

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA ORGÂNICA –
PPGAO**

DISSERTAÇÃO

**Associação de Sementes Pré-Germinadas de Alface (*Lactuca sativa* L.) com
Trichoderma spp.**

Ivan Alcântara

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM AGRICULTURA ORGÂNICA**

**ASSOCIAÇÃO DE SEMENTES PRÉ-GERMINADAS DE ALFACE
(*Lactuca sativa* L.) COM *Trichoderma* spp.**

IVAN ALCÂNTARA

Sob a Orientação do Professor
Higino Marcos Lopes

e Co-orientação do Pesquisador
Otniel Freitas Silva
Maria do Carmo de Araújo Fernandes

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

635.52

A347a

T

Alcântara, Ivan, 1968-

Associação de sementes pré-germinadas de alface (*Lactuca sativa* L.) com *Trichoderma* spp. / Ivan Alcântara. - 2014.

49 f.: il.

Orientador: Higino Marcos Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica, 2014.

Bibliografia: f. 37-45.

1. Alface - Cultivo - Teses. 2. Alface - Semente - Doenças e pragas - Controle biológico - Teses. 3. *Trichoderma* - Teses. 4. Agricultura orgânica - Teses. I. Lopes, Higino Marcos, 1961- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA ORGÂNICA**

IVAN ALCÂNTARA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-graduação em Agricultura Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28 DE FEVEREIRO DE 2014.

Higino Marcos Lopes (Ph.D.) - UFRRJ
(Orientador)

José Antônio Azevedo Espindola (Dr.) - Embrapa CNPAB

Anelise Dias (Dra.) Embrapa CNPAB

DEDICATÓRIA

*Ao meu querido pai Levi Alcântara, a minha mãe
Matilde Moreira Alcântara, minha esposa
Neuma, minhas filhas queridas Lorena e Maria
Eduarda, minha irmãs Luciana, Vanine, Vana
e meus sobrinhos queridos Melissa, Levi e
Heitor.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir, que apesar de tantas dificuldades, eu tenha concluído mais esta etapa em minha vida.

Ao meu querido pai e grande incentivador Levi Alcântara (*in memoriam*) e a minha mãe Matilde Moreira Alcântara.

À minha esposa Neuma Ferreira F. Alcântara e minhas filhas Lorena e Maria Eduarda Ferreira Filgueiras Alcântara.

As minhas irmãs Vana, Vanine e principalmente Luciana Alcântara pelo apoio em todas as fases do curso.

Ao meu orientador prof. Higino Marcos Lopes pelo incentivo e espaço no laboratório de Tecnologia de Sementes da UFRRJ.

Ao meu Co-orientador, amigo e incentivador Dr. Otniel Freitas Silva.

A grande amiga e exímia profissional Elania Rodrigues Silva pelos treinamentos.

Aos amigos e amigas Dr. Pedro Paulo Dias, Antônio Amorim, Andressa Moreira, Dra. Alexandra Mamede e a querida Michelle S. Pereira.

A UFRRJ, a Embrapa CTAA e a Pesagro Rio.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Higino M. Lopes, Dra. Anelise Dias, Dr. José A. Espíndola, aos suplentes Dr. Augusto C. Vieira e Dra. Margarida Goréte F. do Carmo.

Ao amigo Marcelo Castilho de quem recebi as primeiras cepas de *Trichoderma* e também treinamento para preparo de inoculante para *R. solani*.

A diretoria da Fazendinha km 47 e os funcionários de campo, especialmente os Srs. Hélio Ribeiro dos santos, Aurélio, Elias (*in memoriam*), a estagiária Jaqueline e o prestador de serviço Ricardo André, pelas amostras de plantas infectadas e substratos para montagem dos experimentos.

Ao Dr. Fenelon Nascimento Neto e Roberto Pires Machado pelo apoio e carta de recomendação.

Ao secretário do PPGAO Renato Lima pelas informações e incentivo quando em face de meu afastamento por questões de saúde.

Ao colégio Técnico da UFRRJ (CTUR), em especial ao Dr. Hugo Hermsdorff das Neves, que prontamente me forneceu o espaço onde se montou os experimentos em casa de vegetação. Aos amigos Nelson, Nelsino, José Gervásio, seu Niltinho A. Sillis, Juarez, Kaleb, Sr. Celso, Edson S. Duarte (Horta).

Aos colegas da Embrapa em especial Dra. Edna, Dr. Eduardo Walter Miranda, a querida amiga Henriqueta Talita, Jorge Potxci, Rodrigo, Marco Antônio, Agnelli e sua esposa Sandra pelo apoio e informações, ao Alex Ribeiro, Patrícia Souza, Tatiane e aos demais colegas Pesquisadores, Técnicos e estagiários.

Aos colegas da Turma PPGAO em especial Viviane Lima, Brauly, Marco e Edson.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho chegasse ao fim.

BIOGRAFIA

Ivan Alcântara, nascido no mês de Setembro de 1968 em Seropédica, antigo distrito de Itaguaí, Rio de Janeiro é casado e pai de duas filhas. Concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Clodomiro Vasconcelos no ano de 1989 também em Itaguaí. Formou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Iguazu em 1993. Ingressou na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia em 1989 para atuar na área de microbiologia com ênfase em preparo de meios de cultura e produção de inoculantes para leguminosas fixadoras de nitrogênio. No ano de 2001, transferiu-se para a Embrapa Agroindústria de Alimentos em Guaratiba para atuar no laboratório de microbiologia de alimentos; atuou ainda como professor no Estado do Rio de Janeiro nesse mesmo ano. Entre os anos de 2004 e 2005 cursou Pós-Graduação *Lato sensu* em Docência do Ensino Superior. Atuou também como Docente no Curso de Ciências Biológicas na área de Botânica e Biossegurança entre os anos 2003 a 2010 pela Universidade Iguazu em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro. Em 2011 ingressou no Curso de Pós-graduação Mestrado Profissional em Agricultura Orgânica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Ainda na Embrapa-Agroindústria de Alimentos no ano de 2012 transferiu-se para o laboratório de OGM (Organismos Geneticamente Modificados) e Micologia onde está até a presente data.

RESUMO

ALCÂNTARA, Ivan. **Associação de sementes pré-germinadas de alface (*Lactuca sativa* L.) com *Trichoderma* spp.** 2014. 49p Dissertação (Mestrado Profissional em Agricultura Orgânica). Instituto de Agronomia, Programa de Pós-graduação em Agricultura Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade de Sementes, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia, da Embrapa Agroindústria de Alimentos e no Colégio Técnico da UFRRJ (CTUR). Os fungos associados a sementes podem causar um impacto negativo e positivo. No primeiro caso há uma relação de fitopatogenicidade onde o hospedeiro, no caso a semente, quando colonizado pelo patógeno (*Rhizoctonia solani*) pode reduzir a sua germinação e o vigor e o desenvolvimento inicial da plântula. No segundo caso, esta associação pode ser benéfica, principalmente nas fases iniciais de germinação e emergência de plântulas, onde fungos antagonistas como *Trichoderma*, tem o papel de proteção da semente e da plântula do ataque por fitopatógenos do solo. Em tecnologia de sementes, o condicionamento fisiológico das sementes aumenta o vigor e a uniformidade de germinação de sementes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do controle biológico de *R. solani* por *Trichoderma* spp, em casa-de-vegetação na fase de produção de mudas de alface. Este fitopatógeno foi aplicado ao substrato solarizado, previamente inoculado ou não com três formulados comerciais à base de *Trichoderma*, nomeadamente *Trichoderma asperellum* (A), *Trichoderma* spp. (B) e a mistura de *T. harzianum*, *T. viride* e *T. koningii* (C). Neste trabalho foram utilizadas sementes condicionadas e não condicionadas de alface orgânica cultivar “Grand Rapids”. Os resultados mostraram que após 28 dias da semeadura da alface, os formulados A e B mostraram maior eficiência no controle de *R. solani* causador de *damping off* em mudas de alface. Não houve diferença significativa entre sementes condicionadas e não condicionadas. Nessa perspectiva, aplicação do controle biológico por estes formulados no solo é uma alternativa viável, eficiente e não impactante ao meio ambiente.

Palavras-chave: *Trichoderma*, controle biológico, *damping off*.

ABSTRACT

ALCÂNTARA, Ivan. Association of pre-germinated lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds with *Trichoderma* spp. 2014. 49p. Dissertation (Organic Agriculture Graduate Course). Institute of Agronomy, Organic Agriculture Graduate Program at Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

This work was performed at Seed Quality Control Laboratory at Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Molecular Diagnostics and Mycology Laboratory at EMBRAPA Food Technology and Rural Technician School (CTUR). Fungi associated with seeds have a negative and positive impact. In the first case there is a plant pathogenicity relationship where seeds can lose their ability to germinate in soils infected with *Rhizoctonia solani*. In the second one the beneficial association can be obtained, especially in the earlier germination stages and seedling emergence, where an antagonistic fungus such as *Trichoderma* protects the seed from soil pathogens attack. The aim of this work was to evaluate the biological control of *R. solani* by *Trichoderma* spp in lettuce seedlings in greenhouse. The *R. solani* was applied inside previously solarized substrate with three commercial *Trichoderma* formulations, namely *Trichoderma asperellum* (A), *Trichoderma* spp (B) and a mix of *T. harzianum*, *T. viride* e *T. koningii* (C). In this work lettuce organic seeds cultivar 'Grand Rapid' primed or not were used. Results showed that after 28 days from sowing the formulated A and B presented greater efficiency in controlling *R. solani*. There was no significant difference between conditioned seeds or not. In this way the perspective of use those formulated products for biological control are viable, presenting efficacy and environmental safety in *R. solani* control.

Keywords: *Trichoderma*, biological control, *damping-off*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Amostras de sementes de alface variedade “Grand Rapids” condicionadas entre 2, 3, 4 e 5 folhas de papel para a determinação da curva de hidratação.....	25
Figura 2. Bandejas tipo marmitex com substrato inoculado com <i>Trichoderma</i> spp. e <i>R. solani</i>	26
Figura 3. Plântulas de alface após apresentarem sinais de tombamento na fase de muda sob plantio em bandejas de isopor.....	27
Figura 4. Fragmentos dos tecidos vegetais de plântulas de alface infectadas por <i>R. solani</i> ...	27
Figura 5. Fragmentos dos tecidos vegetais de plântulas de alface infectadas por <i>R. solani</i> em pedaços de 0,5 cm.....	28
Figura 6. Fragmentos de planta de alface contaminada dispostas sobre meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) com <i>R. solani</i>	28
Figura 7. Crescimento micelial de <i>R. solani</i> , em placa de petri contendo meio Batata Dextrose Agar.....	28
Figura 8. Substrato a base de arroz umedecido com água destilada 70% (p/v) acondicionado em sacos de polietileno de 20,0 x 25,0 cm para colonização de <i>R. solani</i>	29
Figura 9. Hidratação de sementes de alface cv. “Grand Rapids” entre 2, 3, 4 e 5 folhas de papel germitest embebidas em 16,5 ml de água destilada mantidas a 20 °C por até 30 horas.....	30
Figura 10. Plântulas de alface variedade “Grand Rapids” aos 21 dias em substrato (controle) mantidas em casa de vegetação. Seropédica, 2013.....	31
Figura 11. Plântulas de alface variedade “Grand Rapids” aos 21 dias em substrato solarizado inoculado com <i>R. solani</i> mantida em casa de vegetação. Seropédica, 2013.....	31
Figura 12. Plântulas de alface variedade “Grand Rapids” aos 21 dias em substrato solarizado inoculado com o fitopatógeno <i>R. solani</i> e antagonista A (<i>Trichoderma asperellum</i>) mantida em casa de vegetação.....	31
Figura 13. Plântulas de alface variedade “Grand Rapids” aos 21 dias em substrato solarizado inoculado com <i>R. solani</i> e antagonista B (<i>Trichoderma</i> spp) mantida em casa de vegetação.....	32
Figura 14. Plântulas de alface variedade “Grand Rapids” aos 21 dias em substrato solarizado inoculado com <i>R. solani</i> e antagonista C (<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>T. viride</i> e <i>T. koningii</i>) mantida em casa de vegetação.....	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Meio de cultura BDA para crescimento de <i>R. solani</i>	27
Tabela 2. Percentual de emergência de plântulas de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) oriundas de sementes sadias nos tratamentos controle, inoculadas com <i>R. solani</i> , e inoculadas com <i>Trichoderma</i> A, B e C e <i>R. solani</i> em sementes condicionada e semente não condicionada	33
Tabela 3. Percentual de plântulas infectadas com <i>R. solani</i> . em sementes não condicionadas e condicionadas.....	33
Tabela 3.1. Percentual de emergência de plântulas de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) infectada nos tratamentos controle, inoculadas com <i>R. solani</i> , e inoculadas com <i>Trichoderma</i> A, B e C e <i>R. solani</i> para semente condicionada e não condicionada.....	34
Tabela 4. Percentual de tombamento de plântulas de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) nos tratamentos controle, inoculados com <i>R. solani</i> , inoculados com e <i>Trichoderma</i> A, B e C e <i>R. solani</i>	35
Tabela 5. Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) nos tratamentos com substrato, substrato e <i>R. solani</i> , substrato e <i>Trichoderma</i> A, B e C e <i>R. solani</i>	36
Tabela 2A. Análise de variância dos resultados obtidos do percentual de emergência de plântulas de alfaces (<i>Lactuca sativa</i> L.) sadias cultivar “Grand Rapids”. Seropédica, 2013.....	48
Tabela 3A. Análise de variância dos resultados obtidos da porcentagem de sementes infectadas em função dos tratamentos aplicados em sementes.....	48
Tabela 4A. Análise de variância do percentual de tombamento de plântulas de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) cultivar “Grand Rapids”. Seropedica, 2013.....	48
Tabela 5A. Análise de variância dos resultados obtidos da média de massa seca por parcela nos tratamentos aplicados em plântulas de alface cultivar “Grand Rapids”. Seropédica, 2013.....	49

ANEXO

Anexo 1. Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, minerais, vitaminas e colesterol (apresenta dados de composição centesimal da alface) Fonte: Tabela Taco, Unicamp, (2011).....	47
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	03
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1. Agricultura Orgânica.....	14
2.2. Importância da alface.....	14
2.2.1. Características botânicas.....	14
2.3. Manejo conservatório de doenças em cultivos orgânicos.....	14
2.4. Gênero <i>Rhizoctonia</i>	15
2.4.1. Doenças causadas por <i>R. solani</i> no cultivo da Alface.....	15
2.4.2. Métodos de manejo do tombamento de mudas.....	16
2.5. Substrato solarizado.....	16
2.6. Utilização de agentes de biocontrole em sementes.....	17
2.6.1. <i>Trichodermas</i>	17
2.7. Técnicas de hidratação controlada e condicionamento fisiológico em sementes.....	19
2.7.1. Hidratação controlada por meio de matricionamento.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Caracterização inicial do lote de sementes de alface.....	23
4.2. Teste de germinação.....	23
4.3. Determinação do teor de água.....	23
4.4. Determinação da curva de hidratação e condicionamento de sementes de alface...	24
4.5. Ação do biocontrole do <i>Trichoderma</i> em relação à <i>R. solani</i> em casa de vegetação	25
4.6. Preparo do substrato.....	25
4.7. Isolados de <i>R. solani</i>	28
4.8. Delineamento experimental.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1. Curva de hidratação.....	29
5.2. Efeitos dos Tratamentos com formulados a base de <i>Trichoderma</i>	29
6. CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS.....	37
8. ANEXOS.....	46

1. INTRODUÇÃO

A atual perspectiva para agricultura orgânica é de crescimento em ritmo mais acelerado e estima-se que exista cerca de 18 milhões de hectares plantados em mais de 135 países, onde aproximadamente 24% estão os países latinos. Nessa perspectiva, o Brasil já se mostra como um dos grandes produtores e consumidores de produtos de origem orgânica, o que fortalece cada vez mais a agricultura familiar em pequenas propriedades rurais. A agricultura orgânica permite promover melhorias na qualidade de vida e envolve a proibição do uso de agrotóxicos, adubos químicos ou substâncias sintéticas que possam contaminar o meio ambiente. Ao mesmo tempo, o uso responsável do solo, da água, do ar e dos demais recursos naturais preservando o respeito com as relações sociais e culturais completa os requisitos básicos da Agroecologia.

A alface é a hortaliça mais consumida pela população brasileira e tem sido cada vez mais produzida na agricultura orgânica. Entretanto, uma das fases de cultivo desta hortaliça, que necessita de ajustes é o manejo das sementes e mudas. A boa qualidade fisiológica e sanitária das sementes tem um papel importante na produção de mudas sadias e vigorosas. As sementes estão entre as principais fontes de contaminação e de disseminação de doenças. Mesmo em níveis baixos, essas sementes causam danos representativos na cultura, ocasionando perdas de boa parte da produção. (MENTEN, 2006) No caso da agricultura orgânica, por não permitir o uso de defensivos químicos protetores, o controle de doenças levadas pelas sementes e presentes no solo é ainda mais difícil, exigindo maior atenção na semeadura e na origem das sementes, pois estas podem trazer inóculos patogênicos para o solo. Portanto, a realização de pesquisas nesta área reveste-se de importância, uma vez que as sementes são indispensáveis no início do cultivo de produção de alface e as mesmas estão sujeitas a falhas de germinação e ao ataque de fungos fitopatogênicos antes e após a germinação. Uma vez que as sementes podem ser utilizadas como veículos carreadores de microrganismos benéficos como *Trichoderma* spp. e podem ser previamente embebidas e condicionadas fisiologicamente antes da semeadura, justifica-se a investigação da associação desta técnica ao uso de microrganismos antagonistas, que por hipótese deverão contribuir para melhorar o desempenho na germinação e desenvolvimento das plantas uma vez que *Trichodermas* também atuam como promotores de crescimento. A execução deste trabalho foi possível com o apoio da UFRRJ, PESAGRO-Rio e Embrapa Agrobiologia e Embrapa-Agroindústria de Alimentos, por meio da participação de professores, pesquisadores técnicos e do estudante de mestrado e da infraestrutura destas instituições, direcionadas para a geração de conhecimentos técnicos e sociais aplicadas na agricultura orgânica e autossustentável, atendendo a legislação vigente e gerando conhecimentos técnicos que poderão ser utilizados principalmente para a agricultura familiar e orgânica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Agricultura Orgânica

O termo agricultura orgânica faz parte do conceito mais abrangente de agricultura alternativa, o qual envolve outras correntes como: agricultura natural, agricultura biodinâmica, agricultura biológica, agricultura ecológica e permacultura. Todas essas correntes buscam promover qualidade de vida com proteção ao meio ambiente sem o uso de agrotóxicos, adubos químicos ou substâncias sintéticas que modificam o meio ambiente através do uso responsável do solo, da água, do ar e dos demais recursos naturais, respeitando as relações sociais e culturais. Através principalmente de processos de reciclagem dos recursos naturais presentes na propriedade agrícola, transformação de resíduos vegetais em húmus no solo, uso de biofertilizantes, rotação e consorciação de culturas, adubação verde e o controle biológico de pragas e fitopatógenos, Santos et al (2013).

2.2. Importância da alface

A alface é uma hortaliça popular, e juntamente com o tomate, é a hortaliça preferida para o preparo de saladas, devido ao seu sabor agradável, refrescante e de fácil preparo. Os centros de origem desta hortaliça são a Europa e a Ásia, sendo cultivada em várias partes do mundo Ohse et al (2001).

No Brasil, o cultivo da alface é realizado durante o ano todo em diferentes regiões, porém a escolha da melhor variedade dependerá, no entanto do período a ser plantada e da região, assim como das condições climáticas.

O valor energético da alface é baixo e o seu conteúdo em água representa 96% do seu peso conforme Anexo 1. Ela constitui uma importante fonte de vitaminas, especialmente vitamina A e sais minerais, principalmente cálcio, fósforo e ferro, sendo que este último desempenha um importante papel no transporte de oxigênio no organismo, Silva et al (2006).

2.2.1. Características botânicas

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família Asteracea, e a estrutura usada como semente é um fruto simples seco indeiscente, chamado aquênio, que contém uma semente aderida no pericarpo num único ponto na região do funículo Maggi (2006). Os aquênios da alface se apresentam pontiagudos, de formato oval, elíptico ou espatulado com estrias longitudinais na superfície e comprimento variável de dois a cinco milímetros. Dependendo do cultivo e do ano de produção, o número de sementes pode variar assim como sua cor e o vigor, (VILLELA et al 2010).

2.3. Manejo conservatório de doenças em cultivos orgânicos

Em uma abordagem mais ampla, podemos afirmar que diversas formas de conservação podem ser empregadas na agricultura orgânica visando o bom desempenho ao combate de pragas e doenças causadas por insetos e fitopatógenos, entretanto algumas se mostram mais eficazes como o uso de alguns microrganismos para controle biológicos usados com bastante eficácia pode citar o uso de *Trichoderma*, além do uso de palhadas, plantas com poder alelopático, o plantio em épocas adequadas, o uso de coberturas mortas. O importante é levar em consideração principalmente o princípio da prevenção e a capacidade técnica de entendimento e as condições sócio econômicas do agricultor. Como exemplos temos o *Baculovirus anticarsia*, que após ser ingerido pelas lagartas, faz com que estas parem de se alimentar em cerca de 4 a 7 dias e morram entre 7 e 10 dias (MOSCARDI, 1998). *Bacillus thuringiensis* para controle de *Plutella xylostella* e *Ascia monuste orseis* em crucíferas, o

controle de traça com *Trichogramma pretiosum* em tomateiro, *Trichoderma* spp em tombamento em alface.

2.4. Gênero *Rhizoctonia*

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito pela primeira vez pelo micologista francês De Candolle, em 1815, como sendo um fungo não esporulante que coloniza, preferencialmente, raízes e que produz filamentos de hifas a partir de escleródios (TENÓRIO, 2011). Este fungo é classificado como fungo mitospórico, pertencente à classe Agonomycetes, a ordem Agonomycetales e a família Agonomycetaceae (CASTRO 2007). Os isolados multinucleados apresentam células com mais de três núcleos e hifas com cerca de 6-10 µm de diâmetro. Neste grupo enquadram-se as espécies como *R. solani* Kühn, *Thanatephorus* spp., *R. oryza* e *R. zea* Voorhees, que apresentam ambos o teleomorfo *Waitea circinata* Warcup & Talbot. O micélio é caracterizado pela ramificação em ângulo reto com septação imediatamente e após o ramo, constrição na base da ramificação e septo doliporo. Já na sua fase sexuada este fungo é classificado como Telemorfo de *R. solani*, classificado no reino Fungi, filo Basidiomycota, ordem Ceratobasidiales e família Ceratobasidiaceae (NAKATANI, 2006). As espécies pertencentes a este gênero distinguindo-se em binucleadas ou multinucleadas são classificadas em grupos de anastomoses com base na frequência de fusão das hifas. A classificação em grupos de anastomose se relaciona à diversidade genética e a certa especialização com relação à patogenicidade a diferentes espécies vegetais, que é importante para o desenvolvimento de estratégias de controle (OGOSHI, 1987). Conforme Dias et al (2007), a patogênese se dá após a penetração dos tecidos em função da produção de enzimas pectinolíticas, ácido oxálico e toxinas.

A *R. solani* sobrevive saprofiticamente no solo, infectando plantas nativas, ou em estado de dormência, como micélio e estruturas especializadas de resistência chamadas escleródios. Esses propágulos são detectados no solo com relativa facilidade, no entanto é difícil sua quantificação. Geralmente, encontram-se nas camadas superficiais do perfil do solo, principalmente nos primeiros 10 cm, devido à dependência de oxigênio (CASTRO, 2007; *apud* CARDOSO, 1994). Os sintomas apresentados pela espécie de *R. solani* variam extensamente e são confundidos facilmente com os sintomas de outras doenças produzidas por outros patógenos a exemplo da *Sclerotinia sclerotiorum*. Um fitopatógeno habitantes do solo, causador de podridão do caule na planta, apresentando, como sintoma reflexo, amarelecimento e seca na parte externa das folhas (CHARCHAR et al., 1999).

2.4.1. Doenças causadas por *R. solani* no cultivo de alface.

Os patógenos do solo são os principais causadores de perda de qualidade das mudas, sendo responsáveis pelo tombamento, ou *damping off*, que causam danos na fase inicial de plântulas, atacando o hipocótilo, sementes e raízes, promovendo o escurecimento e amolecimento do talo da planta, muitas vezes resultando em constrição dos tecidos, ocasionando o tombamento (LOPES et al, 2005). A *R. solani* causa doenças em diferentes plantas cultivadas, entre elas a alface, onde diferem quanto à patogenicidade, aos hospedeiros (BOTELHO et al., 2011).

Segundo Bedendo, *damping-off* é um grupo de doença que incide em tecidos vegetais jovens, em sementes recém semeadas que apodrecem, devido à ação de patógenos presentes no solo ou veiculados na semente, ocorrendo antes da germinação e após a hidratação da semente, reduzindo a população inicial de plantas no viveiro de mudas ou no campo, sendo popularmente chamado de tombamento onde os principais causadores são fitopatogênicos, como, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp.. Os principais sintomas de tombamento são observados na região do colo nas plântulas, rente

ao solo, com o aparecimento de manchas encharcadas que com o tempo vão evoluindo para lesões profundas, culminando com a constrição do caule, que por estar enfraquecido, tende a tombar. Dentre estes, a *R. solani* é um dos fitopatógenos que causam os maiores prejuízos à agricultura, danificando indiscriminadamente várias espécies de plantas cultivadas (DIAS 2011).

2.4.2. Métodos de manejo do tombamento de mudas

O controle do tombamento de mudas deve ser iniciado antes do plantio através de sementes de boa qualidade, que para a agricultura orgânica pode ser considerado ponto crítico uma vez que o uso de agrotóxicos de proteção das sementes não é permitido. Para a produção de mudas em bandejas, deve se usar preferencialmente substrato comercial esterilizado ou solarizado. Para se prevenir contaminações das mudas a partir de bandejas previamente usadas, recomenda-se a imersão dessas bandejas em uma solução contendo *Trichoderma* uma vez que o uso de produtos químicos para desinfestação podem não ser aceitos para agricultura orgânica.

A semeadura deve ser feita na profundidade adequada para cada espécie de hortaliça, pois sementes semeadas muito profundamente estão mais sujeitas ao apodrecimento antes da emergência. É importante que as bandejas já semeadas sejam colocadas sobre uma bancada feita de bambu que facilmente se encontra em propriedades rurais ou estrado de arame grosso para que seu fundo fique livre, facilitando o escoamento do excesso de água de irrigação.

2.5. Substrato solarizado

A técnica de solarização foi primeiramente desenvolvida em Israel nos anos 70 para a desinfestação de solos e substratos antes do plantio, onde o solo úmido é recoberto com uma cobertura plástica, normalmente de policloreto de vinila, permitindo que a temperatura seja aumentada durante o período do ano de maior radiação solar, reduzindo significativamente a população de patógenos do solo (BARROS et al 2004; apud KATAN et al., 1976). Após esta descoberta, substratos solarizados vêm sendo largamente utilizados na produção de viveiros abertos e em casa de vegetação, pois têm se mostrado como uma alternativa viável aos métodos químicos para desinfestação do solo no controle de fitopatógenos e plantas espontâneas. É uma técnica que tem sido muito bem explorada especialmente para o cultivo de hortaliças e plantas ornamentais. Os microrganismos saprófitas do solo, entre eles inúmeros antagonistas como o *Trichoderma*, são mais tolerantes a temperaturas elevadas que chegam a atingir 70°C durante o processo de solarização aumentando desta forma a ação desses microrganismos sobre os fitopatógenos (GHINI et al., 2003; apud LIFSHITZ et al 1983). O efeito da solarização no solo é similar ao efeito estufa, propicia um aumento considerado de temperatura levando a inativação de fitopatógenos causadores de doenças em plantas (CRUZ et al 2013).

De acordo com Ghini et al., (2003) os efeitos da solarização do solo promovem a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, além de atuar na redução da atividade microbiana do solo pela solarização, onde foi demonstrado que a solarização do solo induziu a supressividade à *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. Diferentes estudos realizados no Brasil demonstram que a solarização tem se mostrado eficiente para o controle de vários fungos fitopatogênicos veiculados pelo solo, tais como *Pythium* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotium cepivorum* Berk, *Verticillium dahliae* Kleb, *Sclerotinia minor* Jagger e *R. solani* Kühn, nas culturas de crisântemo (*Chrysanthemum* spp), alho (*Allium sativum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.), respectivamente, Patrício et al. (2007). De acordo com Bettiol et al. (1994) a solarização promoveu um aumento de temperatura do solo, a 10 cm de profundidade, em torno de 10 °C,

enquanto que a 20 cm, o aumento foi de aproximadamente 5°C, sendo possíveis essas temperaturas sub-letais causar danos a estruturas dos patógenos tornando-as mais sensíveis aos ataques de fungos antagonistas, além de controlar a população de plantas invasoras. Além do controle de fungos fitopatogênicos o uso desse método tem se mostrado eficiente no controle de fitonematóides por efeitos diretos, causados pelas altas temperaturas, e indiretos, favorecendo o controle biológico e, conseqüentemente, a supressividade do solo (SOUZA, 2004).

2.6. Utilização de agentes de biocontrole em sementes

O termo microbiolização foi sugerido para incluir a aplicação de fungos e bactérias à semente ou a outra estrutura de plantas (LUZ, 1993). A microbiolização é um método de tratamento de sementes utilizado para introduzir um agente de biocontrole de grande potencial no sistema solo-vegetal (CHAO et al. 1986). Portanto cada vez mais produtos biológicos estão sendo utilizados com graus de eficiência elevados (MATRIN et al., 2007). Esses formulados quando aplicados a sementes, multiplicam-se no solo colonizando a espermosfera e a rizosfera. Tais formulados são capazes de produzirem enzimas, que degradam a parede celular de fitopatógenos (RUBIO, 2012; NARCISO, 2010; VAZ, (2010); MARTELLETO, 2005). Dentre os sistemas de microbiolização utilizados destaca-se a peletização.

A peletização é um tratamento feito na semente, que possibilita uma cobertura sólida e seca de material inerte, cuja função é melhorar o comportamento fisiológico da semente. Entre eles vários agentes de biocontrole de doenças incluem pós-molháveis, *pellets* de alginato, grãos de amido, além de diversos substratos em que os agentes de biocontrole são crescidos antes de serem adicionados ao campo como farelo de trigo, sabugo de milho triturado, arroz quebrado, aveia, grãos de sorgo e de cevada, casca de arroz, pó de casca de coco entre outros resíduos da agroindústria (OLIVEIRA et al., 2001; da SILVA e NAKAGAWA 1998).

2.6.1 *Trichodermas*

Trichoderma são considerados fungo mitosporico, pertencentes à subdivisão Deuteromycotina, *Trichoderma* é um gênero de fungo que apresenta em sua estrutura esporos e clamidósporos, e é usada como agentes de controle biológico, devido à sua capacidade de suprimir doenças causadas por fungos patogênicos. Sua fisiologia produz antibióticos, enzimas hidrolíticas e são capazes de interagirem com as plantas induzindo-as a resistência a estresses bióticos e abióticos, bem como promover o crescimento das plantas através da produção de fitormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação de nitrogênio ou solubilização de fósforo (RUBIO et al, 2012).

Várias espécies de *Trichoderma* spp, têm sido usadas para controlar o tombamento de plântulas e podridões radiculares por *R. solani* em várias espécies vegetais como no caso da alface (LUCON, 2009). Os *Trichodermas* são considerados saprófitas potentes e eficientes por atuarem como antagonistas de alguns fitopatógenos de importância econômica, e também por promoverem o crescimento de plantas (BISSET, 1991), e possuem muitas espécies que são geneticamente distintas. O crescimento rápido desse fungo em culturas, a produção de um micélio aéreo esparso com pústulas conidiogênicas brancas ou verdes, o tipo de ramificação dos conidióforos e o modo de disposição das fialídes são características utilizadas para distinguir as espécies desse gênero, que promovem o crescimento, o desenvolvimento e aumento da produtividade das plantas, além de contribuir com o enriquecimento do solo (BRAÚMA, 2011; BISSET, 1991).

Outra importante característica dos *Trichodermas* é sua capacidade de reprodução *in vitro*, possibilitando e facilitando seu estudo e o desenvolvimento de novas tecnologias, já que

sua facilidade em colonizar a rizosfera permite melhor desempenho funcional da planta possibilitando maior disponibilidade e aproveitamento de nutrientes (AGUIAR, 2013).

Guimarães (2008) ressalta que quando ocorrem atividades de bioprospecção de agentes microbianos com potencial antagonístico a um determinado fitopatógeno, os mecanismos de antagonismos mais importantes são o parasitismo, a antibiose e a competição. Neste contexto, Silva et al., (2008) evidenciam o uso e o potencial do antagonismo por *Trichoderma spp.* Estes fungos possuem a capacidade de: i) produzir antibióticos, como a gliotoxina, a viridina, a trichodermina, a suzucacilina, a alameticina e a dermadina; ii) inibir o desenvolvimento de outros fungos por competição e iii) produzir enzimas, como celulase e hemicelulase, as quais degradam materiais lignocelulolíticos e causam lise na parede de células de diversos fungos patogênicos.

Para o estabelecimento de condições que favoreçam a estabilidade de *Trichoderma spp.* em formulações comerciais e no campo. Narciso (2010) estudou fatores como idade do esporo e concentração do inóculo, em função do tipo de solo do pH, da temperatura, da umidade, da técnica de incorporação dos esporos junto às sementes e do vigor das sementes.

Conforme Brito (2009), fungos *Trichoderma spp.* também cumprem uma função específica na regeneração natural da planta, atuando no sentido de preservar a sanidade das sementes durante sua vida no solo, e constituindo uma relação de mutualismo. O uso de *Trichoderma* também foi descrito por Lynck (1992) como agente biológico na agricultura, estimulando o crescimento de plantas, visto que proporcionou aumento de 54 a 100% na produção de alface, quando incorporado ao composto utilizado na adubação. Harman (2006) relatou que em plantas jovens de milho, os pêlos radiculares são colonizados por hifas de *T. harzianum* que se estabelecem nas raízes, crescendo junto com o sistema radicular e permanecendo funcional durante todo o ciclo da cultura anual.

Dentre os diversos microrganismos patogênicos de solo que são sensíveis ao *Trichoderma* estão *R. solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium spp.* e *Pythium spp.* (MELO, 1998). Para Sudo-Martelleto (2005), o uso do *Trichoderma spp.* na agricultura é uma alternativa viável e sustentável, desde que ocorra o manejo adequado da cultura e do solo, no sistemas agroecológicos e de produção orgânica. pois restabelece o equilíbrio microbiano do ambiente e a diversidade biológica, preenchendo vários requisitos não atendidos pelos agroquímicos.

Estão disponíveis no mercado diversos bioprodutos a base de *Trichoderma spp.* para diversos microrganismos que atacam plantas, entre eles a *R. solani*. Os mecanismos de antagonismo são parasitismo, antibiose e competição, atuando na promoção direta de crescimento das plantas e na restauração da comunidade microbiana e na reestruturação de solos desabilitados por práticas agrícolas intensivas.

Esses antagonistas liberam metabólitos secundários, que estimulam o crescimento das plantas. A concentração de 5×10^8 esporos deve ser diluída em água e aplicada nas áreas para controle prévio ou mesmo em áreas infestadas. Entre as formulações encontradas no mercado incluem: pó-molháveis; grânulos dispersíveis; suspensão concentrada; óleo emulsionável; grãos colonizados e esporos secos. *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma stromaticum* e *Trichoderma viride* são as principais espécies do gênero de biocontrole comercializadas. Porém, alguns produtos não há identificação das espécies, (BETTIOL, 2009). Lewis & Lumsden (2001) observaram que o controle do tombamento de plântulas de pepino, causado por *R. solani* variou de acordo com a dose empregada dos antagonistas, e que a maior percentagem de redução no tombamento de plantas de pepino foi obtida com a aplicação de 0,5 e 1% (v:v). Fravel & Lewis (2004) observaram a redução da sobrevivência e da atividade saprofítica de *R. solani*, quando isolados de *T. hamatum* e *T. virens* foram incorporados em doses superiores a 1,5% (v:v). Segundo Hyakumachi (1996), o

declínio na viabilidade de *R. solani* encontra-se associado às mudanças quantitativas e qualitativas nos propágulos do patógeno. Qualitativamente, pela perda da patogenicidade ou da habilidade de produzir propágulos viáveis e, quantitativamente, pela redução direta dos níveis da população do patógeno, causado por mecanismos de antibiose e parasitismo.

A inoculação do *Trichoderma* pode ser feita de diferentes formas; misturando antes do plantio ao substrato, incorporando-o ao solo quando o plantio for em canteiros, pulverizando ou através de rega durante o preparo da área a ser plantada, pode ainda ser feita à tarde ou pela manhã dependendo do grau de umidade relativa do ar, já em cultivo protegido os cuidados são menores, pois a incidência de raios solares é menor, Pomella & Ribeiro (2009).

Hoje no mercado mundial existem aproximadamente 135 produtos para controle biológico de diferentes fitopatógenos. Entre esses produtos estão as formulações à base de *Trichoderma* spp., *T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. atriviride*, *T. Koningii*, *T. viridae*, *T. lignorum*, *T. atroviride*, *T. parceanamosum*, *T. stromaticum*, conforme citado por Bettiol (2012).

No Brasil, a falta de bioformulados à base de *Trichoderma*, regularizados pelo MAPA, tem dificultado sua utilização na agricultura, já que, as empresas fabricantes são submetidas aos mesmos critérios que regulamentam o registro de agrotóxicos, tratando-se de um processo oneroso e realizado em um longo período de tempo (MELO E COSTA, 2005).

De acordo com Machado et al (2012) em 2007, no Brasil, cerca de 550 toneladas de produtos à base de *Trichoderma* foram utilizadas, equivalendo a uma área tratada de 600.000 ha de lavoura. Essa informação reforça a importância do aumento de pesquisas sobre essa temática. Destaca-se que mesmo o *Trichoderma* não estando regulamentado definitivamente na legislação, sua eficiência deve ser considerada. Segundo Lopes (2009), quase não há produto à base de *Trichoderma* spp. está registrado no Brasil para o controle de *Fusarium solani* e *R. solani* na cultura do feijão, mas existe no mercado um grande número de produtos que não possuem registro junto ao MAPA, porém são utilizados no tratamento de substrato e de sementes e pulverização na parte aérea das plantas. Os produtos são encontrados nas formulações como pó molhável (PM), grânulos dispersíveis em água (WG) e líquidas (esporos em suspensão oleosa e aquosa) (Pomella e Ribeiro, 2009). *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. viride* são as principais espécies do agente de biocontrole comercializadas, entretanto, em alguns produtos comercializados não há identificação das espécies (MORANDI e BETTIOL, 2009).”

É importante observar nesses casos onde são utilizados produtos formulados a base de produtos biológicos a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 que dispõe sobre outros a utilização e descarte final desse tipo de produto.

2.7. Técnicas de hidratação controlada e condicionamento fisiológico em sementes

Tratando-se de condicionamento fisiológico, a temperatura, tem grande influência na germinação de sementes de alface. A temperatura ótima está em torno de 20°C, a maioria das cultivares não germina em temperaturas superiores a 30°C, Nascimento e Pereira, (2007). Quando condições de altas temperaturas ocorrem durante a embebição das sementes de alface, dois diferentes fenômenos podem ser observados, a termoinibição, que é um processo reversível, uma vez que a germinação ocorre quando a temperatura reduz para um nível adequado e a termodormência, onde as sementes não germinarão após a redução da temperatura, também chamada de dormência secundária, (NASCIMENTO e CANTLIFFE, 2002 apud KHAN, 1980/81). Neste caso, a germinação ocorrerá se as sementes forem tratadas com reguladores de crescimento ou submetidas ao condicionamento osmótico "*seed priming*". Segundo Alencar et al. (2012) (Apud NASCIMENTO, 1988), a técnica de priming apresenta diversos fatores que podem determinar o seu sucesso, entre eles, o tipo de condicionamento

osmótico, o potencial osmótico, a temperatura, a profundidade da imersão da semente, da aeração, da iluminação, da lavagem e da secagem de sementes.

O condicionamento osmótico possibilita o desdobramento de reservas da semente e a síntese de metabólitos necessários à germinação, permitindo que ocorra uma germinação mais rápida. Nestas condições há uma diminuição de seu tempo de exposição às condições desfavoráveis, tais como ataques por microrganismos e deficiência hídrica, possibilitando a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas, (PATANÈ et al., (2009). OLIVEIRA et al. (2007), MARCOS FILHO (2005), HÖLBIG (2011)) postula que além do condicionamento osmótico, o desempenho da semente pode ser maximizado através de tratamentos físicos, químicos, fisiológicos, cobertura e peletização da semente.

2.7.1. Hidratação controlada por meio de matricionamento

Diversos tipos de tratamento pré-semeadura têm sido sugeridos para beneficiar a germinação e a emergência de plântulas com redução no período de tempo. Dentre eles, o condicionamento fisiológico que envolve a absorção de água pela semente, sob condições controladas, incentivando o metabolismo das sementes durante as fases I e II da embebição, mas impedindo a protusão da raiz primária (SANTOS 2008).

O condicionamento de sementes é uma técnica de pré-germinação que consiste em um conjunto de tratamentos de hidratação que ocorre antes da semeadura, destinado a melhorar a qualidade de sementes e plântulas produzidas, com procedimentos para favorecer a germinação e o desenvolvimento de plântulas, ativando os mecanismos metabólicos necessários para a germinação, até o momento anterior a protrusão da radícula (MARCOS FILHO E KIKUTI, 2008). Para que o condicionamento da semente seja otimizado torna-se necessário determinar a marcha de absorção de água, pois é conhecido que a tolerância das sementes a desidratação decresce à medida que progride a embebição, sendo severamente inibida ou perdida a partir da protrusão da raiz primária (MARCOS FILHO, 2005). Desta forma, o conhecimento da ativação metabólica adequada determinada através de uma curva de embebição é fundamental para definição do momento de paralisação do fornecimento de água para a semente. A partir daí pode-se proceder à secagem das sementes até as mesmas obterem a massa inicial (MARCOS FILHO, 2005). O condicionamento fisiológico das sementes, por meio de técnicas de pré-hidratação ou condicionamento osmótico, seguido pela secagem, possibilita uma uniformização da germinação. Dependendo do procedimento de hidratação da semente adotado o tratamento pode ser denominado como: condicionamento hídrico (hidrocondicionamento), condicionamento osmótico (osmocondicionamento), condicionamento mátrico (matricionamento) ou, ainda, *priming* (SILVA, 2013). As técnicas de hidratação que apresentam uma melhor eficiência são as de hidrocondicionamento e de condicionamento osmótico, embora existam, também, outras técnicas como o matricionamento (que envolve o uso de materiais como argila, vermiculita, areia e turfa), a exposição das sementes à atmosfera úmida e a pré-germinação (HÖLBIG, 2011, apud CASEIRO, 2003).

A imersão das sementes em água tem sido menos utilizada para o condicionamento fisiológico porque a embebição muito rápida favorece a ocorrência de injúrias nas sementes, ao mesmo tempo, ocorrendo uma distribuição desuniforme da água durante a hidratação e a severa restrição à aeração dificulta a obtenção de resultados favoráveis (RODRIGUES et al., 2012). A diminuição de absorção de água pelas sementes age na diminuição da velocidade dos processos fisiológicos e bioquímicos da germinação afetando a formação de plântulas em seu crescimento e um menor acúmulo de matéria seca (LARRÉ et al., 2011; apud SILVA et al., 2007). Segundo Marcos Filho (2005) o condicionamento mátrico é um processo em que as sementes são misturadas com um material sólido e água, em proporções planejadas. Caldeira

(2013) relaciona as características desejáveis nos materiais destinados ao matricondicionamento que são o baixo potencial mátrico e potencial osmótico negligível, alta capacidade de retenção de água, ser insolúvel em água e apresentar estabilidade física durante o condicionamento, ser quimicamente inerte e não tóxico à semente, apresentar ampla superfície de exposição, apresentar facilidade de manejo e facilidade de separação ou remoção das sementes após o tratamento. Nesse caso, podemos citar a vermiculita, a areia e outros produtos, como silicato de cálcio sintético, celite (MARCOS FILHO, 2005). Podem também ser utilizados diferentes tipos de papel, como a toalha, chupão ou de filtro, sendo nesses casos, é comum a fixação do volume de água e da quantidade de sementes, variando o número de folhas de papel, que podem ser detectado através de uma curva de embebição, respeitando a característica de cada espécie de acordo com as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

Nas sementes, as partículas sólidas e a água são os três componentes básicos do condicionamento mátrico. A água é distribuída e permanece retida pelas partículas sólidas, sendo captadas pelas sementes até que seja atingido o equilíbrio higroscópico (PESKE et al., 2003). Após este período previamente determinado, as sementes são secas em estufas ou mesmo em ambientes aerados até retornarem ao seu peso inicial que pode ser verificado com pesagem anterior ao processo de hidrocondicionamento e posterior ao hidrocondicionamento (BALBINOT e LOPES, 2006).

De acordo com Marcos Filho (2005), a quantidade de partículas sólidas necessárias para o tratamento depende da quantidade de sementes a ser submetidas ao processo, da capacidade de retenção de água e da sua propriedade de se manter friável durante todo o processo. Há a necessidade de condução de testes preliminares para determinação precisa das proporções adequadas de sementes, água e substrato. A matriz deve apresentar grande capacidade de retenção de água e de transferi-la sem maiores problemas às sementes. De acordo com Marcos Filho, 2005 (apud. TILDEN & WEST 1985), a limitação do material mátrico tem, além da vantagem de não introduzir substâncias estranhas ao processo, a de não interferir na disponibilidade de oxigênio. Por outro lado ao se trabalhar com o potencial osmótico, podem-se manter as sementes com graus de umidade desejados, utilizando-se o período de embebição variável, após o envelhecimento artificial de sementes de soja, a 41°C, durante 20 a 50 horas. Essas sementes foram condicionadas mediante a embebição em 20 ml de água distribuída sobre camada de quatro folhas de papel de filtro, a 25°C, durante dois dias, seguida por secagem a 25°C durante quatro dias (KIKUTI e FILHO, (2012); FRANZIN et al., (2004)). Esse procedimento teve como objetivo comparar os efeitos do condicionamento em amostras com diferentes níveis de deterioração e os efeitos da velocidade de hidratação sobre o desempenho das sementes (BHERING et al., 2006). Os resultados obtidos demonstraram que a ação de mecanismos de reparo contribuiu para a reestruturação do sistema de membranas, pois mesmo as sementes condicionadas após envelhecimento durante 50 horas apresentaram liberação de exsudatos inferior à das não condicionadas. Estes autores, além de ressaltarem a eficiência da metodologia utilizada para o condicionamento, sugeriram que a redução dos níveis de injúrias durante a embebição e a reorganização das membranas e de componentes estruturais das células são evidências da reversibilidade da deterioração (COSTA et al., 2007). Também o tratamento com “priming” pode aumentar a emergência das plântulas e a produtividade de várias culturas, principalmente de cenoura, alface, tomate, pepino, cebola e alho (DEARMAN et al., 1987; KHAN, 1992), já em outro estudo realizado por Fessel et al (2002), testando o condicionamento osmótico de sementes dos cultivares Mesa 659 e Nabuco RS concluiu que não melhoram o desempenho germinativo, sendo, portanto, inviável nos períodos testados, para esses cultivares. Nesse caso específico o osmocondicionamento não beneficiou a performance das sementes de alface.

De acordo com Caseiro (2004) as sementes embebidas mais lentamente, entre cinco folhas de papel-toalha foram as de melhor desempenho no teste de envelhecimento acelerado. Uma das vantagens desse processo é a não utilização de produtos químicos nesse processo. Barbosa et al., (2011) avaliaram o envelhecimento acelerado de sementes de alface, berinjela, brócolis, couve-flor, rúcula e tomate que foram submetidas ao envelhecimento acelerado, por 48 e 72 horas, para obtenção de lotes com três níveis de vigor.

Em outro estudo, Ohlson et al., (2010), num ensaio para identificar níveis de vigor sobre em sementes de trigo utilizando o teste de envelhecimento acelerado definiram que a uma temperatura de 43 °C, durante 48 horas, permitiu diferenciar lotes de sementes de trigo. Posse (2004) avaliou a temperatura de armazenamento e desempenho de sementes hidratadas e osmocondicionadas de pimentão (*Capsicum annuum* L.) concluiu que a hidratação das sementes por 72 horas propiciou aumento na germinação apenas para as sementes recém-tratadas. Os estudos demonstram que o condicionamento fisiológico melhora e padroniza as taxas de germinação, que para a agricultura orgânica por não aceitar técnicas convencionais se torna bastante viável.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de três formulados comerciais de *Trichoderma* spp., associados com sementes condicionadas e não condicionadas de alface sobre o controle de *R. solani* na fase de crescimento inicial em plântulas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios para avaliação dos lotes de sementes e condicionamento foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Sementes, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os testes com fungos foram realizados no Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia, da Embrapa Agroindústria de Alimentos e os experimentos em casa de vegetação no Colégio Técnico da Universidade Rural (CTUR). Os lotes de sementes de alface utilizados em todos os experimentos foram da cultivar “Grand Rapids” produzidas em cultivo orgânico, sem nenhum tratamento, colhidas e beneficiadas em agosto de 2013, no campo experimental da Pesagro-Rio no distrito de Avelar, no município de Paty do Alferes, estado do Rio de Janeiro.

4.1. Caracterização inicial do lote de sementes de alface

As sementes foram colhidas e armazenadas em embalagem porosa de papel tipo Kraft mantidas em condições normais de ambiente sendo rebeneficiadas no laboratório. Determinou-se a porcentagem do teor de água e a porcentagem de germinação das sementes (RAS, 2009).

4.2. Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado utilizando 50 sementes distribuídas em caixas de acrílico (gerbox), protegidas por sacos de polietileno, com quatro repetições a 20 °C, conforme as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). A primeira contagem das plântulas normais foi realizada aos quatro dias e a contagem final aos sete dias.

4.3. Determinação do teor de água

Foi utilizado o método da estufa a 105 °C por 24 horas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem, na base úmida, obtendo-se a média de 6,3%.

4.4. Determinação da curva de hidratação e condicionamento de sementes de alface

Amostras de sementes foram embebidas em papel “germitest”, umedecido com 16,5 ml. Este volume foi utilizado como recomendado pela RAS, 2009 normalmente quando se utiliza folhas de papel “germitest”, que corresponde a 2,5 vezes o peso do papel. Este mesmo volume foi aplicado em 2, 3, 4 e 5 folhas de papel germitest (MARCOS FILHO, 2005). A partir daí, as sementes foram pesadas periodicamente até 30 horas e determinados os teores de água das sementes em porcentagem na base úmida, considerando o teor de água inicial, até a sua estabilização e quando estas iniciaram a protrusão de radícula. Definido o tempo decorrido do início da embebição até a emissão da radícula, foi estabelecida a metodologia para o condicionamento, na qual foi escolhido a embebição das sementes com três folhas de papel por 16 horas visto que, com dois e cinco folhas a protrusão de radícula não ocorreu até 30 horas (Figura 1). Assim, amostras de 5,00 g de sementes foram colocadas entre três folhas de papel, previamente umedecidas com água destilada em 2,5 vezes o peso do papel e mantidas em câmara de germinação a 20 °C. Após a hidratação, as sementes foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 30 ± 2 °C, até atingirem os teores de água iniciais, ou seja, 6,3% (MARCOS FILHO, 2005).



Figura 1. Amostras de sementes de alface variedade “Grand Rapids” condicionadas entre 2,3,4 e 5 folhas de papel para a determinação da curva de hidratação.

4.5. Ação do biocontrole com *Trichoderma* em relação à *R. solani* em plântulas, cultivadas em casa de vegetação.

O experimento foi conduzido no Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em casa de vegetação, localizado no município de Seropédica. Os antagonistas usados no experimento foram três produtos a base de *Trichoderma* vendidos comercialmente e identificados como: A (*Trichoderma asperellum*), B (*Trichoderma* spp.) e C (*Trichoderma harzianum*, *T. viride* e *T. koningii*). As concentrações aplicadas nos tratamentos respeitaram as indicações de rótulo de cada fabricante, onde alíquotas foram diluídas em água estéril com uma gota de Tween 20. Para o produto A (*Trichoderma asperellum*), diluição de 1:200 litros de água aplicável em 1 ha, para B (*Trichoderma* spp.) usou-se a mesma proporção de 1:200 litros de água, e para C (*Trichoderma harzianum*, *T. viride* e *T. koningii*) que é vendido na forma de cultura em meio sólido, prosseguindo-se com a orientação do fabricante onde triturou-se essa cultura em 1 litro de água e triturou-se em liquidificador, posteriormente retirou-se 10 ml dessa solução e diluiu-se em 2 litros de água e aplicou-se na área a ser inoculada. O inóculo de *R. solani* isolado a partir de mudas de alface (*Lactuca sativa*) produzidas em bandejas de isopor foi crescido na forma de arroz triturado incorporado diretamente ao substrato, adicionando-se 0,144g/Kg de substrato conforme descrito por Dias (2011), que ocorreu sete dias após os agentes de biocontrole.

A inoculação dos três formulados de biocontrole ocorreu sete dias antes da inoculação de *R. solani*. Um dia após a inoculação do fitopatógeno foi realizada a semeadura de 30 sementes de alface condicionadas ou não condicionadas em bandejas de papel alumínio tipo marmitex (Figura 2) com furos na parte inferior para eliminação do excesso de água. Cada bandeja foi preenchida com 300 g de substrato solarizado e mantida em casa vegetação, sobre mesas de madeira.



Figura 2. Bandejas tipo marmitex com substrato inoculado com *Trichoderma* spp., e *R. solani*.

A irrigação foi feita manualmente com o auxílio de regador. O turno de rega adotado foi duas vezes ao dia nos três primeiros dias e uma vez ao dia até o fim do experimento aos 28 dias após de plantio.

4.6. Preparo do substrato

O substrato utilizado nos experimentos foi preparado na Fazendinha Agroecológica Km 47, -convênio de cooperação técnica entre a Embrapa Agrobiologia, Universidade Federal Rural Rio de Janeiro-UFRRJ) e Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro-Pesagro-Rio, no município de SEROPÉDICA-RJ.

O substrato solarizado foi composto a partir da mistura (volume/volume) de vermicomposto (75%), com fino de carvão vegetal (15%) e torta de mamona 2%, totalizando 92%. O vermicomposto foi produzido a partir de esterco bovino, utilizando-se minhocas da espécie *Eisenia fetida*. O material fino de carvão representa um resíduo do processamento da madeira proveniente de áreas reflorestadas, com amparo legal. Depois de estabilizado o substrato foi submetido à solarização, OLIVEIRA et al., (2010).

4.7. Isolados de *R. solani*.

Os isolados de *R. solani* foram obtidos a partir de mudas de alface com sintomas de tombamento produzidos em bandejas de isopor (Figura 3), produzidas na Fazendinha Agroecologia do Km 47 da foram levadas ao Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos, onde foi realizada a técnica de isolamento indireto das mudas com sinais de infecção pelo patógeno *R. solani* (Figura 4), em meio de Batata Dextrose Agar (BDA) para se obter colônias de *R. solani*. Os fragmentos dos tecidos vegetais foram cortados em pedaços de 0,5 cm (Figura 5) lavados em água corrente para eliminar qualquer resíduo orgânico. Em seguida, os fragmentos foram colocados em uma solução de álcool 70% por 30 segundos, posteriormente, transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio 1% por um minuto, em seguida lavados em água destilada esterilizada e secados em papel filtro esterilizado (YOUSSEF et al., 2012).

Após esse processo os fragmentos foram transferidos para placas de Petri (Figura 6) contendo meio de cultura BDA (Tabela 1). As placas foram mantidas em incubadora tipo BOD a 25 °C até a observação do crescimento micelial típico de *R. solani* (Figura 7). Depois da confirmação da identificação através de exame microscópico, os isolados foram conservados *in vitro* pelo método de preservação em tubos de ensaio inclinado. O substrato

utilizado para multiplicação de *R. solani*, constituiu-se em arroz umedecido com água destilada' 70% (p/v) para colonização, sendo acondicionado em sacos de polietileno de 20,0 x 25,0 cm. Estes recipientes foram lacrados e autoclavados a 120 °C (1 atm/20 min.) de acordo com a metodologia de Dias (2011).



Figura. 3 Plântulas de alface após apresentarem sinais de tombamento na fase de muda sob plantio em bandejas de isopor.

Tabela 1. Meio de cultura BDA para crescimento de *R. solani*

Meio de Cultura batata dextrose Agar

Potato Starch (from infusion)	4 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
pH	5,6
H ₂ O	1 Litro



Figura 4- Fragmentos dos tecidos vegetais de plântulas de alface infectadas por *R. solani*.



| **Figura. 5-** Fragmentos dos tecidos vegetais de plântulas de alface infectadas por *R. solani* em pedaços de 0,5 cm.

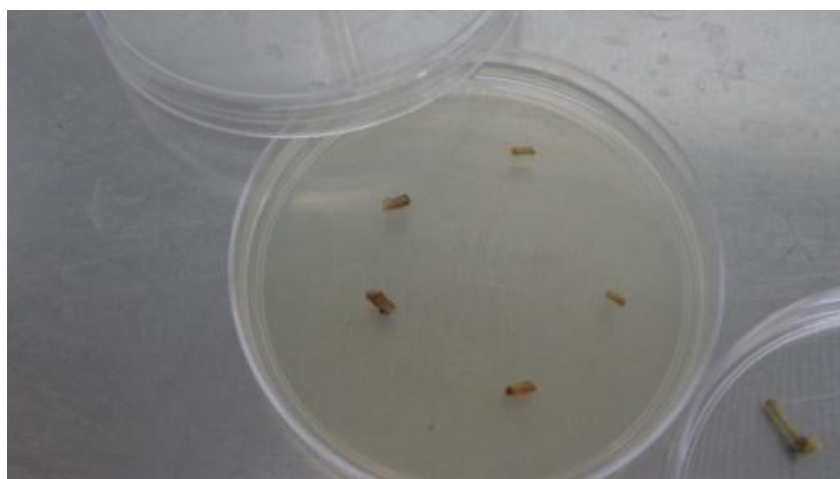


Figura 6. Fragmentos de planta de alface contaminada dispostas sobre meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) com *R. solani*.

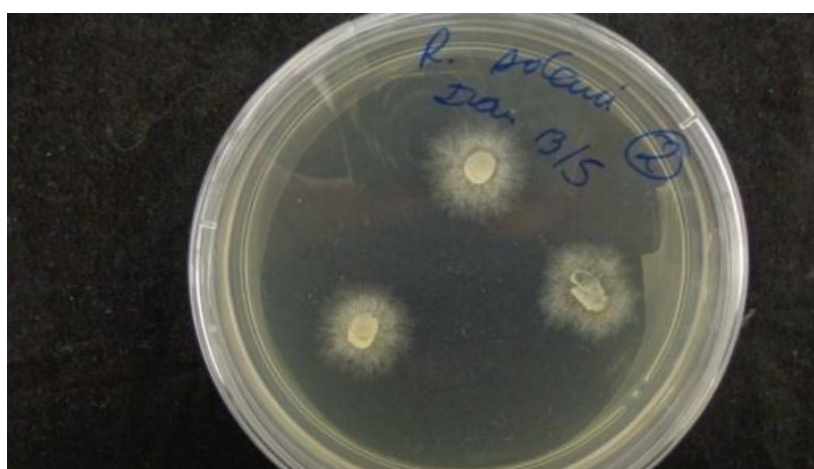


Figura 7. Crescimento micelial de *R. solani*, em placa contendo meio Batata Dextrose Agar.

Para o preparo do inoculante contendo *R. solani*, utilizou-se o método usado por Dias (2011), quando um dia após o preparo do substrato a base de arroz, foram inoculados nesse substrato três discos de micélio de 0,8 cm de diâmetro das placas de BDA contendo *R. solani*. Incubou-se a 25 °C por 7 dias (Figura 8), sendo misturados diariamente para permitir a completa colonização do substrato. Após crescidos, o arroz contaminado com a *R. solani* foi retirado e colocado em sacos de papel por 24 horas em temperatura ambiente para eliminar o excesso de umidade. Passado este período, foi triturado a seco em liquidificador e peneirado em peneira doméstica com malha de 0,6 milímetros, obtendo-se assim o inóculo contendo fragmentos com *R. solani*. Decorridos sete dias de inoculado o substrato com os três tipos comerciais de *Trichoderma*, foram misturados às amostras de *R. solani* contendo 0,144 mg. Kg⁻¹ de inoculante por Kg se solo, valores semelhantes aos usados por Dias (2011) onde alcançou 43% de *damping off* em mudas de alface.

O inoculante de *R. solani* foi incorporado ao substrato, colocados em sacos plásticos e misturados manualmente e distribuídos 300 g em bandejas de papel alumínio tipo marmitex. Após três dias foram feitos os plantios tanto das sementes condicionadas quanto das sementes não condicionadas. As bandejas foram colocadas em casa de vegetação e molhadas diariamente. Foram feitas avaliações de plântulas aos 14, 21 e 28 dias. A cada sete dias foram feitas contagens de plantas mortas ou tombadas até os vinte e oito dias quando foram feitas as últimas avaliações e retiradas cinco plantas de cada parcela para avaliar a massa seca da parte aérea.

Para cada parcela, foram coletadas a parte aérea de cinco plântulas, colocadas em estufa a 50 °C por 48 h e após pesadas em balança com precisão 0,001 g obteve-se a média da massa seca em mg.

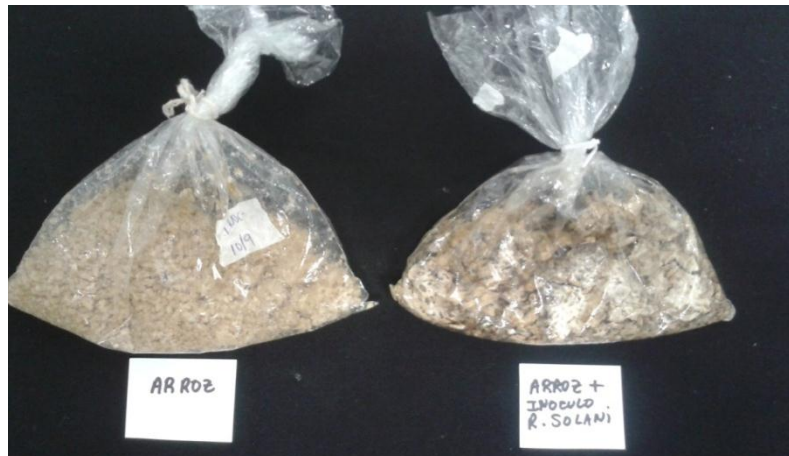


Figura 8. Substrato a base de arroz umedecido com água destilada 70% (p/v) acondicionado em sacos de polietileno de 20,0 x 25,0 cm para colonização de *R. solani*

4.8. Delineamento experimental

O delineamento estatístico experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. O experimento relativo à associação de *Trichoderma* e sementes condicionadas foi realizado em esquema fatorial 5 x 2 (cinco tratamentos x sementes condicionadas e não condicionada). Os dados obtidos foram transformados em raiz quadrada e as médias foram apresentadas como valores absolutos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva de hidratação

A curva de hidratação de sementes de alface mostrou que a embebição das sementes entre três folhas de papel previamente umedecidas com água destilada em 2,5 vezes o seu peso, por 16 horas, foram suficientes para que as mesmas ativassem o metabolismo sem que ocorresse a protrusão da radícula. Observou-se que a hidratação das sementes variou de acordo com o número de folhas em função da disponibilidade de água, variando a velocidade de embebição e o teor de água, variando de 45% a 52% (Figura 09).

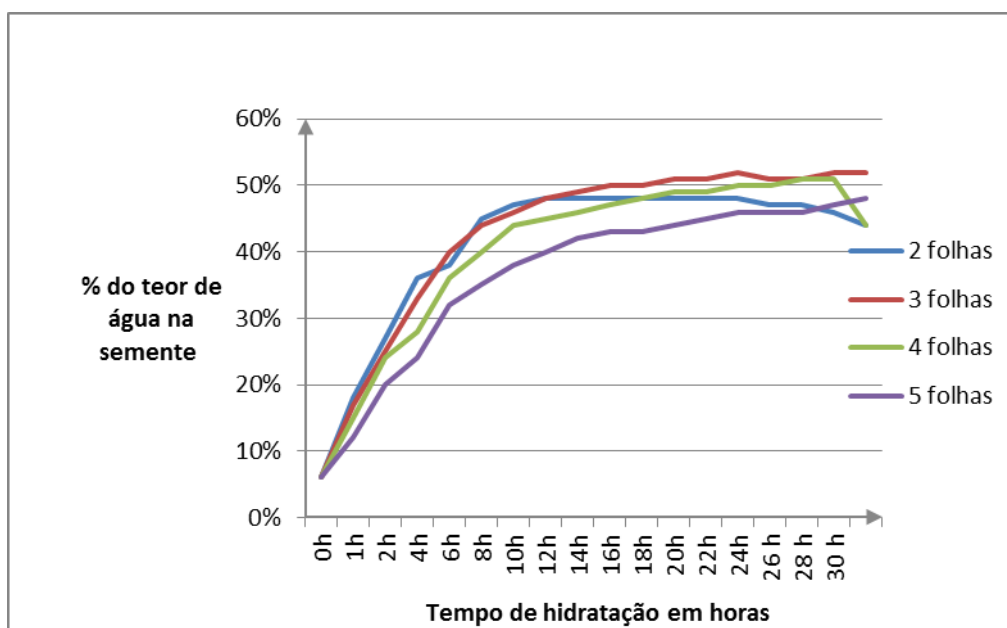


Figura 09. Hidratação de sementes de alface cv. “Grand Rapids” entre 2, 3, 4 e 5 folhas de papel germitest embebidas em 16,5 ml de água destilada mantidas a 20 °C por até 30 horas.

Após o tratamento de condicionamento as sementes apresentaram alto vigor, com 100% de plântulas normais aos 4 dias de avaliação e 100% de germinação, porém não diferindo das sementes sem o tratamento.

5.2. Efeitos dos Tratamentos com formulados a base de *Trichoderma*

A avaliação *in vitro* e com o auxílio de microscópica quanto à presença e crescimento do *Trichoderma*, em amostras dos três formulados, mostrou a presença de crescimento radial e esporulação abundantes em meio de BDA (Batata dextrose Agar), característicos das espécies em estudo. Os resultados obtidos dos tratamentos em mudas de alface são ilustrados nas figuras a seguir: 1. Testemunha absoluta (Figura 10); 2. Substrato inoculado com *R. solani* (Figura 11); 3. Produto A (*Trichoderma asperellum*) e *R. solani*, (Figura 12); 4. Produto B (*Trichoderma* spp.) e *R. solani* (Figura 13); 5. Produto C (*Trichoderma harzianum*, *T. viride* e *T. koningii*) e *R. solani* (Figura 14).



Figura 10. Plântulas de alface variedade “Grand Rapids” aos 21 dias em substrato (controle) mantida em casa de vegetação. Seropédica, 2013



Figura 11. Plântulas de alface variedade “Grand Rapids” aos 21 dias em substrato solarizado inoculado com *R. solani* mantida em casa de vegetação. Seropédica, 2013.

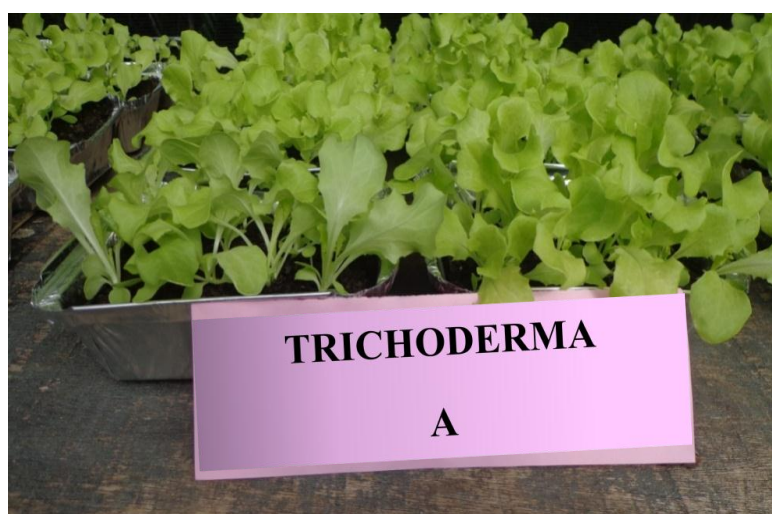


Figura 12. -Plântulas de alface variedade Grand Rapids aos 21 dias em substrato solarizado inoculado com o fitopatógeno *R. solani* e antagonista A (*Trichoderma asperellum*) mantida em casa de vegetação



Figura 13. Plântulas de alface variedade Grand Rapids aos 21 dias em substrato solarizado inoculado com *R. solani* e antagonista B (*Trichoderma* spp.) mantida em casa de vegetação.



Figura 14. Plântulas de alface variedade Grand Rapids aos 21 dias em substrato solarizado inoculado com *R. solani* e antagonista C (*Trichoderma harzianum*, *T. viride* e *T. koningii*) mantida em casa de vegetação

De acordo com os resultados mostrados na tabela 2 , observou-se que houve uma redução de 44% de emergência de plântulas no tratamento isolado com *R. solani*. Os resultados obtidos da inoculação dos três formulados mostraram um controle significativo deste fitopatógeno, não diferindo entre si.

Tabela 2. Percentual de emergência de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) oriundas de sementes sadias nos tratamentos controle, inoculadas com *R.solani*, e inoculadas com *Trichoderma* A, B e C e *R.solani* em sementes condicionada e sementes não condicionada.

Tratamento	Emergência de plântulas (%)
Controle	97,08 ± 4,86 ^a
<i>R. solani</i> .	56,65 ± 4,71 ^c
A (<i>Trichoderma asperellum</i>) + <i>R. solani</i>	88,30 ± 7,65 ^{ab}
B (<i>Trichoderma</i> spp.) + <i>R. solani</i>	88,30 ± 7,13 ^{ab}
C (<i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> e <i>T. koningii</i>) + <i>R.solani</i>	81,60 ± 10,98 ^b
CV % = 9,38	

Médias seguidas de mesmas letras, não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey (P< 0,05).

A interação entre as sementes condicionadas e não condicionadas não foi significativa nos tratamentos, uma vez que as mesmas apresentaram alto porcentagem de germinação *in vitro* e a emergência de plântulas e de mudas obtidas até os 28 dias não foram afetados pelos tratamentos.

Em relação à porcentagem de emergência de plântulas, apenas o tratamento com *R. solani* apresentou maior incidência da doença como era de se esperar, tanto para semente não condicionada e semente condicionada. Os tratamentos com pré-inoculação do *Trichoderma* spp., protegeram as sementes da infecção por *R. solani* uma vez que diferenciaram dos tratamentos controle. Em trabalho similar Dias (2011), avaliou o tombamento em plântulas de feijão em condições de casa-de-vegetação utilizando diversos isolados de *Trichoderma* spp. contra *R. solani* e de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* obtendo um controle satisfatório dos isolados de *Trichoderma* para ambos os fungos.

Nas tabelas 3 e 3.1 são apresentados os resultados percentuais das infecções por *R. solani* em sementes condicionadas e não condicionadas. Na fase de emergência de plântulas foi observada uma maior infecção nas sementes não condicionadas. Este fato pode ser devido a menor exsudação de substâncias que favorecem o crescimento do fungo.

Tabela 3. Percentual de plântulas infectadas com *R. solani* em sementes não condicionadas e condicionadas.

Tratamento da semente de alface	Plântulas infectadas (%)
Não condicionada	13,14 ^a
Condicionada	9,98 ^b

Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey (P< 0,05).

Tabela 3.1. Percentual de emergência de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) infectada nos tratamentos controle, inoculadas com *R. solani*, e inoculadas com *Trichoderma* A, B e C e *R. solani* para semente condicionada e não condicionada.

Tratamento	Plântulas infectadas (%)
Controle	2,90 ^c
<i>R. solani</i>	30,80 ^a
A (<i>Trichoderma asperellum</i>) + <i>R. solani</i>	5,35 ^{bc}
B (<i>Trichoderma spp</i>) + <i>R. solani</i>	7,50 ^{bc}
C (<i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> e <i>T. koningii</i>) + <i>R. solani</i>	11,25 ^b
CV % = 38,88%	

Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na horizontal, não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey (P< 0,05).

Somente no tratamento *Trichoderma* 3 inoculado também com *R. solani* ocorreu um índice maior de sementes infectadas, destoando-se significativamente dos demais tratamentos com *Trichoderma* spp. Tal resultado pode ser atribuído a uma menor especificidade do isolado em relação ao hospedeiro, uma vez que esta variabilidade pode ocorrer naturalmente.

Em experimento conduzido por Lucon et al., (2009) ao avaliarem diversos isolados de *Trichoderma* spp., concluiu que apenas 9 % foram capazes de reduzir os sintomas de tombamento causado por *R. solani* em plântulas de pepino, e que quando aplicados isoladamente são mais eficientes que quando combinados entre si.

Vários relatos podem ser encontrados na literatura sobre o potencial de *Trichoderma* spp. no controle de tombamento de plântulas (ZHENG & SHETTY, 1999; MANORANJITHAM et al., 2000; LEWIS E LUMSDEN, 2001; PATRÍCIO et al., 2001; HOWEL, 2006).

Segundo estes autores podem ocorrer reduções de até 82% nos sintomas de tombamento em diferentes culturas, pela aplicação desses antagonistas. A capacidade do antagonista *Trichoderma* spp. em proporcionar o controle de fitopatógenos do solo tem sido associada, principalmente, aos mecanismos de micoparasitismo, antibiose e competição (HARMAN, 2004).

Desta forma, a adição de antagonistas ao substrato de crescimento é uma estratégia importante que pode ser adotada no controle de fitopatógenos de solo, permitindo a colonização e o estabelecimento destes agentes antes de sua exposição ao inóculo patogênico presente no campo (HARRIS E ADKINS, 1999).

A tabela abaixo ilustra a relação entre sementes não condicionadas e condicionadas de plântulas mortas no controle de *R.solani* na fase de produção de mudas em casa de vegetação.

Tabela 4. Percentual de tombamento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) nos tratamentos controle, inoculados com *R.solani*, inoculados com e *Trichoderma* A, B e C e *R.solani*.

Tratamento	Tombamento de plântulas (%)
Controle	0,00 ± 4,86 c
<i>R.solani</i> .	12,50 ± 4,96 a
A (<i>Trichoderma asperellum</i>) + <i>R. solani</i>	5,00 ± 3,96 bc
B (<i>Trichoderma</i> spp.) + <i>R. solani</i>	4,17 ± 3,88 bc
C (<i>T. Harzianum</i> , <i>T. Viride</i> e <i>T. Koningii</i>) + <i>R. solani</i>	6,67 ± 5,33 ab
CV% 17,5	

Médias seguidas de mesmas letras, não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey (P< 0,05).

Apenas o controle com *R.solani* apresentou um número razoável de mudas que ao longo dos 28 dias foram apresentando os sintomas de “dumping off”. De acordo com Nashwa et al., (2008), notaram redução considerável da percentagem de “tombamento” de pré e pós-emergência em experimento com feijoeiro, quando comparado com a testemunha. Já os tratamentos não foram significativos para tombamento

Todavia, a aplicação da formulação com o isolado *Trichoderma harzianum* 1 ao mesmo tempo em que a realização da semeadura foi a que promoveu uma maior redução da incidência da doença. Remuska e Pria (2007) observaram parasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *R. solani* em ambiente controlado de laboratório. Hadar et al.(1979), inocularam *Trichoderma harzianum* utilizando como veículo farelo de trigo em solo infestado com *R. solani*, e obtiveram controle efetivo de tombamento de mudas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e tomate (*L. esculentum*). Noronha et al., (1996) relatam que *Trichoderma harzianum* em feijão, quando aplicado via tratamento de sementes ou do solo sob diferentes densidades de inóculo do *R. solani* no substrato apresentou os melhores níveis de controle da doença, quando comparado a um tipo específico de fungicida. Apesar de efeitos negativos de *Trichoderma* em plantas sejam eventos pouco descritos em literatura, onde a maior parte dos trabalhos demonstra a capacidade de fungos do gênero *Trichoderma* em promover o crescimento e a produtividade das culturas (VINALE et al., 2008).

No que consiste a produção de matéria seca não ocorreu interação entre plântulas em relação à produção de matéria seca de forma significativa, uma vez que a média dos pesos da matéria seca por parcela não diferiu dos demais tratamentos.

Tabela 5. Massa seca (mg) da parte aérea de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) nos tratamentos com substrato, Substrato e *R. solani*, substrato e *Trichoderma* A, B e C e *R. solani*.

Tratamento	Sementes não condicionadas	Sementes condicionadas	Medias
Controle	0,04	0,05	0,4 AB
<i>R. solani</i> .	0,03	0,03	0,3 B
A (<i>Trichoderma asperellum</i>) + <i>R. solani</i>	0,06	0,04	0,5 A
B (<i>Trichoderma</i> spp.) + <i>R. solani</i>	0,05	0,04	0,4AB
C (<i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> e <i>T. koningii</i>) + <i>R. solani</i>	0,04	0,06	0,5A
MÉDIAS	0,044ns	0,044 ns	
<i>Cv % = 77,44</i>			

Médias seguidas de mesmas letras nas colunas, não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

ns – não significativo.

Na tabela 5, os resultados não mostraram diferenças significativas das massas secas. Esses dados concordam com Corrêa (2006), onde em condições de hidroponia, e Bal & Altintas (2008), em condições subótimas de crescimento em campo, não constataram nenhum tipo de efeito de *Trichoderma* spp., no crescimento de plantas de alface.

Estes dados discordam dos observados por Lynch (1991), que relatou aumentos de 27 a 54% no peso fresco de alface tratada com *Trichoderma* spp. Por outro lado, Menezes (1992) também obteve melhor desempenho de plantas de alface originadas de sementes tratadas com *Trichoderma*.

Já os resultados encontrados por Ousley et al., (1993) que alcançou maior produtividade das massas fresca e seca de parte aérea, e aumento do enraizamento em alface pela ação promotora de crescimento de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma Viride*. Martelleto (2005) concluiu que isolados de *Trichoderma* spp., testados estimularam a velocidade de germinação, em condições de terra comum, substrato comercial ou papel germitest, favorecendo o desenvolvimento das mudas, expressos pelo comprimento de raiz, altura de parte aérea, de acúmulo de matéria fresca e em relação às testemunhas sem *Trichoderma* em experimento com tomate.

Na diagnose visual das mudas de alface em casa de vegetação até os 28 dias observou-se que estas não apresentaram sintomas de anormalidade nem de deficiência nutricional, demonstrando que os isolados de *Trichoderma* spp., não ocasionaram patogenicidade nem prejuízo de qualquer forma a estas.

Tais resultados corroboram com a afirmativa de Howell (2003), de que espécies de *Trichoderma* spp., exibem características de interação com a planta hospedeira que podem contribuir para o aumento de crescimento de raiz e parte aérea, resistência a estresses bióticos e abióticos, e mudanças no status nutricional da planta.

6. CONCLUSÕES

Os formulados A e B a base de *Trichodermas* spp., testados neste trabalho apresentaram um melhor controle do fitopatógeno de solo *R. solani*, na fase de plântulas de alface, cultivar Grand Rapids.

O uso de *Trichoderma* não aumentou de forma significativa produção de matéria seca na fase de mudas até os 28 dias no cultivo de alface.

Não ocorreram diferenças significativas entre as sementes de alface não condicionadas e condicionadas em relação à germinação e o vigor das mesmas e na susceptibilidade à *R. solani*.

7. REFERÊNCIAS

- ABDO, M. T. V. N.; PIMENTA, R. S.; PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R. D.; apud Marcos Filho, 1999, 2001 Testes de vigor para avaliação de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 27 no. 1 Pelotas June 2005
- AGUIAR et al., Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de mudas do feijoeiro cv. Carioca e controle feijoeiro cv. **Ciência Natura**, UFSA 34 (2), fl. 47-58, 2013.
- ALENCAR, K. M. de C. et al. Priming of *Stylosanthes* seeds. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, Apr. 2012.
- BALBINOT, E.; LOPES, H. M.; Efeitos fazer condicionamento fisiológico e da Secagem na germinação e No vigor de Sementes de Cenoura. **Revista brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n. 1, abril de 2006
- BAL, U.; ALTINTAS, S. **Effects of *Trichoderma harzianum* on lettuce in protected cultivation**. 2008. Disponível em <<http://www.agr.hr/jcea/issues/jcea9-1/pdf/jcea91-9.pdf>> acesso em 15 de fevereiro. 2008
- BARBOSA, R. M.; COSTA, D. S. da; SA, M. E. de. Envelhecimento acelerado de sementes de espécies oleráceas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, Sept. 2011.
- BARROS, B. C., PATRÍCIO, F. R. A., LOPES, M. E. B. M., FREITAS, S., S., SINIGAGLIA, C., MALAVOLTA, V. M. A., NETO, J. T., GHINI, R. Solarização do solo com filmes plástico com e sem aditivo estabilizador de luz ultravioleta, **Horticultura brasileira**, v. 22, n. 2, abr.-jun. 2004.
- BEDENDO, I. P. Damping-off. In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1995 a. v.1, cap. 42, p. 820- 828.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; GALVÃO, J. A. H. Solarização do solo para o controle de *Pythium* e plantas daninhas em cultura do crisântemo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.51, p.459-462, 1994.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. de C. do BONFIM; BEZERRA, J. L. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas**. V. 17, P. 111-147, 2009.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JÚNIOR, T. J.; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas. Jaguariúna, SP, **Embrapa Meio Ambiente**, 2012, 155 p.

BHERING, M. C. et al. Teste de Envelhecimento acelerado los Sementes de pimenta. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n. 3, dezembro de 2006.

BISSET, J. A. Revision of the genus *Trichoderma*: Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.69, n.11, p.2357-2372, Nov. 1991.

BOTELHO, S. A.; RAVA, C. A.; LEANDRO, W. M.; COSTA, J. L. S. **Supressividade natural de solos da região centro-oeste a *Rhizoctonia solani* KÜHN. Pesquisa agropecuária tropical**, 31(2): 105-110. 2001. <http://agris.fao.org/agrissearch/search/display.do?f=2012/DJ/DJ2012069800391.xml;DJ2012069848> acesso em 10 de novembro de 2011.

BRAGA, N. da S.; MORAIS, C. S. B. de; ROSSETTO, C. A. V. *Hidratação controlada de sementes de pinhão manso*. **Revista Ciências Agrônômicas.**, Fortaleza , v. 43, n. 3, Sept. 2012

BRAÚNA, L. M. **Controle biológico do mofo branco por isolados de *Trichoderma* nas culturas de soja e feijão comum**. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Fitopatologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de mestre em Fitopatologia. UNB, Brasília, 2011. 82 fl.

BRITO, F. S.; **Deteccção e avaliação in vitro e avaliação do crescimento de *Trichoderma* spp. Isolados de composto frente à fitopatógenos**. Florianópolis, maio de 2009. Dissertação para obtenção do título em Mestra em Agroecossistemas – pós-graduação em agrossistemas, UFSC. 80 f.; Ixx, grafs., tabs.

CALDEIRA, C., M. **Condicionamento fisiológico e peletização de semente de tabaco**. Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia para obtenção do Grau de doutor, Lavras, 2013 – 109 fl.

CAMPANHOLA, C. BETTIOL, W, RODRIGUES, G. S., Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um programa de relacionamento do uso de agrotóxicos no Brasil. **Dialogo L. Racionalizacion del uso de pesticidas em el Cono Sur. IICA- 1898**, Montevideo, Uruguay - 1998, PROCISUR; 45p.

CASEIRO, R. F. **Métodos para condicionamento fisiológico de sementes de cebola e influência da secagem e armazenamento**. 2003 Tese (Doutorado em Fitotecnia) – escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CASTRO, C. V. B. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* kuhn**. Apud CARDOSO, 1994 - Dissertações (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

CASTRO, C., V., B. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* Kuhn**. Belém - PA, 2007. 67 f: il. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

CHAO, W. L.; NELSON, E. B.; HARMAN, G. E.; HOCH, H. C. **Colonization of the rhizosphere by biological control agentes appliedto seeds**. *Phytopathology*. SaintPaul, v.76, n.1, p.60-65, Jan. 1986.

CHARCHAR, M. J. D.; DOS ANJOS, J. R. N., OSSUPI, E. Ocorrência de nova doença do algodoeiro irrigado, no Brasil, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*¹, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. vol.34 no. 6 Brasília June 1999

COSTA, N. P.; NETO, J. N. F.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em semente de soja-Circular técnica 39, **Série Sementes**, Londrina, PR, Janeiro, 2007.

CRODA, M. D.; NASCIMENTO, W. M.; FREITAS, R. A.; MEDEIROS, K. A. **Produção de sementes de alface nas condições do Distrito Federal e sua capacidade germinativa sob temperaturas elevadas**. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 48., 2008, Maringá. Resumos... Maringá: ABH. 1 CD-ROM. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/>>. Acesso em: 20 nov. 2008.

CRUZ, S. M. C.; RODRIGUES, A. A. C.; SILVA, E., K. C.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; Supressividade por incorporação de Resíduo de leguminosas no Controle da fusariose do tomateiro. **Summa Fitopatologia**, Botucatu, v 39, n. 3, setembro de 2013.

DIAS, P. P. **Controle Biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do Gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas**, Tese (doutorado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Seropédica 2011.

DEARMAN, J.; BROCKLEHURST, P. A.; DREW, L. K. Effects of osmotic priming and ageing on the germination and emergence of carrot and leek seed. **Annals of Applied Biology**, v.111, p.717-722, 1987.

MIELEZRSKI, F.; MARCOS FILHO, J.; Potencial fisiológico de sementes armazenadas e desempenho de plantas de ervilha. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 34, nº 4 p. 665 - 677 2012.

FESSEL, S. A. et al. Germinação de sementes de alface submetidas a condicionamento osmótico durante o armazenamento. **Scientia Agricola** (Piracicaba, Braz.), Piracicaba, v. 59, n. 1, Mar. 2002.

FRANZIN, S. M. et al. Métodos parágrafo Avaliação fazer potencial fisiológico de Sementes de alface. **Revista brasileira de Sementes**, Pelotas, v.26, n. 2, dezembro de 2004.

FRAVEL, D. R.; LEWIS, J.A. Effect of label and sublabel rates of metam sodium in combination with *Trichoderma hamatum* *T. harzianum* *T. virens*, and *T. viride* on survival and growth of *Rhizoctonia solani* **Phytoparasitica**, v.32, p.111-118, 2004.

GHINI, R.; PATRICIO, F. R.; A.; SOUZA, M. D.; SINIGAGLIA, C.; BARROS, B. C.; Efeito da solarização sobre propriedades, físicas, químicas e biológicas de solos, **Revista Brasileira de Ciência do solo.**, 27:71-79,

GOULART, A., C., P.; *Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle* /. **Embrapa Agropecuária Oeste. II**. Título. 72 p.: il. col.; 22 cm

GUIMARAES, A. M. **Bioprospecção de microrganismos epifíticos de tangerineiras cv. Montenegrina para o manejo da mancha preta do citros causada por *Guignardia citricarpa* kiely**. Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia Área de Concentração Fitossanidade, Porto Alegre (RS), Brasil. Abril de 2008, 91 pg.

HADAR, Y.; CHET, I. & HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with brean culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology** 69:64-68. 1979.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**. v. 2, p. 4356, 2004.

HARMAN GE (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathol.** 96: 190-194. Disponível em: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-0190> Acesso em: 02/2014.

HARRIS, A. R.; ADKINS, P.G. Versatility of fungal and bacterial isolates for biological control of damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Biological Control**, v.15, p.10-18, 1999.

HÖFS, A.; SCHUCCH, L. O. B.; PESKE, S. T.; BARROS, A. C. S. A. Emergência e crescimento de plântulas de arroz em resposta à qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes** vol.26 no.1 Pelotas 2004

HOLBIG, L.; BAUDET, L.; VILLELA, F. A.; Hidrocondicionamento de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, 2011.

HOWELL, C. R. Effect of seed quality and fungicide/*Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and post-emergence damping-off in cotton. **Phytopathology**, v.97, p.66-71, 2006.

HOWELL, C. R.; (2003) - Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the Biological Control of Plant Disease: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, 87, 1: 4-10.

KHAN, A. A. Preplant physiological seed conditioning. **Horticultural Reviews**, v.13.p.131-191, 1992.

KIKUTI, A. L. P; MARCOS FILHO, J. Testes de vigor los Sementes de alface. **Horticultura Brasileira**. , Vitória da Conquista, v 30, n. 1, março de 2012

KURTZ, M. A. A.; **Aspectos da interação arroz-*Trichoderma* spp. em solos alagados**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Agronomia, Programa de pós-graduação em fitotecnia Porto Alegre (RS), Brasil, Dezembro de 2008 – 60 p.

LARRE, C. F.; MORAES, D. M.; LOPES, N. F.; Qualidade fisiológica de sementes de arroz tratadas com solução salina e 24-epibrassinolídeo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, 2011.

LEWIS, J. A.; LUMSDEN, R. D. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v.20, p.49-56, 2001.

LIMA, A. E S.; **Condicionamento Osmótico de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf**. Campo Grande – MS - 2007. Tese (mestre) Programa de pós-graduação em biologia vegetal, centro de ciências biológicas e da saúde - departamento de biologia – UFMS - 2007.

LOPES, C. A.; REIA, A.; MAKISHIMA, N.; - **Como prevenir o “tombamento” em mudas de hortaliças**. Comunicado técnico 28. Dezembro, 2005 - Brasília, DF.

LOPES, R. B. (2009) - **A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil**. In: Bettiol, W. e Morandi, M. A. B. (Ed.) - **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 15–28.

OLIVEIRA, E. A., G.; **Desenvolvimento de substratos orgânicos, com base na vermicompostagem, para produção de mudas de hortaliças em cultivo protegido**, Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Agroecologia. UFRRJ, Seropédica, RJ, 78 f.: il.

LUCON et al, Bioprospecção de isolados de spp. para o controle *Trichoderma* de na produção de mudas de pepino *Rhizoctonia solani*, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.3, p.225-232, mar. 2009.

LUCON, C. M. M. (2009) - **Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. (em linha)**. Infobibos, Informações Tecnológicas. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm> Acesso em: 05/2013

LUZ, W. C. Microbiolização de Sementes para o Controle de Doenças. In: LUZ, W.C.; Fernandes, J.M.; Prestes, A.M.; Picinini, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, v.1, 416 p., p.33-79, 1993.

LYNCH, J. M.; WILSON, K. L.; OUSLEY, M. A.; WHIPPS, J. M. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. **Letters Applied Microbiology**, v. 12, p. 59-61, 1991.

LYNCK, J. Pesquisa inglesa com agentes biológicos. **Jornal Agroceres**, São Paulo, v. 212, p. 2, 1992.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, jun. 2012. Disponível em <http://www.scielo.gpeari.mctes.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2012000100026&lng=pt&nrm=iso>. Acesso: 01/2014.

VAZ, M. S. S. **Caracterização do gene lip2 de *Trichoderma harzianum***, Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia, Bragança 2010.

MAGGI et al, Produção de variedades de alface sob diferentes potenciais de água no solo em ambientes protegidos. **Irriga**, v. p. 415 -427, 2006.

MANORANJITHAM, S. K.; PRAKASAM, V.; RAJAPPAN, K.; AMUTHA, G. Effect of two antagonists on damping-off disease of tomato. **Indian Phytopathology**, v.53, p.441-443, 2000.

MARCOS FILHO J; KIKUTI A L P. 2008. Condicionamento fisiológico de sementes de couve-flor e desempenho das plantas em campo. **Horticultura Brasileira**26: 165-169

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MARTELLETO, M. S. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o tratamento de sementes de tomate visando à proteção contra patógenos de solo e de armazenamento e promoção de crescimento**. Tese de Mestrado, Seropédica: UFRRJ 112f. : il. 2005.

MATRIN, T. N.; TOMAZELLA, A. L.; CÍCERO, S. M.; NETO, D. D.; FAVARIN, J. F.; JÚNIOR, P. A. V. Questões relevantes na produção de sementes de Milho segunda parte. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.2, p. 80-101. 2007.

MELO, I. S. (1998) - Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. *In*: Melo, I.S. e Azevedo, J.L. (Ed.) - **Controle Biológico**, v.1. Jaguariúna, Embrapa, p.17–60.

MELO, I. S.; COSTA F. G. (2005) - **Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para o controle de fitopatógenos**. Jaguariúna, Embrapa, p. 1-4. (Comunicado técnico 31)

MENEZES, M. Avaliação de espécies de *Trichoderma* no tratamento de feijão e do solo, visando o controle de *Macrophomina phaseolina*. *In*: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 25., 1992, Gramado, RS. Resumos... Brasília: SBS, 1992. p. 159.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. *In*: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 15, p. 509-539.

NAKATANI, A. K.; **Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. E análise de sequências multilocos**, Botucatu-SP 2006. 98 f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006.

NARCISO, E. S. **Estudo preliminar do formulado à base do fungo *Trichoderma harzianum* em células sanguíneas de ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação - São Paulo, 2010.

NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, R. S. Testes para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface e sua relação com a germinação sob temperaturas adversas, **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 3, p. 175-179, 2007.

NASHWA, M. A.; SALLAM; K. A. M.; Abo-Elyousr; Hassan, M.A.E. Evaluation of *Trichoderma species* as biocontrol agents for damping-off and wilt diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and efficacy of suggested formula. **Egyptian Journal Phytopathology**, A- siut, v. 36, n.1/2, p. 81-93, 2008.

NASCIMENTO, W. M. "Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças visando à germinação em condições de temperaturas baixas." **Horticultura Brasileira** 23.2 (2005): 211-214.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J.; Lettuce seed germination at high temperature. **Hortic. Bras.**, Brasília, v. 20, n. 1, Mar. 2002.

NORONHA, A. B.; ALEXANDRE, M. A. V.; DUARTE, L. M. L.; VICENTE, M. Controle alternativo de fitovírus com a utilização de inibidores naturais. **Biológico**, v. 58, p. 7-12, 1996.

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

OHLSON, O. C. et al. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de trigo. **Rev. bras. sementes, Londrina**, v. 32, n. 4, 2010.

OHSE, S.; DOURADO-NETO. D.; MANFRON, P. A.; SANTOS, O. S. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia, **Scientia agrícola**, v.58, n.1, p.181-185, jan./mar. 2001.

OLIVEIRA, A. S et al. Condicionamento osmótico das Sementes de milho doce submetidas ao armazenamento. **Revista Ciência Agronômica**, v 38, n. 4, p. 444-448, 2007.

OLIVEIRA, A.; P., BRUNO, R. L.; A.; URSULINO, E. A.. Influência do substrato e da temperatura na germinação de sementes peletizadas de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 23, nº 2, p.72-77, 2001

OUSLEY, M. A.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J. M. Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 26, p. 277-285, 1993

PATANÈ, C. et al. **Germination and radicle growth in unprimed and primed seeds of sweet sorghum as affected by reduced water potential in NaCl at different temperatures**. Industrial Crops and Products, Washington DC, v.30, n.1, p.1-8, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.12.005>>. Acesso em: 09 de fev. 2014

PATRICIO, F. R. A.; KIMATI, H.; BARROS, B. C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.223-229, 2001.

PATRICIO, F. R. A. et al. Avaliação da solarização do solo para o controle de *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 30, n. 5, Oct. 2005

PATRICIO, F. R. A. et al. Efeito da solarização fazer solo, SEGUIDA Pela Aplicação de *Trichoderma* spp. ou de fungicidas, sobre o Controle de *Pythium aphanidermatum* e de *Rhizoctonia solani* AG-4. **Summa Fitopatologia**, Botucatu, v 33, n. 2, Junho de 2007.

PESKE, S. T.; ROSENTHAL, M. D'AVILA. ROTA, G., R., M., **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**, 1a Edição, Pelotas - RS -BRASIL 2003

POMELLA, A. W. V; RIBEIRO, R. T. S Controle biológico com *Trichoderma* los Grandes Culturas - UMA Visão Empresarial. In: Bettiol, W.; Morandi, Mab (Ed). **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.239-244.

POSSE, S. C. P.; SILVA, R. F.; VIEIRA, H. D. Temperatura de armazenamento e desempenho de sementes hidratadas e osmocondicionadas de pimentão. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 38-43, 2004.

Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009.399 p.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D.; Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. No crescimento de fungos fitopatogênicos. Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, **Ciências Agrárias e Engenharia**, Ponta Grossa, 13 (3): 31-36, dez.2007.

RESENDE, L. M.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; PINHO, R. G. V.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, Aug. 2004.

RODRIGUES, D. L.; LOPES, H. M.; SILVA, E. R.; MENSES, B. R. S.; *Embebição, condicionamento fisiológico e efeito do hipoclorito de sódio na germinação de sementes de alface.* , Revista Tropica – **Ciências Agrárias e Biológicas**, V. 6, N.1, pag. 52, 2012.

RUBIO, M. B.; DOMÍNGUEZ, S.; MONTE, E.; HERMOSA, R. Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays, **Microbiology** (2012), 158, 119–128

SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV Viçosa, 2007.

SANTOS, J. F DOS.; ALVARENGA, R. O.; TIMÓTEO, T. S.; CONFORTO, C. E.; FILHO, M. J.; VIEIRA, R. D.; *Avaliação do potencial fisiológico de lotes de sementes de soja*¹ **Revista Brasileira de Sementes** .vol.33 no.4 Londrina 2011

SANTOS, M. C. A.; AROUCHA, E., M., M.; SOUZA, M., S.; SILVA, R. F.; SOUZA, P. A. Condicionamento osmótico de semente, **Revista Caatinga**, vol. 21, num. 2, abril-junio, 2008, pp. 1-6, Universidade Rural federal do Semiárido – Brasil

SANTOS, O. J.; SANTOS, R. M. S.; FERNANDES, A. A.; SOUTO, J. S.; BORGES, M. G. B.; FERREIRA, R. T. F. V.; SALGADO, A. B. Os sistemas alternativos de produção de base agroecológica, **ACSA**. V. 9, n. 1, p. 01-08, jan-mar, 2013

SANTOS, S., R., G.; PAULA, R. C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilho) – euphorbiaceae, **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 1-12, jun. 2007.

SILVA, J. B.; RODRIGUES, T. J. D.; VIEIRA, R. D. Desempenho de sementes de soja submetidas a diferentes potenciais osmóticos em polietilenoglicol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, oct. 2006.

SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. Confecção e avaliação de péletes de sementes de alface, **Horticultura Brasileira**, v. 16, n. 2, nov. 1998.

SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. Metodologia para avaliação da resistência de péletes. **Horticultura Brasileira**, v. 16, n.2, p.118 –122 novembro 1998.

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

SILVA, T. A., **Condicionamento fisiológico de sementes, componentes de produção e produtividade de soja**. Botucatu, SP, UNESP, 2013. 63f. Dissertação (mestrado)-Universidade Estadual paulista – Faculdade de Ciências agrônômicas, Botucatu, 2013.

TENÓRIO, D. A.; ***Rhizoctonia solani*. Diversidade genética e patogênica do feijoeiro no agreste meridional de Pernambuco**, Fevereiro de 2011, RECIFE - PE Pós- Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia. 36 fl.

VILLELA, R., P.; DE SOUZA, R., J.; GUIMARÃES, R. M.; NASCIMENTO, W. M.; GOMES, L. A. A.; CARVALHO, B. O.; BUENO, A. C. R. Produção e desempenho de sementes de cultivares de Alface em duas épocas de plantio, **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 32, nº 1 p.158-169, 2010

VINALE F.; SIVASITHAMPARAM K.; GHISALBERTI E. L.; MARRA R.; BARBETTI M. J.; LI H, W. S. L.; LORITO M (2008) A novel role for *Trichodermas* e condary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 72:80-86

WERNER, E. Y.; LOPES, J. C.; JUNIOR, D. G.; LUBER, J.; AMARAL, J. A. T., Accelerated aging test to evaluate the quality of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst - Brassicaceae) seed physiology. **Idesia** vol.31 no. 1 Arica abr. 2013

YOUSSEF et al, *Rhizoctonia* Caracterização de isolados de associados à queima foliar em Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 6, n. 2, p. 158-165, maio-agosto, 2012

ZHENG, Z.X.; SHETTY, K. Effect of apple pomace-based *Trichoderma* inoculants on seedling vigour in pea (*Pisum sativum*) germinated in potting soil. **Process Biochemistry**, v.34, p.731-735, 1999.

8. ANEXOS

Anexo 1. Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, minerais, vitaminas e colesterol (apresenta dados de composição centesimal da alface).

	Umidade	Energia	Energia	Proteína	Lipídeos	Colesterol	Carboidrato	Fibra alimentar	Cinzas	Cálcio	Magnésio
Descrição dos alimentos	(%)	(kcal)	(kJ)	(g)	(g)	(mg)	(g)	(g)	(g)	(mg)	(mg)
Alface, americana crua	92,7	9	37	0,6	0,1	NA	1,7	1,0	0,3	14	6
Alface, crespa, crua	96,1	11	45	1,3	0,2	NA	1,7	1,8	0,7	38	11
Alface, lisa, crua	95,0	14	58	1,7	0,1	NA	2,4	2,3	0,8	28	9
Alface, roxa, crua	95,7	13	53	0,9	0,2	NA	2,5	2,0	0,7	34	9

Fonte: TabelaTaco, Unicamp, 20

Tabela 2A. Análise de variância dos resultados obtidos do percentual de emergência de plântulas de alfaces (*Lactuca sativa* L.) sadias cultivar “Grand Rapids”. Seropédica, 2013.

FV	GL	SQ	QM	Fc
T_SEMENT	1	6.400000	6.400000	1.182
TRAT	4	694.650000	173.662500	32.061*
T_SEMENT*TRAT	4	4.850000	1.212500	0.224
erro	30	162.500000		
Total corrigido	39	868.400000		
CV (%)	9,38			

* indicam valores do Teste F significativos a 1% (< 0,01) de probabilidade.

Tabela 3A. Análise de variância dos resultados obtidos da porcentagem de sementes infectadas em função dos tratamentos aplicados em sementes de alface cultivar “Grand Rapids”. Seropédica, 2013

FV	GL	SQ	QM	Fc
T_SEMENT	1	9.025000	9.025000	4.945**
TRAT	4	360.350000	90.087500	49.363*
T_SEMENT*TRAT	4	3.850000	0.962500	0.527
erro	30	54.750000	1.825000	
Total corrigido	39	427.975000		
CV (%) =	38,88			

* indicam valores do Teste F significativos a 1% (< 0,01) de probabilidade.

** indicam valores do Teste F significativos a 5% (<0,05) de probabilidade.

Tabela 4A. Análise de variância do percentual de tombamento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivar “Grand Rapids”. Seropédica, 2013.

FV	GL	SQ	QM	Fc
T_SEMENT	1	0.400000	0.400000	0.231
TRAT	4	59.400000	14.850000	8.567**
T_SEMENT*TRAT	4	2.600000	0.650000	0.375
erro	30	52.000000	1.733333	
Total corrigido	39	114.400000		
CV (%) =	77,44			

** indicam valores do Teste F significativos a 5% (<0,05) de probabilidade.

Tabela 5A. Análise de variância dos resultados obtidos de massa seca por parcela nos tratamentos aplicados em plântulas de alface cultivar “Grand Rapids”. Seropédica, 2013

FV	GL	SQ	QM	Fc
T_SEMENT	1	0.000292	0.000292	1.448
TRAT	4	0.004691	0.001173	5.822**
T_SEMENT*TRAT	4	0.000550	0.000138	0.683
erro	30	0.006043	0.000201	
Total corrigido	39	0.011576		
CV (%) =	77,44			

** indica valores do Teste F significativos a 5% (<0,05) de probabilidade.