

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* POR *Trichoderma* spp. E *Pseudomonas* spp. FLUORESCENTE EM TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* L.)**

ZENALDO PORFIRIO-SILVA<sup>1</sup>  
MARTIN HOMECHIN<sup>2</sup>

PORFIRIO-SILVA, Z.; HOMECHIN, M. Controle biológico de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma* spp. e *Pseudomonas* spp. fluorescente em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) *Semina*: Ci. Agr., Londrina, v.14, n.1, p.19-27, mar. 1993.

**RESUMO:** Três isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e dois de *Trichoderma* spp. foram selecionados *in vitro* pelo seu potencial de biocontrole de *Rhizoctonia solani*. Semente de tomateiro *Lycopersicon esculentum* L., cv. AGROCICA 33), tratadas por imersão nas suspensões dessas bactérias ( $1 \times 10^8$  ufc/ml) e fungos ( $2 \times 10^6$  esporos/ml), quando semeadas em solo não esterilizado, previamente infestado com *R. solani*, mostraram aumento significativo na emergência e peso das plantas e diminuição significativa em damping-off. Entretanto nenhum agente biocontrolador foi superior ao tratamento químico em todos os parâmetros avaliados.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizoctonia solani*, *Lycopersicon esculentum*, tratamento de sementes e controle biológico.

## INTRODUÇÃO

Plântulas do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*, L.) apresentam grandes suscetibilidade ao "damping-off" em pré e pós-emergência (HADAR et al. 1979; TOKESHI & CARVALHO, 1980), causado por fungos, como *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp. e *Sclerotium rolfsii*. Após o transplante das mudas no campo, podem ocorrer podridões de raízes e anelamento da região do colo (TOKESHI & CARVALHO, 1980). O fungo *R. solani* possui grande variabilidade genética, identificada pelos grupos de anastomose (BOOSALIS & SCHAREN, 1959; BUTLER, 1980; PARMETER JUNIOR et al. 1969). Um dos métodos eficientes para controlar *R. solani* é através da resistência varietal do hospedeiro, porém é dificultado devido a variabilidade do patógeno (MELO, 1984). Também, o emprego de microrganismos antagonísticos, isolados de solo supressivo a *R. solani*, tem sido estudado através do tratamento de sementes e solo, com bactérias *Pseudomonas* spp. (ELAD et al. 1987; EL-MELEIGI, 1989; HOWELL & STIPANOVIC, 1979; MEW & ROSALES, 1986; WELLER, 1983; WELLER & COOK, 1983) e com fungo *Trichoderma* spp. (CHET & BAKER, 1981, ELAD

et al. 1980; HOMECHIN, 1987, LIFSHITZ et al. 1986). Esses agentes, além de atuarem contra o patógeno, podem promover o crescimento de plantas (GEELS & SCHIPPERS, 1983a; SAVITHIRY & GNINAMANICKAM, 1987; WINDHAM et al. 1986).

A seleção de fungos *Trichoderma* spp. (HADAR et al. 1979) e bactérias *Pseudomonas* spp. (GEELS & SCHIPPERS, 1983b), isolados da rizosfera ou outras partes de plantas, pode ser feita com base na sua habilidade para produzir e excretar substâncias com ação inibitória aos patógenos, em meio de cultura. Segundo WELLER (1988), o modo de ação das bactérias *Pseudomonas* é através da competição por nutrientes liberados e presentes em exsudatos de sementes e raízes, bloqueio dos sítios de penetração e, pela produção de sideróforos e antibióticos, os quais podem restringir a colonização do hospedeiro pelos fitopatógenos sensíveis à supressão de ferro, principalmente nos solos com deficiência desse microelemento (GEELS & SCHIPPERS, 1983a; 1983b; MISAGHI et al. 1982; SAVITHIRY & GNINAMANICKAM, 1987; WELLER, 1988). HOWELL & STIPANOVIC (1979) trabalhando em condições de laboratório, e solo infestado artificialmente com *R. solani*, conseguiram aumento no porcentual de so-

1 - Aluno do curso de Mestrado em Microbiologia - Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina. Bolsita do CNPq.

2 - Departamento de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias - Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina - Paraná - Brasil. Bolsista do CNPq.

brevivência de plântulas de algodão em níveis variáveis, entre 49% e 57%, quando promoveram o tratamento das sementes com a bactéria *P. fluorescens* e com pyrrolnitrin (substância produzida por *P. fluorescens*).

WINDHAM et al. (1986) verificaram o aumento na taxa de emergência e peso seco de raízes de plantas de fumo e tomateiro na ordem de 259% para 318% e de 213% para 275%, respectivamente, através do emprego de *Trichoderma harzianum* e *T. koningii*, para tratamento de sementes que após foram semeadas em solo autoclavado. Fungos do gênero *Trichoderma* spp. têm sido citados na literatura, devido a sua capacidade de parasitar outros fungos, inibindo *Macrophomina phaseolina* (ELAD et al. 1986), *Rosellinia necatrix* (FREEMAN et al. 1980), *R. solani* (HADAR et al. 1979), *Pythium aphanidermatum* (SIVAN, et al. 1984), *Alternaria raphani* and *A. brassicola* (VANNACCI & HARMAN, 1987), *Sclerotium rolfsii* (WELLS et al. 1972). O seu modo de ação pode ser através do entrelaçamento e penetração das hifas dos fitopatógenos, pelo *T. harzianum*, com perfurações provocadas pela ação de enzimas *Beta* - (1-3) gluconase e quitinase (CHET & BAKER, 1981, ELAD et al. 1982, HADAR et al. 1979).

A presente pesquisa teve como objetivos: a. verificar a patogenicidade *R. solani*, isolado de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) cultivado na região do Cerrado (Distrito Federal-Brasil), ao tomateiro através da infestação do solo, em condições de casa-de-vegetação, b. avaliar o efeito do tratamento de sementes com *Trichoderma* e *Pseudomonas*, na emergência e tombamento de plântulas, quando semeadas em solo infestado com *R. solani*; c. avaliar o efeito do tratamento sobre o desenvolvimento das plantas.

## 1 – MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1 – Obtenção de Isolados

#### 1.1.1 – *Rhizoctonia solani* – RS-25.

O isolado RS-25 foi obtido a partir de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.) (BOOSALIS & SCHAREN, 1959), coletadas em área de produção em solo do Cerrado (Distrito Federal-Brasil), e com relatos de elevado índice de plantas doentes. Para tanto, após desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2,5% por três minutos e lavadas em água destilada esterilizada, as sementes foram dispostas em placas de Petri de 90mm, contendo meio de cultura BDA, pH 6.5, e incubadas a 25°C por 48 a 72 horas em câmara BOD (estufa incubadora Fanem, mod. 347FG), com foto-período de 12 horas. A identificação foi baseada na morfologia das hifas e características das colônias em meio BDA, de acordo com BOOSALIS & SCHAREN (1959) e PARMETER JUNIOR et al. (1969). Os isolados foram acondicionados em tubo de ensaio contendo 6ml de meio de cultura BDA, pH 6.5., a 4°C + ou - 2°C, e mantidos em geladeira.

#### 1.1.2 – *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. com capacidade antagonica foram obtidos do sistema radicular de plantas doentes e solo cultivado com hortaliças. Através do método de implante de partes de tecidos de raiz, diluição do solo ( $10^{-9}$  e  $10^{-4}$ ) e plaqueamento em meio de MARTIN (1950), modificado para *Trichoderma* por HOMECHIN (1987) e meio BDA. Para tanto, as placas com meio de MARTIN (1950) foram incubadas em câmara BOD, na ausência de luz, a 25°C, por seis dias (HOMECHIN, 1987). A identificação do fungo *Trichoderma* spp. foi de acordo com RIFAI (1969) baseando-se na morfologia e nas características das colônias, desenvolvidas no meio de Martin modificado. Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio, contendo 6ml de meio de cultura BDA, pH 6.5, a 4°C + ou - 2°C, e conservados em geladeira.

#### 1.1.3 – *Pseudomonas* spp.

Partes de raízes de plantas nativas (reserva ecológica Mata dos Godoy, localizada a 15 Km da cidade de Londrina, estado do Paraná) e hortaliças doentes (tomate, couve-flor, alface, pepino e almeirão) foram lavadas durante uma hora em água corrente para remover o excesso de solo e posteriormente em água destilada esterilizada, maceradas. A seguir, foi acrescido igual volume de solução salina a 0,85%. A suspensão foi transferida para erlenmeyer de 250ml, contendo 100ml de solução salina 0,85% esterilizada e agitada por 30 minutos a 100 rpm, em agitador orbital Fanem (modelo 255-B). A seguir procedeu-se a diluição para  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  e plaqueamento 0,1ml em meio King B (KING et al. 1954) modificado (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5g; MgSO<sub>4</sub>, 1,5g; peptona, 15,0g; glicerol, 10,0g; agar, 15,0g; água destilada, 11), pH 7.2. A esterilização foi feita em autoclave a 120°C por 20 minutos. A incubação deu-se em câmara BOD a 28°C + ou - 1°C. As contagens das colônias foram feitas 24 e 48 horas após. As placas foram analisadas em luz UV-longa (Long-Wave model UVGL-25 MINERLIGH, pertencente ao Laboratório de pesquisa de genética de microrganismos do Centro de Ciências Biológicas da UEL) de acordo com o método de WELLER & COOK (1983). As colônias que possibilitaram fluorescência do meio foram repicadas e mantidas em tubos de ensaio, com meio de cultura King B com 10% de glicerol, à temperatura de 4°C + ou - 2°C.

## 2 – ANTAGONISMO *in vitro*

### 2.1 – *Pseudomonas* spp.

Os isolados de bactérias *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente foram testados nos meios de cultura King B e BDA, sob regime de diferentes temperaturas. A capacidade antagonica foi determinada pelo método de pareamento de culturas (WELLER & COOK, 1983), o qual consistiu da transferência de um disco de 5mm de diâmetro retirado da margem de uma colônia do patógeno RS-25,

desenvolvida durante cinco dias, em BDA, para o centro de placa contendo meio King B ou BDA. Quatro discos de papel de filtro, número 2, esterilizados, com 5mm de diâmetro, foram colocados, a 3cm de distância do disco do patógeno (GEELS & SCHIPPERS, 1983b). Em cada disco de papel, foram pipetados 10  $\mu$ l de suspensão de bactérias ( $2 \times 10^8$  ufc) e a incubação foi em câmara BOD a 28°C + ou - 1°C, durante 72 horas, na ausência de luz. A intervalos de 12 horas, foi avaliado o crescimento do micélio do patógeno. Cada teste foi repetido quatro vezes.

## 2.2 – Com *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp., foram avaliados em meio de BDA e os melhores selecionados de acordo com a capacidade para inibir o patógeno *R. solani* *in vitro*. O método foi o do pareamento de culturas descrito por BELL et al. (1982), em placa de Petri contendo BDA.

Posteriormente os fungos foram incubados em câmara BOD a 25°C, em ausência de luz, durante sete dias. A eficiência do antagonismo foi determinada através de mensuração do crescimento das colônias (testes e controles), em intervalos de 12 horas, e por um período de 72 horas; e plaqueamento de discos retirados da zona de intersecção das colônias dos dois microrganismos em meio de BDA, após o oitavo dia de cultivo com objetivo de avaliar a sobrevivência do patógeno.

## 3 – TRATAMENTO DE SEMENTES E EXPERIMENTOS EM CASA-DE-VEGETAÇÃO

Sementes de tomateiro cv. AGROCICA 33, procedentes de Monte Alto, SP, fornecidas pela CICA S.A., após desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, durante três minutos, lavadas em água destilada esterilizadas e secadas em estufa a 30°C + ou - 1°C, durante uma hora, foram plaqueadas sobre três folhas papel de filtro esterilizado acondicionados em placa de Petri.

Confeitos de *Trichoderma* spp. ( $2 \times 10^6$  ufc/ml) coletados de culturas com sete dias de idade e cultivados em meio BDA, e ressuspensos em meio de cultura líquido. Posteriormente as sementes foram imersas nessa suspensão durante 30 minutos e após mantidas durante uma hora em corrente de ar seco, de acordo com LIFSHITZ et al. (1986). Idêntico procedimento foi dado às sementes quando do tratamento com bactérias *Pseudomonas* spp. grupo fluorescente, na concentração de  $1 \times 10^8$  ufc/ml. O isolado de *Pseudomonas* spp. foi desenvolvido em meio de cultura líquido (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5g; MgSO<sub>4</sub>, 1,5g; peptona, 15,0g; extrato de levedura, 15,0g; glicerol, 10,0g; água destilada, 1l), com pH 7.2. Uma colônia foi repicada do meio sólido para frasco erlenmeyer de 250ml, com meio líquido e incubada a 28°C, durante 24 e 48 horas. A concentração foi ajustada com o próprio meio. As sementes usadas como testemunha foram tratadas com meio de cultura líquido, isento do microrganismos, e no mesmo espaço de tempo.

O tratamento das sementes com *T. harzianum* e *P. fluorescens* quando associado, foi realizado de maneira idêntica à citada anteriormente; obedecendo-se a seguinte ordem: primeiro imersão na suspensão de bactérias e, uma hora após na suspensão de conifeos de *T. harzianum*.

O solo acondicionado em saco plástico preto (200 x 100mm diâmetro) foi infestado através do emprego de sementes de girassol, colonizadas por *R. solani* RS-25. Para tanto, o patógeno RS-25 foi cultivado em meio de cultura BDA, suplementado com 2% de extrato de levedura, durante sete dias, a 25°C + 1°C, de acordo com LIFSHITZ et al. (1986). Posteriormente o conteúdo de uma placa de Petri foi transferido para um frasco erlenmeyer (2 litros), contendo 500g de sementes de girassol suplementados com 200ml de solução de extrato de levedura a 10%. As sementes de girassol foram previamente autoclavadas a 120°C por uma hora, durante dois dias consecutivos. Após a inoculação as sementes foram incubadas durante trinta dias em temperatura ambiente do laboratório (15°C a 25°C). Setenta e duas horas após a infestação do solo, procedeu-se a semeadura, de acordo com cada tratamento. Trezentas sementes de tomate foram semeadas em sacos plásticos (15 sementes/saco), contendo 400g de substrato (solo, areia e esterco de curral curtido, 2:1:1) não esterilizado, com pH 6.0. Determinou-se o índice de emergência de plântulas no quinto e décimo dia após a semeadura, período correspondente ao início e fim de emergência das plântulas. A incidência de tombamento de plântulas foi observada a partir do quinto dia da semeadura até o trigésimo dia, tempo em que o experimento foi concluído. Após esse período, foram coletadas 10 plantas ao acaso, em número de cinco repetições, estas foram lavadas em água de torneira e seccionados o sistema radicular e parte aérea, determinando-se os pesos secos de ambas as partes pelo método da secagem em estufa com ar circulante, durante 72 horas, a 70°C, até peso constante da matéria seca.

Para efeito de análise estatística, foram considerados quatro sacos como um bloco de tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições.

Nas análises de variância, empregou-se o teste F, sendo usado o teste Tukey, citado por GOMES (1987) ao nível de 5%, para a comparação de médias. Para obter a normalidade dos dados, foi feita a transformação dos dados para arco seno raiz quadrada de  $x/100$ .

A porcentagem de aumento de emergência foi determinada pela fórmula (% = média do tratamento/média da testemunha X 100) e a redução do tombamento (% = média da testemunha - média do tratamento/média da testemunha X 100).

## 4 – RESULTADOS

Dos 150 isolados de bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, obtidos de plantas nativas e hortaliças doentes, de acordo com NEW & ROSALES (1986), foram selecionados três isolados de acordo com o halo de inibição do patógeno em meio de cultura

(tabela 1) e identificados com base no manual de Bergey (KRIEG & HOLT, 1984), como *Pseudomonas fluorescens* (Bac-2 e Bac-5) e *P. putida* (Bac-7). Dos 31 isolados do fungo *Trichoderma* spp. obtidos, apenas dois se destacaram em função da sua capacidade antagonista ao patógeno, identificados como *Trichoderma harzianum* Rifai (Tch-2) e *T. konningii* Oud (Tch-4).

#### 4.1 – Teste de Antagonismo de *Pseudomonas* spp. e *Trichoderma* spp. in vitro

Em *in vitro*, as bactérias *Pseudomonas* spp. do grupo

fluorescente foram capazes de inibir o crescimento do patógeno RS-25, nos meios de cultura (BDA e KING B) (Fig. 1), quando incubadas em diferentes temperaturas (Tabela 1). Os isolados do fungo *Trichoderma* spp. controlaram o patógeno RS-25, em meio de cultura BDA, em pHs (4.0, 5.0, 6.0 e 7.0) (Fig. 2), não ocorrendo diferenças entre os resultados obtidos para o plaqueamento de discos retirados na zona de intersecção das culturas do patógeno e antagonista, em meio BDA, aos oito dias de idade. Não sendo constatada a presença do patógeno RS-25.

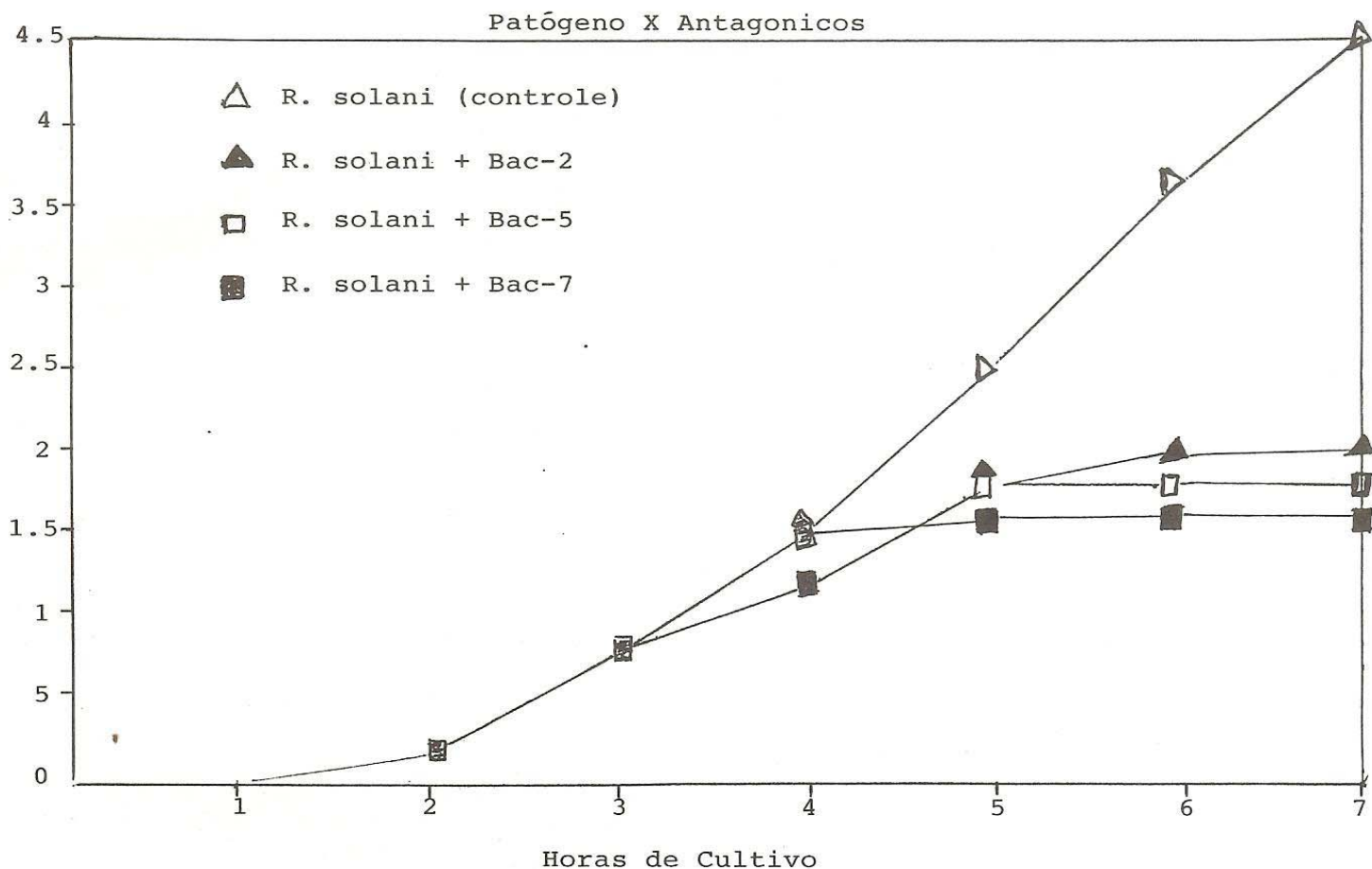


FIGURA 1 – Influência de três isolados de bactérias *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, no desenvolvimento do fungo *R. solani*, em meio de cultura King B, a 25°C (médias de quatro repetições).

Controle do Crescimento Radial do Patógeno

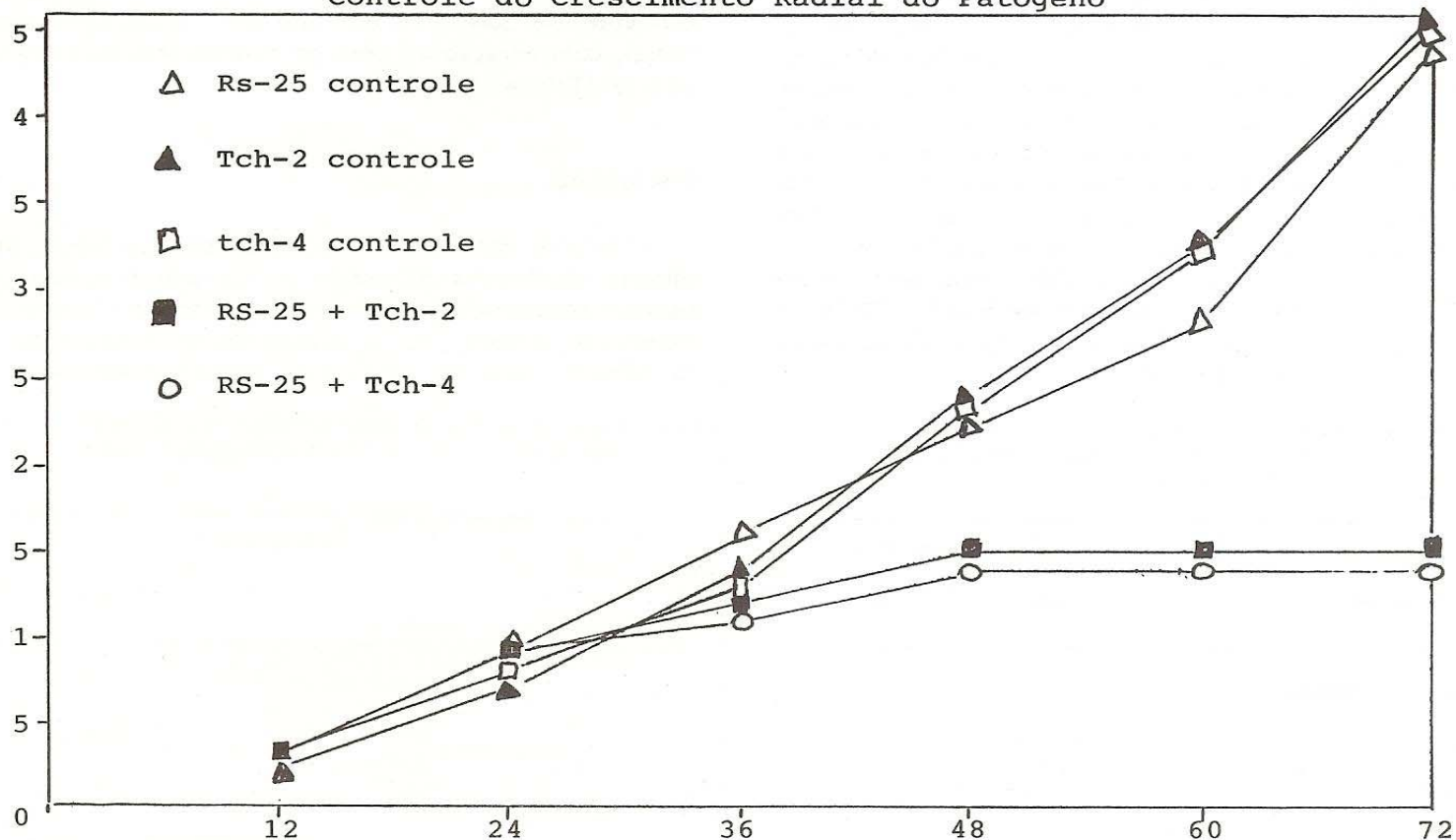


FIGURA 2 – Efeito de dois isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento do fungo *R. solani*, em meio de cultura BDA (médias de quatro repetições).

TABELA 1: INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO *R. SOLANI* POR BACTÉRIAS *PSEUDOMONAS* SPP., NOS MEIOS DE CULTURA KING B (MKB) E BATATA DEXTROSE AGAR (BDA) E DIFERENTES TEMPERATURAS (°C).

Isolados	22°C		25°C		28°C		30°C	
	MKB <sup>a</sup>	BDA	MKB	BDA	MKB	BDA	MKB	BDA
Bac-2	++ <sup>1</sup>	++	++	++	++	++	+	+
Bac-5	+	+	+	+	+	+	+	+
Bac-7	+	++	+	++	+	++	+	++

1. médias de quatro repetições; – = 1 a 5; + = 6 a 10; ++ = 11 a 20, halo de inibição em mm.

4.2 – Tratamento de Sementes de Tomateiro e Semeadura em Casa-de-Vegetação

O isolado de *Trichoderma harzianum* selecionado promoveu aumento significativo ( P = 0.05 ) na emergência das plântulas, quando comparados com a testemunha sem tratamento, e não diferiu do tratamento com o fungo-

cida monceren-euparen (Tabela 2). De acordo com a análise estatística, os tratamentos das sementes com Bac-2, Tch-2, sementes não tratadas (em solo não infestado), Fungicida, Tch-2 e Tch-2+Bac-2 (em solo infestado artificialmente), promoveram aumento da emergência das plântulas de tomateiro em 66.17%, 58,04%, 59.70%, 58.57%, 44.49% e 41.85%, respectivamente, diferindo do tratamento com Bac-2 em solo infestado (Tabela 2).

As análises estatísticas revelaram diferenças significativas (Tukey P = 0.05) entre os tratamentos, para tombamento de plântulas, aos quinze dias após a semeadura, em solo infestado. Os tratamentos com Bac-2, Tch-2 e sementes não tratadas, semeadas em solo não infestado não diferiram estatisticamente, porém, os dois primeiros forneceram proteção total às plântulas, não sendo constatado qualquer sintoma da doença. Os testes feitos com o solo infestado artificialmente com *R. solani* diferiram estatisticamente (P = 0.05). Os melhores resultados, foram obtidos no tratamento com fungicida, seguidos dos tratamentos Bac-2, Bac-2+Tch-2 e Tch-2, que promoveram redução da incidência do patógeno em 53.86%, 43.41% e 12.15%, respectivamente, enquanto o fungicida foi capaz de reduzir 85.57%. (Tabela 2).

TABELA 2: EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATEIRO CV. AGROCICA 33, COM ESPOROS DE *T. HARZIANUM* E BACTÉRIAS *P. FLUORESCENS* NA EMERGÊNCIA E TOMBAMENTO, QUANDO SEMEADAS EM SOLO INFESTADO COM *R. SOLANI*, EM CASA-DE-VEGETAÇÃO.

Tratamentos	Emergência <sup>1</sup>			Tombamento <sup>2</sup>		
	médias (%)	—	aumento (%)	médias (%)	—	redução (%)
<b>solo não infestado</b>						
Bac-2	97.11 <sup>a3</sup>		66.17	0.0 <sup>a</sup>		100.00
Sementes não tratadas	93.33 <sup>ab</sup>		59.70	3.87 <sup>a</sup>		94.61
Tch-2	92.36 <sup>ab</sup>		58.04	0.0 <sup>a</sup>		100.00
<b>solo infestado com <i>R. solani</i> 72 horas antes</b>						
Fungicida	92.67 <sup>ab</sup>		58.57	10.37 <sup>a</sup>		85.57
Tch-2	84.44 <sup>bc</sup>		44.49	63.15 <sup>c</sup>		12.15
Bac-2 + Tch-2	82.90 <sup>bc</sup>		41.85	40.68 <sup>b</sup>		43.41
Bac-2	80.00 <sup>c</sup>		36.89	33.17 <sup>b</sup>		53.86
Sementes não tratadas	58.44 <sup>d</sup>		—	71.89 <sup>c</sup>		—
D.M.S. 5% =	10.97001		—	11.98148		—
C.V.	7.842%		—	21.168%		—

1. médias de cinco repetições aos 10 dias após a semeadura, 2. média de cinco repetições aos 15 dias após a semeadura, 3. médias seguidas por letras distintas dentro das colunas, diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste Tukey.

#### 4.3 -- Tratamento de Sementes com Microrganismos e Desenvolvimento das Plantas em Casa-de-Vegetação

O tratamento das sementes com suspensão de esporos do fungo *Trichoderma harzianum* e/ou bactérias *Pseudomonas fluorescens*, promoveu aumento significativo sobre o desenvolvimento das plantas de tomateiro (Tabela 3). Em solo não infestado com o patógeno, o isolado de *T. harzianum* Tch-2 promoveu o maior aumento do peso úmido da parte aérea e sistema radicular bem como do peso da matéria seca da parte aérea. O isolado *P. fluorescens* Bac-2 também se mostrou efetivo (Tabela 3). Em solo infestado com o patógeno (RS-25), o isolado *P. fluorescens* Bac-2 promoveu maior aumento do peso úmido do sistema radicular (Tabela 3). O tratamento com suspensão de esporos *T. harzianum* Tch-2 apresentou aumento signifi-

cativo em comparação ao tratamento com fungicida (Tabela 3). O tratamento das sementes com Bac-2+Tch-2, não diferiu estatisticamente do tratamento com fungicida (monceren-euparen) quanto ao aumento de peso das partes das plantas, com exceção do peso da matéria seca do sistema radicular (Tabela 3).

#### DISCUSSÃO

Como o isolado de *R. solani* obtido de sementes de feijoeiro produzidas na região do Cerrado brasileiro se mostrou patogênico ao tomateiro na fase de plântula, é importante ressaltar que a cultura do tomateiro após a do feijoeiro deve ser implantada sempre levando-se em

conta a utilização de medidas preventivas, sendo uma destas o tratamento de sementes.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o tombamento de plântulas de tomateiro por *R. solani* RS-25 (Tabela 3), poderá ser controlado através da microbiolização das sementes, por eficientes e selecionadas bactérias *Pseudomonas fluorescens* e fungo *Trichoderma harzianum* ou pela interação de ambos.

O tratamento das sementes com suspensão de células (fúngicas e bacterianas) foi o melhor para emergência das plântulas de tomateiro, individualmente, ou na combinação fungo e a bactéria. Quando as sementes foram tratadas com conídios de *T. harzianum*, verificou-se um aumento do peso úmido e seco da parte aérea, quando comparado aos demais tratamentos. Com exceção a testemunha, o tratamento com Bac-2 propiciaram aumento

**TABELA 3: PESO DA MATÉRIA SECA E ÚMIDA DA PARTE AÉREA E DO SISTEMA RADICULAR DE PLANTAS DE TOMATEIRO CV. AGROCIÇA 33, OBTIDAS A PARTIR DE SEMENTES TRATADAS COM ESPOROS DE *T. HARZIANUM* E *P. FLUORESCENS* E SEMEADAS EM SOLO INFESTADO E NÃO COM *R. SOLANI* EM CASA-DE-VEGETAÇÃO, AOS 30 DIAS DE IDADE.**

Tratamentos	peso úmido		peso seco	
	aérea (g)	raízes (g)	aérea (g)	raízes (g)
<b>Solo não infestado</b>				
Tch-2	7.899 <sup>a1</sup>	1.598 <sup>ab</sup>	0.406 <sup>ab</sup>	0.084 <sup>bc</sup>
Bac-2	6.132 <sup>abc</sup>	1.340 <sup>ab</sup>	0.348 <sup>bc</sup>	0.111 <sup>abc</sup>
Sementes não tratadas	4.387 <sup>cd</sup>	1.113 <sup>b</sup>	0.209 <sup>d</sup>	0.055 <sup>c</sup>
<b>Solo infestado com <i>R. solani</i> 72 horas antes</b>				
Tch-2	6.124 <sup>abc</sup>	1.484 <sup>ab</sup>	0.399 <sup>abc</sup>	0.148 <sup>abc</sup>
Bac-2	5.793 <sup>bcd</sup>	1.942 <sup>ab</sup>	0.336 <sup>bc</sup>	0.177 <sup>ab</sup>
Bac-2 + Tch-2	4.240 <sup>cd</sup>	1.088 <sup>b</sup>	0.291 <sup>cd</sup>	0.167 <sup>ab</sup>
Fungicida	3.870 <sup>d</sup>	0.983 <sup>b</sup>	0.195 <sup>cd</sup>	0.052 <sup>c</sup>
Testemunha	7.866 <sup>a</sup>	2.308 <sup>a</sup>	0.472 <sup>a</sup>	0.186 <sup>a</sup>
D.M.S. 5% =	1.9944	1.0019	0.1104	0.0999
C.V.	16.288%	31.855%	15.613%	35.643%

1. médias seguidas por letras distintas dentro das colunas, diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste de Turkey.

do peso da matéria seca, mesmo em solo infestado com o patógeno. Além da proteção conferida à planta pelos microrganismos, alguns autores sugerem que determinados gêneros e espécies de microrganismos podem induzir aumento no crescimento de plantas, principalmente as bactérias *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente (BURR & CAESAR, 1985; MEW & ROSALES, 1986; WELLER & COOK, 1983) e fungos do gênero *Trichoderma* spp. (WINDHAM et al 1986). Eles atuam através de fatores que regulam a germinação das sementes e o crescimento total (MELO, 1991) ou sobre raízes e/ou parte aérea (BURR & CAESAR, 1985).

Os tratamentos com combinações dos dois antagônicos não se mostraram tão eficazes na emergência quando comparados aos demais tratamentos biológicos. Essa situação pode ser explicada pelo fato do isolado *P. fluorescens* possuir ação inibitória no crescimento do fungo *T. harzianum*, em ambos os meios de cultura empregados. BIN et al. (1991), também constataram que um isolado de *P. fluorescens* inibiu o crescimento do fungo *T. harzianum* *in vitro* e, WELLER (1988) relata a inibição em meio

BDA, rico em ferro. Verificaram ainda aqueles autores, a existência da produção de um pigmento com capacidade antibiótica (phenazine-1-carboxylic acid (PCA), também demonstrada por THOMASHOW et al. (1980), em raízes de trigo colonizadas por bactérias *Pseudomonas* sp., em solo natural. Em meio King B esses mesmos autores verificaram a formação de pequeno halo de inibição. A antibiose tem sido demonstrada por constituir-se em importante mecanismo de antagonismo de bactéria *Pseudomonas* sp. (TOMASHOW et al. 1980), enquanto que o fungo *Trichoderma* pode controlar o fitopatógeno através de parasitismo (ELAD et al. 1983) e produção de metabólitos (CLAYDON et al. 1987; LIFSHITZ et al. 1986). A combinação de tratamentos com microrganismos benéficos, aplicados as sementes, em determinadas situações pode anular o efeito individual, segundo KWOR et al. (1987).

Ficou demonstrado que o emprego de mais de um microrganismo no controle de *R. solani* é possível, entretanto são necessários mais estudos sobre a interação entre as duas espécies antagônicas e, maior conhecimento das substâncias por elas excretadas.

PORFIRIO-SILVA, Z.; HOMECHIN, M. Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma* spp. and by fluorescent *Pseudomonas* spp in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.14, n.1, p.19-27 Mar., 1993.

**ABSTRACT:** *The biological control of Rhizoctonia solani by the use of Trichoderma harzianum and Pseudomonas fluorescens was studied in laboratory and greenhouse conditions. Tomato seeds (Lycopersicon esculentum L., cv. AGROCICA 33), were inoculated by dipping them in an inoculum suspension of isolates of Pseudomonas spp. (1 x 10<sup>8</sup> ufc/ml) and Trichoderma spp. (2 x 10<sup>6</sup> spores/ml). These seeds were sown unsterilized soil previously (72 h) inoculated with an isolate of R. solani RS-25. The pathogen inoculum, R. solani RS-25 growth obtained in sunflower seeds was utilized. During 30 days from sowing, seedling emergence and development, damping-off incidence and R. solani pathogenicity degree were evaluated. At 10 days, the emergence rate in the control treatment was of 58,44%, while the treatment with the antagonistic organisms increased seedling emergence, as well as decreased to the damping-off incidence in 12.15% to 68,81% as compared to the inoculated check.*

**KEY-WORDS:** *Trichoderma spp., Pseudomonas spp., Rhizoctonia solani, Lycopersicon esculentum, seeds treatment and biological control.*

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHABELL, D.K.; WELLS, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, v. 72, p.379-382, 1982.
- BIN, L.; KNUDSEN, G.R.; ESCHEN, D.J. Influence of an antagonistic strain of *Pseudomonas fluorescens* on growth and ability of *Trichoderma harzianum* to colonize sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Phytopathology*, v.81, p.994-1000, 1991.
- BOOSALIS, M.G.; SCHAREN, A.L. Methods for microscopic detection of *Aphanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* and for isolation of *Rhizoctonia* associated with plant debris. *Phytopathology*, v.49, p.192-198, 1959.
- BURR, T.J.; CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. CRC Critical Reviews in Plant Sciences. Boca Raton., v.2, n.1, p.1-20, 1985.
- BUTLER, E.E. A method for long-time culture storage of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.70, p.820-821, 1980.
- CHET, I.; BAKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.71, p.286-290, 1981.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R.; AVENT, G.A. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v.88, p.503-513, 1987.
- ELAD, Y.; CHET, I.; BAKER, R. Increased growth response of plants induce by rhizobacteria antagonistic to soilborne pathogenic fungi. *Plant and Soil*, v.98, p.325-330, 1987.
- ELAD, Y.; CHET, I.; BOYLE, P.; HENIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfii* - Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, v.73, p.85-88, 1983.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.*, v.28, p.719-725, 1982.
- ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum*. A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfii* and *Rhizoctonia solani solani*. *Phytopathology*, v.70, p.119-121, 1980.
- ELAD, Y.; ZVIELI, Y.; CHET, I. Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid by *Trichoderma harzianum*. *Crop. Protec.*, v.5, p.288-292, 1986.
- EL-MELEIGI, M.A. Effect of soil *Pseudomonas* isolates applied to corn, sorghum and wheat seeds on seedling growth and corn yield. *Can. J. Plant Sci.*, v.69, p.101-108, 1989.
- FREEMAN, S.; SZTEJNBERG, A.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. *Plant and Soil*, v.94, p.163-170, 1980.
- GEELS, F.P.; SCHIPPERS, B. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopath. Z.*, v.108, p.207-214, 1983a.
- GEELS, F.P.; SCHIPPERS, B. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopath. Z.*, v.108, p.193-206, 1983b.
- GOMES, F.P. *Curso de Estatística Experimental*. 12. ed. São Paulo: Nobel, 1987. 467p.
- HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, v.69, p.64-68, 1979.
- HOMECHIN, M. Potencial e emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum* para o controle de patógenos de soja (*Glycine max*, L.). Piracicaba, 1987. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".
- HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. Control *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, v.69, p.480-482, 1979.



- KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, v.44, n.2, p.301-307, 1954.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1.
- KWOR, O.C.H.; FARY, P.C.; HOITINK, H.J.; KUTER, G.A. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia solani* Damping-off in bark compst media. *Phytopathology*, v.77, p.1206-1212, 1987.
- LIFSHITZ, M.T.; WINDHAM, M.T.; BAKER, R. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, v.76, p.720-725, 1986.
- MARTIN, J.P. Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, Baltimore, v.134, p.1528-1529, 1950.
- MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. IN: BETTIOL, W. (org) *Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Piracicaba: EMBRAPA/CNPDA, 1991, cap.9, p.135-156.
- MELO, P.C.T. de *Genes maiores condicionando resistência a doenças fúngicas do tomateiro (Lycopersicon esculentum Mill)*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1984. p.32.
- NEW, T.W.; ROSALE, A.M. Bacterization of rice plants for control os sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* v.76, p.1260-1264, 1986.
- MISAGHI, I.J.; STOWELL, L.J.; GROGAN, R.G.; SPEARMAN, I.C. Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, v.72, p.33-36, 1982.
- PARMETER JUNIOR, J.R.; SHERWOD, R.T.; PLATT, W.D. Anastomosis gronping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, v.59, p.1270-1278, 1969.
- RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, n.116, p.1-156, 1969.
- SAVITHIRY, S.; GNINAMANICKAM, S.S. Bacterization of peanut with *Pseudomonas fluorescens* for biological control of *Rhizoctonia solani* and for enhanced yield. *Plant and Soil*, v.102, p.11-15, 1987.
- SIVAN, A.; ELAD, Y.; CHET, I. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology*, v.74, p.498-501, 1984.
- TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T. de. Doenças do Tomateiro In: GALLI, F. (coord). *Manual de Fitopatologia*. 2. ed. São Paulo: Agron. Ceres, 1980. Cap.15, p.511-552.
- THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M.; BONSALE, R.F.; PIERSON, L.S., III. Production of antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, p.908-912, 1990.
- VANNACCI, G.; HARMAN, G.E. Biocontrol of seed-borne *Alternaria raphane* and *A. brassicicola*. *Can. J. Microbiol.*, v.38, p.850-856, 1987.
- WELLER, D.M. Colonization of wheat roots by a fluorescent *Pseudomonas* suppressive to take-all. *Phytopathology*, v.75, p.1548-1553, 1983.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 26, p.379-407, 1988.
- WELLER, D.M., COOK., R.J. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent *Pseudomonads*. *Phytopathology*, v.73, p.463-469, 1983.
- WELLS, H.D., BELL, D.K.; JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, v.62, p.442-447, 1972.
- WINDHAM, M.T.; ELAD, Y.; BAKER, R.A. mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, v.76, p.518-521, 1986.

Recebido para publicação em 14/07/92