *Rhizoctonia* pre-emergence damping-off by use of integrated chemical and biological controls, **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, p. 431-434, 1985.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: Produção e comercialização de microrganismos no Brail. In: Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas, **EMBRAPA Meio Ambiente**, Jaguariúna, p. 15 - 28, 2009.

LUCAS, G. B. **Diseases of tobacco**, New York: North Carolina State College: The Scarecrow Press, p. 168-286, 1958.

LUCAS, G.B. Disease of Tobacco. **Biological Consulting Associates**. Raleigh, North Carolina, U.S.A., 1975. 621 p.

LUMSDEN, R, D. & LOCKE, J. C. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soil mix, **Phytopathology**, Saint Paul, v. 3, p. 361 - 366, 1989.

LUTCHEMEAH, R. A. & COOKE, R. C. Pelleting of seed with the antagonist *Pythium oligrandum* for biological control of damping-off, **Plant Pathology**, San Diego, v. 34, p. 528 - 531, 1985.

MAO, W.; LUMSDEN, R. D.; LEWS, J. A. *et al.* Seed treatment using pre-filtration and biocontrol agents to reduce damping-off of maize caused by species of *Pythium* and *Fusarium*, **Plant Disease**, Saint Paul, v. 3, p. 294 - 299, 1998.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção “*in vitro*” para controle microbiológico. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 369 - 409, 1993.

MCBEATH, J. & ADELMAN, M. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. Abstract. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1151, 1991.

MCDANIEL, P. A.; SOLOMON, G. & MALONE, R. E. The Tobacco Industry and Pesticide Regulations: Case Studies from Tobacco Industry Archives. **Environmental Health Perspectives**, United State of America, v. 113, n. 12, 2005.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (org.) Controle biológico de doenças de plantas **EMBRAPA CNPDA**, Jaguariúna, p. 135 – 156, 1991.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.261-295, 1996.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S. de.; AZEVEDO, J.L. de. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

MIDDLETON, J. T. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*, **Memoirs Torrey Botanical Club**, Chicago, v. 20, p. 1-171, 1943.

MILA, M. & RADCLIFF, J. NC State University. Managing Disease In: **Flue-Cured Tobacco Guide**, North Carolina, p.155-184, 2008.

MILA, M. & RADCLIFF, J. NC State University, Managing Diseases In: **Flue Cured Tobacco Guide 2010**, North Carolina, p. 143- 176, 2010.

MOHAMED, H.A.L.A. & HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. Braz. J. Microbiol. v.37, n.2, p.181-191, 2006..

MONDINO, A. P. Aplicación de agentes de control biológico In: MONDINO, A. P. & VERO, S. **Control biológico de patógenos de plantas**. Uruguay, 2006. 158 p.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, New York, v. 4, p.1-4, 2001.

MORANDI, M. A. B. & BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas, **EMBRAPA Meio Ambiente**, Jaguariúna, p. 7 – 14, 2009.

NEUMANN, R. I.; CORREA, S.; BELING, R.; *et al.* **Anuário Brasileiro de Fumo**, Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de Comunicações, p. 3-136, 1999.

NEUMANN, R. I.; CORREA, S.; BELING, R. *et al.* **Anuário Brasileiro de Fumo**, Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de Comunicações, p. 3-136, 2003.

PAL, K. K. & B. MCSPADDEN GARDENER. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1 - 25, 2006. Disponível em: <http://www.apsnet.org/education/advancedplantpath/topics/biolcontrol/pdfs/PHI-BiologicalControl.pdf>. Data de acesso: 10 de maio de 2010.

PANDOLFO, J. D. **Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***, Dissertação (Mestre em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

PAULA JÚNIOR, T.J., VIEIRA, R.F., TEIXEIRA, H., COELHO, R.R., CARNEIRO, J.E.S., ANDRADE, M.J.B. & REZENDE, A.M.. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009**. EPAMIG-CTZM, Viçosa, 2008. 180 p.

PEARCE, B.; PALMER, G.; BAILEY, A.; SEEBOLD, K. & TOWNSEND, L. Management of Tobacco Float Systems In: **Tobacco Production Guide 2009 - 2010**, Kentucky & Tennessee, p.11- 22, 2009.

RAHIMIAN, M. K. & BANIHASHEMI, Z. A method for obtaining zoospores of *Pythium aphanidermatum* and their use in determining cucurbit seedling resistance to damping-off. **Plant Disease Report**, Saint Louis, v. 63, n. 8, p. 658-661, 1979.

RAMIREZ, I. S. *et al.* *Trichoderma harzianum* (Cepa A34): un biopreparo de amplio espectro para micopatologias Del tomate y Del pimiento. Habana, INISAV, **CID – INISAV Boletín Técnico 4**, 1995. 36 p.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. Alternativas para a redução ou eliminação de produtos químicos no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, p. 305-306, 1987.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279 p.

SEEBOLD, K. **2010 Fungicide Guide for Burley and Dark Tobacco**, Plant pathology fact sheet, Lexington – Kentucky, 2010. Disponível em: http://www.ca.uky.edu/agcollege/plantpathology/ext_files/PPFShtml/ppfsagt8.pdf, Data de acesso: 09 de abril de 2010.

SHEW, H. D. In: **Compendium of Tobacco Diseases**. G. Lucas and H. D. Shew. eds. APS Press, Saint. Paul, MN, p. 20-21, 1991.

SILVA, P.R.Q. **Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes egfp e (-tubulina)**. 129 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília. 2000.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P.; SILVA, D. S.; SÃO JOSÉ, A. R.; BENETT, C. G. S. Avaliação antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

SINDITABACO. **A cultura do tabaco no Sul do Brasil**. Sindicato da Indústria do Tabaco, Santa Cruz do Sul, p.18, 2009.

SINDITABACO. **Tabaco no Sul do Brasil: Uma cultura sustentável**. 2010. 15 p. Disponível em: http://www.sinditabaco.com.br/pdf/cultura_tabaco_pt_2010.pdf Data de acesso: 04 de julho de 2010.

SOUZA, P. E. & DUTRA, M. R. **Fungicidas no controle e manejo de doenças de plantas**. Lavras, Ed. UFLA, 2003. 174 p.

SPIEGEL, Y. & CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Review**, New York, v. 3, p. 169 – 175, 1998.

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 hydroponic crops: Current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 307-321, 2006.

TATAGIBA, J. da S.; OLIVEIRA, K. G. V. de; AGUILAR, M. A. G. Avaliação da eficiência do trichodermil no controle da podridão de *Phytophthora* na cultura do mamão (*Carica papaya* L.), **Papaya Brasil**, Vitória, p. 402 – 404, 2005.

TOMLIN, C.D.S. (Ed.) A World Compedium: **The Pesticide Manual**. 13 Ed., BCPC, Hampshire, U.K., 2003.1344 p.

U. S. GAO. (UNITED STATES GENERAL ACCOUNTING OFFICE), **Pesticides on Tobacco: Federal Activities to Assess Risks and Monitor Residues**, Washington D.C.:U.S. General Accounting Office, 2003.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Possibilidades do controle biológico de *Phytophthora* em macieira. In: BETTIOL, W (Ed). Controle Biológico de Doenças de Plantas, **EMBRAPA Meio Ambiente**, Jaguariúna, p. 303 – 305, 1991.

VAN DER PLAATS-NITERINK, A. J. Monograph of the genus *Pythium*, **Studies in Mycology**, Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1981. 242 p.

VECANTO, A. Z. *et al.* **Anuário brasileiro de tabaco 2009**, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2009.152 p.

VERA D., PENÃ VENEGAS, C., CARDONA VANEGAS G. 2007. *Trichoderma* sp. Persoon 1794. Disponível em : <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=542&method=displayAAT>. Data de acesso: 03 de Janeiro de 2010.

WATERHOUSE, G. M. Key to *Pythium Pringsheim*, **Mycological Papers**, Kew, v. 109, n.1, p. 1-15, 1967.

WINDHAM M.T. ELAD Y. & BAKER R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 518 – 521, 1986.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense response in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1061–1070, 1999.

ZIMAND, G.; ELAD, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity, **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p.1255–1260, 1996.

APÊNDICE

Quadros de Análise da Variância

Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de isolados de *Pythium*

<i>Pythium</i> sp. 9241				
Causa da variação	GL	SQ	QM	Pr > F
Fatorial (7x3)	20	114,4328	5,7216	<,0001
Fungicidas	6	113,0156	18,8359	<,0001
Dosagem	2	0,4269	0,2134	0,0226
Fungicidas x Dosagem	12	0,9904	0,0825	0,1282
Fatorial vs testemunha	1	4,2834	4,2834	<,0001
Erro Experimental	66	3,5088	0,0532	
C.V. (%) = 22,8				

<i>Pythium</i> sp. 15671(2)				
Causa da variação	GL	SQ	QM	Pr > F
Fatorial (7x3)	20	103,1017	5,1551	<,0001
Fungicidas	(6)	(98,5384)	(16,4231)	(<,0001)
Dosagem	2	0,6009	0,3004	0,0936
Fungicidas x Dosagem	(12)	(3,9624)	(0,3302)	(0,0051)
Fungicida (Dosagem 0,5)	6	32,5850	5,4308	<,0001
Fungicida (Dosagem 1,0)	6	32,5573	5,4262	<,0001
Fungicida (Dosagem 2,0)	6	37,3585	6,2264	<,0001
Fatorial vs testemunha	1	4,7418	4,7418	<,0001
Erro Experimental	66	8,0736	0,1223	
C.V. (%) = 32,9				

<i>Pythium</i> sp. 11641(1)				
Causa da variação	GL	SQ	QM	Pr > F
Fatorial (7x3)	20	110,3457	5,5173	<,0001
Fungicidas	(6)	(99,8800)	(16,6467)	(<,0001)
Dosagem	2	4,2144	2,1072	<,0001
Fungicidas x Dosagem	(12)	(6,2514)	(0,5209)	(<,0001)
Fungicida (Dosagem 0,5)	6	31,1669	5,1945	<,0001
Fungicida (Dosagem 1,0)	6	32,9217	5,4870	<,0001
Fungicida (Dosagem 2,0)	6	42,0428	7,0071	<,0001
Fatorial vs testemunha	1	4,0133	4,0133	<,0001
Erro Experimental	66	1,4748	0,0223	
C.V. (%) = 15,3				

<i>Pythium</i> sp. 16243(i)				
Causa da variação	GL	SQ	QM	Pr > F
Fatorial (7x3)	20	73,2336	3,6617	<,0001
Fungicidas	(6)	(68,2414)	(11,3736)	(<,0001)
Dosagem	2	1,6584	0,8292	<,0001
(Fungicidas x Dosagem)	(12)	(3,3339)	(0,2778)	(<,0001)
Fungicida (Dosagem 0,5)	6	20,4687	3,4115	<,0001
Fungicida (Dosagem 1,0)	6	23,5637	3,9273	<,0001
Fungicida (Dosagem 2,0)	6	27,5428	4,5905	<,0001
Fatorial vs testemunha	1	2,6911	2,6911	<,0001
Erro Experimental	66			
C.V. (%) = 18,1				

Cultivo pareado *in vitro* de isolados de *Pythium* spp. com cepas de *Trichoderma harzianum* ESALQ 1306 e 1316

<i>Pythium</i> sp. 9241							
Causa da variação	GL	23 °C			28 °C		
		SQ	QM	Pr > F	SQ	QM	Pr > F
Total	71	59952,4311			66434,3432		
Modelo	17	48033,8011	2825,5177	<,0001	61629,2957	3625,2527	<,0001
Trichod	1	11045,9339	11045,9339	<,0001	42997,7813	42997,7813	<,0001
Aval. (Trichod 1306)	2	16113,6517	8056,8258	<.0001	1513,9839	756,9919	0,0006
Aval. (Trichod 1316)	2	5642,7606	2821,3803	<.0001	2503,9606	1251,9803	<.0001
Inoc.	(2)	(1961,3286)	(980,6643)	(0,0164)	(5992,2769)	(2996,1385)	(<,0001)
Trichod.* Inoc.	(2)	(5991,2186)	(2995,6093)	(<,0001)	(3326,7333)	(1663,3663)	(<,0001)
Aval * Inoc.	(4)	(6270,3306)	(1567,5826)	(0,0001)	(2878,4514)	(719,6129)	(<,0001)
Trichod.*Aval * Inoc.	(4)	(1008,5772)	(252,1443)	(0,3465)	(2416,1092)	(604,0273)	(0,0002)
Inoc. [Trichod 1306 (Aval 7)]	2	730,1017	365,0508	0,2008	1501,7317	750,8658	0,0006
Inoc. [Trichod 1306 (Aval 14)]	2	3978,0650	1989,0333	0,0004	2821,7117	1410,8558	<,0001
Inoc. [Trichod 1306 (Aval 21)]	2	2370,6667	1185,3333	0,0075	2778,2450	1389,1225	<,0001
Inoc. [Trichod 1316 (Aval 7)]	2	8152,6217	4076,3108	<,0001	7511,8817	3755,9408	<,0001
Inoc. [Trichod 1316 (Aval 14)]	2	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
Inoc. [Trichod 1316 (Aval 21)]	2	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
Erro Experimental	54	11918,6300	220,7154		4805,0475	88,9824	
C.V. (%)		18,9			13,5		

<i>Pythium</i> sp. 15671(2)							
Causa da variação	GL	23°C			28°C		
		SQ	QM	Pr > F	SQ	QM	Pr > F
Total	71	33081,7632			38307,3565		
Modelo	17	27540,4507	1620,0265		31167,7390	1833,3964	
Trichod	1	472,7813	472,7813	0,0363	7484,7613	7484,7613	<,0001
Aval. (Trichod 1306)	2	13601,5022	6800,7511	<,0001	1178,6756	589,3378	0,0162
Aval. (Trichod 1316)	2	4230,3172	2115,1586	<,0001	363,6006	181,8003	0,2615
Aplicação	(2)	(3196,6344)	(1598,3172)	(<,0001)	(12971,7169)	(6485,8585)	(<,0001)
Trichod*Aplicação	(2)	(383,8900)	(191,9450)	(0,1639)	(7668,2725)	(3834,1363)	(<,0001)
Aval *Aplicação	(4)	(5253,7556)	(1313,4389)	(<,0001)	(696,8722)	(174,2181)	(0,2751)
Trichod *Aval *Aplicação	(4)	(401,5700)	(100,3925)	(0,4271)	(803,8400)	(200,9600)	(0,2094)
Apl. [Trichod 1306 (Aval 7)]	2	2326,2867	1163,1433	<,0001	7525,3267	3762,6633	<,0001
Apl. [Trichod 1306 (Aval 14)]	2	0,0017	0,0008	1,0000	8040,2467	4020,1233	<,0001
Apl. [Trichod 1306 (Aval 21)]	2	0,0017	0,0008	1,0000	5484,3267	2742,1633	<,0001
Apl. [Trichod 1316 (Aval 7)]	2	6818,6867	3409,3433	<,0001	1090,8017	545,4008	0,0215
Apl. [Trichod 1316 (Aval 14)]	2	90,8717	45,4358	0,6446	0,0000	0,0000	1,0000
Apl. [Trichod 1316 (Aval 21)]	2	0,0017	0,0008	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
Erro Experimental	54	5541,3125	102,6169		7139,6175	132,2151	
C.V. (%)		11,1			13,1		

<i>Pythium</i> sp. 11641(1)							
Causa da variação	GL	23°C			28°C		
		SQ	QM	Pr > F	SQ	QM	Pr > F
Total	71	62328,7128			69912,7978		
Modelo	17	60386,8278	3552,1663	<,0001	53311,8028	3135,9884	<,0001
Trichod	1	15635,0139	15635,0139	<,0001	24701,2356	24701,2356	<,0001
Aval. (Trichod 1306)	2	8129,6772	4064,8386	<,0001	2206,8822	1103,4411	0,0344
Aval. (Trichod 1316)	2	2321,2350	1160,6175	<,0001	1752,3200	876,1600	0,0666
Aplicação	(2)	(9869,6469)	(4934,8235)	(<,0001)	(15123,2669)	(7561,6335)	(<,0001)
Trichod*Aplicação	(2)	(15742,9169)	(7871,4585)	(<,0001)	(4974,4136)	(2487,2068)	(0,0008)
Aval *Aplicação	(4)	(7334,0972)	(1833,5243)	(<,0001)	(504,2956)	(126,0739)	(0,8006)
Trichod *Aval *Aplicação	(4)	(1354,2406)	(338,5601)	(<,0001)	(4049,3889)	(1012,3472)	(0,0174)
Apl. [Trichod 1306 (Aval 7)]	2	1942,7550	971,3775	<,0001	2709,3617	1354,6808	0,0169
Apl. [Trichod 1306 (Aval 14)]	2	11742,3017	5871,1508	<,0001	8325,6317	4162,8158	<,0001
Apl. [Trichod 1306 (Aval 21)]	2	12806,4650	6403,2325	<,0001	8359,4117	4179,7058	<,0001
Apl. [Trichod 1316 (Aval 7)]	2	7718,5067	3859,2533	<,0001	5256,9600	2628,4800	0,0006
Apl. [Trichod 1316 (Aval 14)]	2	90,8717	45,4358	0,2909	0,0000	0,0000	1,0000
Apl. [Trichod 1316 (Aval 21)]	2	0,0017	0,0008	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
Erro Experimental	54	1941,8850	35,9608		16600,9950	307,4258	
C.V. (%)		7,6			22,9		

<i>Pythium sp.</i> 16243(i)							
Causa da variação	GL	23°C			28°C		
		SQ	QM	Pr > F	SQ	QM	Pr > F
Total	71	46927,6088			62307,9200		
Modelo	17	44970,0563	2645,2974		56665,8050	3333,2827	
Trichod.	1	6401,4613	6401,4613	<,0001	21973,0672	21973,0672	<,0001
Aval. (Trichod. 1306)	2	23220,7850	11610,39	<.0001	1500,5756	750,2878	0,0018
Aval. (Trichod. 1316)	2	2514,9950	1257,50	<.0001	3408,6272	1704,3136	<.0001
Aplicação	(2)	(2288,1608)	(1144,0804)	(<,0001)	(16569,9733)	(8284,9867)	<,0001
Trichod*Aplicação	(2)	(2342,8908)	(1171,4454)	(<,0001)	(9017,1078)	(4508,5539)	<,0001
Aval *Aplicação	(4)	(7320,0867)	(1830,0217)	(<,0001)	(1838,8592)	(459,7148)	0,0038
Trichod *Aval *Aplicação	(4)	(881,6767)	(220,4192)	(0,0004)	2357,5947	589,3987	0,0007
Apl. [Trichod 1306 (Aval 7)]	2	1413,7817	706,8908	<,0001	5042,6600	2521,3300	<,0001
Apl. [Trichod 1306 (Aval 14)]	2	2002,0267	1001,0133	<,0001	12047,6317	6023,8158	<,0001
Apl. [Trichod 1306 (Aval 21)]	2	993,3067	496,6533	<,0001	7922,3217	3961,1608	<,0001
Apl. [Trichod 1316 (Aval 7)]	2	8332,8267	4166,4133	<,0001	4770,9217	2385,4608	<,0001
Apl. [Trichod 1316 (Aval 14)]	2	90,8717	45,4358	0,2939	0,0000	0,0000	1,0000
Apl. [Trichod 1316 (Aval 21)]	2	0,0017	0,0008	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
Erro Experimental	54	1957,5525	36,2510		5642,115	104,48361	
C.V. (%)		7,2			13,5		

Controle de *Pythium sp.* em mudas de tabaco

Causa de Variação	Eficiência dos tratamentos no controle de <i>Pythium sp.</i>			
	GL	SQ	QM	Pr>F
Fatorial	10	21787,8215	2178,7822	0,0004
Repetição	2	2152,4030	1076,2015	0,0603
Efeito do Trichodermil	2	1755,0607	877,5304	0,0946
Efeito do Fungicida	(2)	(15541,0007)	(7770,5004)	(<,0001)
Trichoderma * Fungicida	(4)	(2339,3570)	(584,8393)	(0,1728)
Fungicida (sem Trichodermil)	2	7968,6867	3984,3433	0,0005
Fungicida (com Trichodermil 1306)	2	2193,3089	1096,6544	0,0577
Fungicida (com Trichodermil 1316)	2	7718,3622	3859,1811	0,0006
Erro Experimental	16	5119,2237	319,9515	
C.V.(%) = 36,2				

Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas

Causa da Variação	GL	Germinação			Massa seca de plântulas		
		SQ	QM	Pr>F	SQ	QM	Pr>F
Total	26	705,1852			0,0680		
Bloco	2	14,5185	7,2593	0,4058	0,0235	0,0118	0,1179
Efeito do Trichodermil	2	289,1852	144,5926	0,0066	0,0267	0,0133	0,0998
Repetição [Bloco (Efeito Trich)]	18	376,0000	20,8889	0,1292	0,0055	0,0003	0,9998
Erro Experimental	4	25,4815	6,3704		0,0123	0,0031	
C.V.(%)		2,9			73,9		

Características agrônômicas das mudas

Mudas Aptas				
Causa de Variação	GL	SQ	QM	Pr>F
Fatorial	10	5550,2222	555,0222	0,0003
Repetição	2	323,5556	161,7778	0,1764
Efeito do Trichodermil	2	259,5556	129,7778	0,2424
Efeito do Fungicida	(2)	(4312,8889)	(2156,4444)	(<,0001)
Trichoderma * Fungicida	(4)	(654,2222)	(163,5556)	(0,1483)
Fungicida (sem Trichodermil)	2	1930,6667	965,3333	0,0006
Fungicida (com Trichodermil 1306)	2	536,8889	268,4444	0,0659
Fungicida (com Trichodermil 1316)	2	2499,5556	1249,7778	0,0002
Fatorial vs controle	1	1555,2000	1555,2000	0,0004
Erro Experimental	18	1521,7778	84,5432	
C.V.(%) = 11,7				

Massa seca parte aérea				
Causa da Variação	GL	SQ	QM	Pr>F
Fatorial	10	0,3537	0,0354	0,0027
Repetição	2	0,0576	0,0288	0,0452
Efeito do Trichodermil	2	0,1338	0,0669	0,0024
Efeito do Fungicida	(2)	(0,1185)	(0,0593)	(0,0041)
Trichoderma * Fungicida	(4)	(0,0437)	(0,0109)	(0,2437)
Fungicida (sem Trichodermil)	2	0,0602	0,0301	0,0404
Fungicida (com Trichodermil 1306)	2	0,1006	0,0503	0,0077
Fungicida (com Trichodermil 1316)	2	0,0014	0,0007	0,9128
Fatorial vs controle	1	0,0345	0,0345	0,0499
Erro Experimental	18	0,1404	0,0078	
C.V.(%) = 9,0				

Massa seca do sistema radicular				
Causa de Variação	GL	SQ	QM	Pr>F
Fatorial	10	0,0512	0,0051	0,0135
Repetição	2	0,0011	0,0005	0,7146
Efeito do Trichodermil	2	0,0242	0,0121	0,0037
Efeito do Fungicida	(2)	(0,0248)	(0,0124)	(0,0034)
Trichoderma * Fungicida	(4)	(0,0012)	(0,0003)	(0,9359)
Fungicida (sem Trichodermil)	2	0,0096	0,0048	0,0699
Fungicida (com Trichodermil 1306)	2	0,0097	0,0049	0,0681
Fungicida (com Trichodermil 1316)	2	0,0066	0,0033	0,1488
Fatorial vs controle	1	0,0003	0,0003	0,6414
Erro Experimental	18	0,0280	0,0016	
C.V.(%) = 14,3				

Figuras

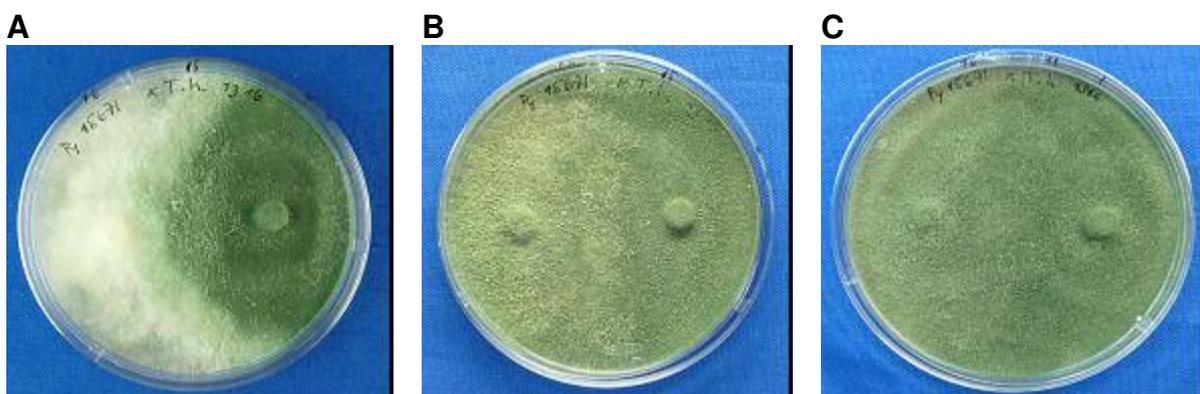


Figura 5. Inibição do desenvolvimento de *Pythium* isolado 15671(2) quando a cepa ESALQ 1316 de *T. harzianum* foi inoculada 48 horas após, aos (A) 7 dias, (B) 14 dias e (C) 21 dias de incubação a 23 °C. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

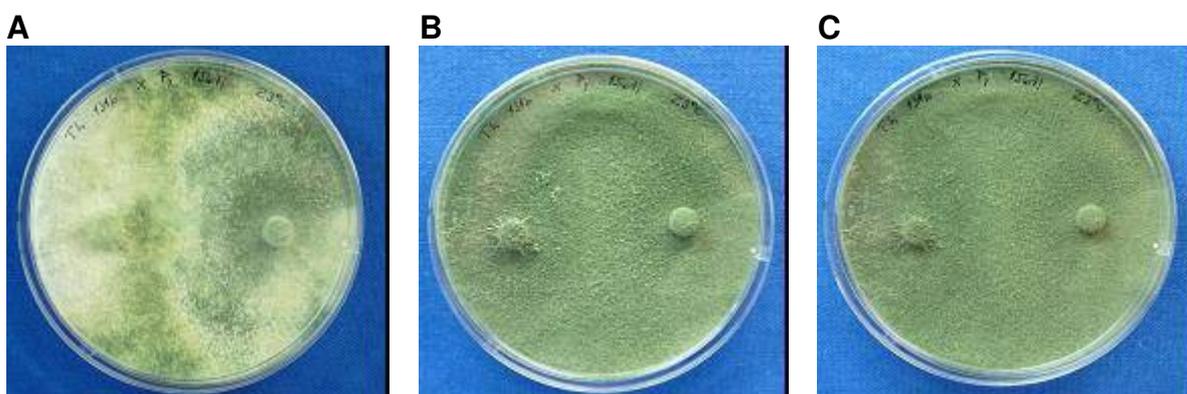


Figura 6. Inibição do desenvolvimento de *Pythium* isolado 15671(2) quando a cepa ESALQ 1316 de *T. harzianum* foi inoculada simultaneamente, aos (A) 7 dias, (B) 14 dias e (C) 21 dias de incubação a 23 °C. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

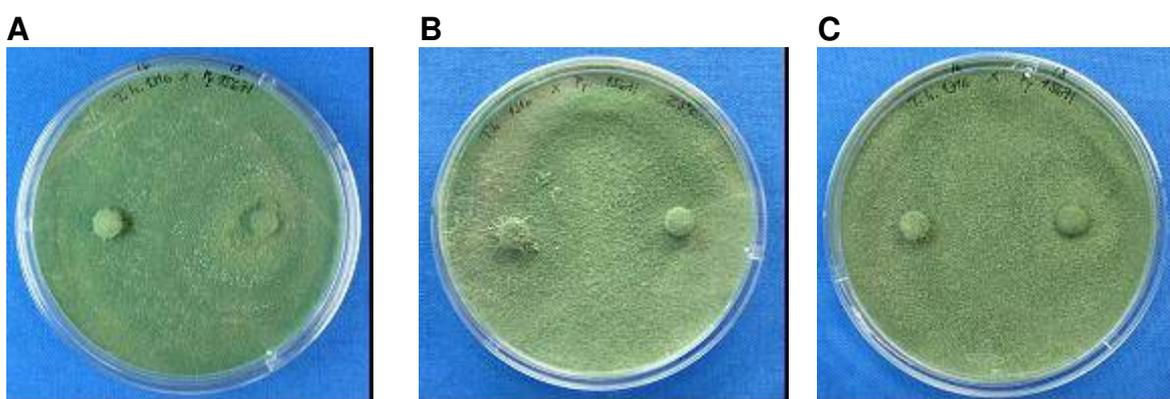


Figura 7. Inibição do desenvolvimento de *Pythium* isolado 15671(2) quando a cepa ESALQ 1316 de *T. harzianum* foi inoculada 48 horas antes, aos (A) 7 dias, (B) 14 dias e (C) 21 dias de incubação a 23 °C. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

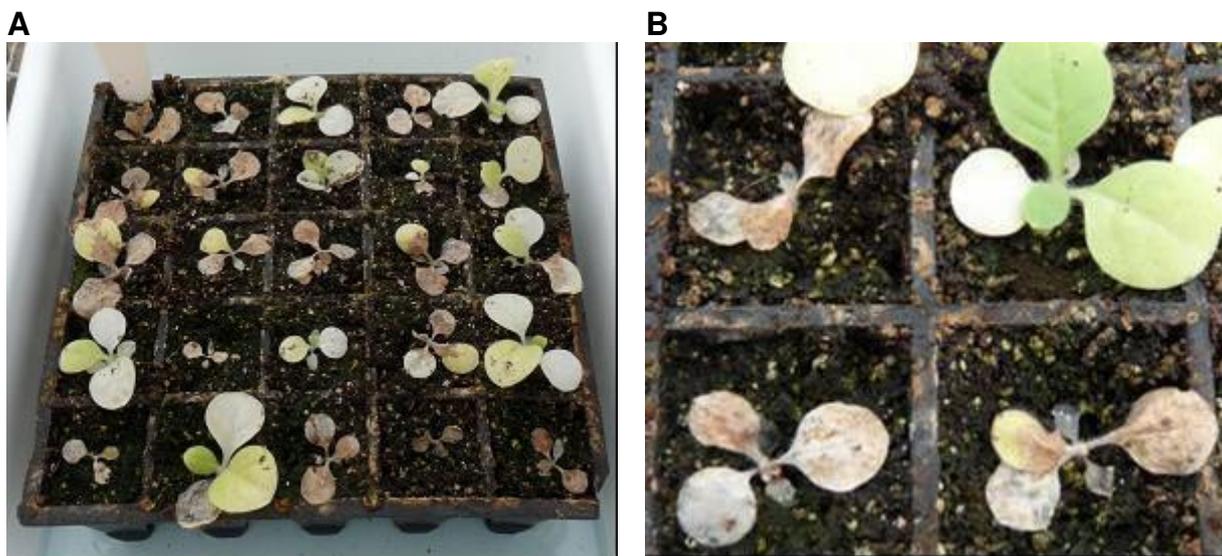


Figura 8. (A e B) Bandeja de mudas inoculadas com sintoma provocado por *Pythium* sp., três dias após a inoculação. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.

Gráfico

Temperatura (°C) e Umidade (%)

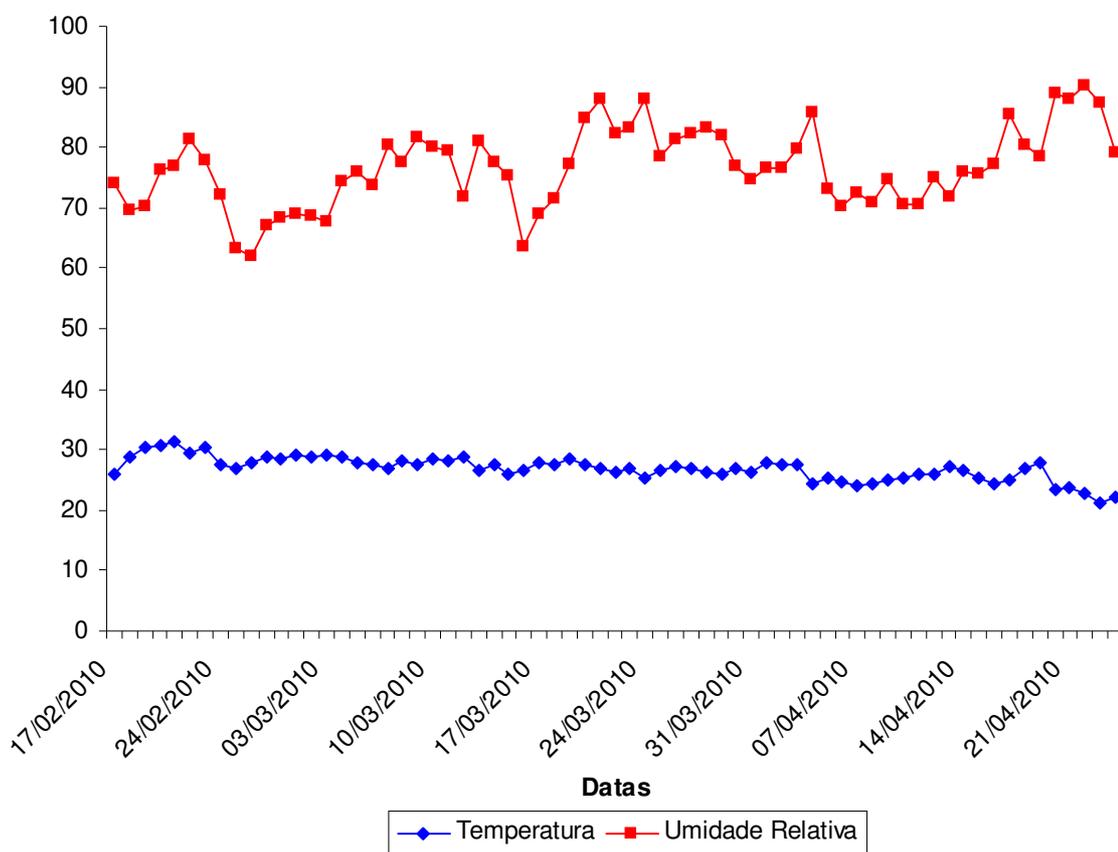


Gráfico 1. Temperatura (°C) e umidade (%) durante o experimento em casa de vegetação. Cachoeirinha – Rio Grande do Sul, 2010.