

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Tratamento químico e biológico para o controle de *Pythium* sp. em mudas
de violeta (*Saintpaulia ionantha*)**

Cláudia Elizabeth Barendse

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção
do título de Bacharel em Engenharia Agrônômica

Piracicaba
2014

Cláudia Elizabeth Barendse

**Tratamento químico e biológico para o controle de *Pythium* sp. em mudas
de violeta (*Saintpaulia ionantha*)**

Orientador:

Prof. Dr. José Otávio Machado Menten

Supervisora:

Maria Heloisa Duarte de Moraes

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Agrônômica

Piracicaba

2014

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho a minha família, em especial
aos meus pais Geraldo Barendse e Carla Barendse
que sempre me apoiaram e me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter iluminado meu caminho nesta etapa da minha vida e por tudo que tem me acontecido até o momento.

Aos meus pais pelo apoio, confiança, amor e incentivo durante esta caminhada. E por estar sempre ao meu lado quando mais preciso.

Aos meus irmãos e melhores amigos pelo incentivo, apoio e carinho nesta fase.

Ao Prof. José Otávio Machado Menten, pela orientação e experiência transmitida.

A Maria Heloisa Duarte de Moraes, pela especial atenção, paciência, orientação e experiência transmitida.

A República BAO, que durante meus cinco anos de graduação estiveram sempre ao meu lado me apoiando e dando força. Uma grande família que posso contar sempre.

A Patrícia Kreycki, pela companhia, ajuda e experiência transmitida durante esta caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Patologia de Sementes, Luis Claudio Sturion, Ana Cláudia Dognini, Mariane Ishizuka e Natalia Vanessa Mendez Urbano, pela ajuda durante a realização do experimento, companhia, distração e risadas no laboratório.

Ao Prof. Nelson Sidnei Massola Junior pela ajuda durante o experimento.

Fernanda Yeda Bassa Groppo pela ajuda e conhecimentos transmitidos durante a realização do experimento.

A equipe do sítio Del Rey pela ajuda na realização do experimento.

A Empresa Koppert por aceitar essa oportunidade.

Ao Dr. Eduardo Feichtenberger, Pesquisador Científico e Fitopatologista, do Laboratório de Sanidade Vegetal “Dra. Victoria Rossetti”, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, pela ajuda com a identificação do isolado.

A Stella, amiga e companheira que sempre está ao meu lado dando todo seu apoio.

A minha avó por seu amor, carinho e preocupação.

A todos do Departamento de Fitopatologia que contribuíram para realização do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este experimento desse certo.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Agronegócio de Flores e Plantas Ornamentais	15
3.2. Cultivo de Violeta-africana (<i>Saintpaulia ionantha</i>)	16
3.3. O gênero <i>Pythium</i>	20
3.3.1. Métodos de Manejo	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Obtenção do Isolado	23
4.2. Fungicidas	23
4.3. Identificação do fungo	24
4.4. Teste de Patogenicidade.....	25
4.5. Testes <i>in vitro</i>	25
4.5.1. Método de Pareamento com <i>Trichoderma harzianum</i>	25
4.5.2. Avaliação da Sensibilidade a Fungicidas	26
4.6. Teste <i>in vivo</i>	28
4.6.1. Enraizamento	29
4.6.2. Porcentagem de brotação a partir das folhas	29
4.6.3. Quantidade de mudas formadas por tratamento	30
4.6.4. Porcentagem de folhas infectadas com <i>Pythium</i> sp.....	30
4.6.5. Análise dos Dados	31

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Identificação do Fungo	32
5.2. Teste de Patogenicidade.....	33
5.3. Testes <i>in vitro</i>	34
5.3.1. Método de Pareamento com <i>Trichoderma harzianum</i>	34
5.3.2. Avaliação da Sensibilidade de <i>Pythium</i> sp. a Fungicidas.....	36
5.4. Teste <i>in vivo</i> : Enraizamento, porcentagem de brotações formadas a partir das folhas, porcentagem de folhas infectadas com <i>Pythium</i> sp. e quantidade de mudas formadas, por tratamento	39
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Violeta-africana (<i>Saintpaulia ionantha</i>)	17
Figura 2 - Etapas realizadas para formação de mudas.....	19
Figura 3 - Ciclo do <i>Pythium</i> sp. Fonte: Manual de Fitopatologia (2011).....	20
Figura 4 - Escala de avaliação do enraizamento (Notas 1 a 5 equivalem a 100%, 75%, 50%, 25% e 0% do enraizamento).....	29
Figura 5 - Bandeja com as mudas já prontas para o repique.	30
Figura 6 - Bandeja com folhas infectadas com <i>Pythium</i> sp.....	30
Figura 7 - Folha infectada com <i>Pythium</i> sp.	31
Figura 8 - Pedacos de folhas de violeta com discos de micélio de <i>Pythium</i> sp.....	32
Figura 9 - Esporângio de <i>Pythium</i> sp.....	32
Figura 10 - Vaso de violeta com inserção do micélio no fermento.....	33
Figura 11 - Vaso de violeta com suspensão do micélio do fungo inoculado no substrato.	33
Figura 12 - Vaso de violeta sem inoculação (Testemunha).....	34
Figura 13 - Método de cultura pareada com <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Pythium</i> sp. no dia da segunda avaliação após 6 dias da instalação do experimento. (Esquerda: <i>Trichoderma</i> spp., Direita: <i>Pythium</i> sp.).....	35
Figura 14 - Método de cultura pareada com <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Pythium</i> sp. no dia da primeira avaliação, após 4 dias da instalação do experimento. (Esquerda: <i>Trichoderma</i> spp., Direita: <i>Pythium</i> sp.).....	35
Figura 15 - Método de cultura pareada com <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Pythium</i> sp. no dia da terceira avaliação após 10 dias da instalação do experimento. (Esquerda: <i>Trichoderma</i> spp., Direita: <i>Pythium</i> sp.).....	35
Figura 16 - Inibição do crescimento micelial (%) <i>in vitro</i> de <i>Pythium</i> sp., por 8 fungicidas, em diferentes concentrações (mg/L).	37
Figura 17 – Folhas de violeta-africana enraizadas após aplicação de diferentes fungicidas....	40
Figura 18 - Brotação das folhas de violeta-africana com aplicação de 8 fungicidas.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de fungicidas avaliados no experimento para o controle de <i>Pythium</i> sp...	24
Tabela 2 - Escala modificada de EDGINGTON et. al. (1971).....	28
Tabela 3 - Doses utilizadas na irrigação em casa de vegetação.	29
Tabela 4 - Resultado do teste de pareamento <i>in vitro</i>	34
Tabela 5 - Fungicidas e respectivas equações de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI50) e 100% (CI100) do crescimento micelial de <i>Pythium</i> sp.....	36
Tabela 6 - Porcentagem de brotação, quantidade de mudas produzidas e porcentagem de folhas infectadas com <i>Pythium</i> sp. por tratamento.	39
Tabela 7 - Porcentagem de enraizamento das folhas nos diferentes tratamentos.....	40

RESUMO

O mercado de flores e plantas ornamentais vem se expandindo, destacando-se pelo seu elevado emprego de mão de obra e investimento de capital por área. A violeta-africana (*Saintpaulia ionantha*) é uma planta de pequeno porte e fácil de ser cultivada, sua propagação pode ser sexuada, por sementes, ou assexuada, por micropropagação ou estaquia. Neste trabalho a propagação foi realizada de forma assexuada por estaquia de folhas. Um grande problema no seu cultivo é o aparecimento de doenças, como a podridão de raízes provocada pelo gênero *Pythium*, que ocorre principalmente em solos encharcados. O patógeno é um fungo oomiceto, caracterizado pela formação de zoósporos biflagelados a partir dos esporângios. Como forma de controle desse patógeno pode-se citar o químico, biológico e cultural. Uma das formas de controle químico é a aplicação de fungicidas na planta, já o controle biológico pode ser feito com a utilização de antagonistas, por exemplo, o *Trichoderma* spp., fungo que libera substâncias capazes de inibir o crescimento do patógeno. Este trabalho teve por objetivo avaliar as consequências do controle químico e biológico no processo de formação de mudas de violeta-africana em casa de vegetação, com a aplicação de 8 fungicidas e um produto biológico, deste modo foi possível verificar se houve influência dos produtos sobre o desenvolvimento das plantas. Em laboratório foram realizados testes para avaliar a sensibilidade *in vitro* de *Pythium* sp. a fungicidas, e avaliar o desenvolvimento de *Trichoderma harzianum* sobre o desenvolvimento de *Pythium* sp. Para avaliação da influência que Fosetyl-Al, Cloridrato de Propamocarbe, Metalaxil M+Mancozebe, Metiram+Piraclostrobina, Dimetomorfe, Cimoxanil+Mancozebe, Clorotalonil, Cloridrato de Propamocarbe + Fluopicolide e *Trichoderma harzianum* apresentaram sobre o desenvolvimento de mudas de violeta-africana, foi realizado o plantio de folhas da variedade Colorado e avaliado o enraizamento, a porcentagem de brotação, quantidade de mudas produzidas e porcentagem de folhas infectadas com o patógeno. Para avaliação da sensibilidade *in vitro* de *Pythium* sp. a fungicidas, foram utilizados 8 ingredientes ativos em diferentes doses e 5 repetições. A partir da porcentagem de inibição do crescimento micelial foi estimado os valores de concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e 100% (CI₁₀₀). A interação de *Pythium* sp. com *Trichoderma harzianum* foi avaliado de acordo com o método de cultura pareada descrito por Dennis & Webster (1971). Não houve diferença estatística com relação a porcentagem de brotação e folhas infectadas com *Pythium* sp., mas com relação ao enraizamento e a quantidade de mudas produzidas o Fosetyl-Al e Cloridrato de Propamocarbe

apresentaram os melhores resultados com 100% de enraizamento e 132 e 131 mudas produzidas respectivamente. *In vitro* os ingredientes ativos Cloridrato de Propamocarbe, Cloridrato de Propamocarbe + Fluopicolide, Metalaxil-M + Mancozebe e Cimoxanil + Mancozebe foram capazes de reduzir o crescimento micelial. O *Trichoderma harzianum* pode ser considerado um produto eficiente no controle de *Pythium* sp.

Palavras chave: Fungicidas, *Trichoderma harzianum*, casa de vegetação, *in vitro*.

ABSTRACT

The market of flowers and ornamental plants is expanding, especially for the high employment of labor and the capital investments by area. The African-Violet (*Saintpaulia ionantha*) it's a small plant and easy to cultivate, the propagation can be sexed by seeds, or asexual, by micro propagation or cuttings. In this project the spread was held asexually by leaf cuttings. One of the biggest problems in the Violet's cultivation is the emergence of diseases, like the rottenness of the roots caused by *Phytium*, that occurs primarily on wet soils. The pathogen is a oomycete fungus, characterized by the formation of biflagellate zoospores from the sporangia. In order to control this pathogen it's used chemical control, biological or cultivation. One way to control this disease is by chemical fungicide application, as biological control can be done with the use of antagonists, for example, the *Trichoderma* spp., it's a fungus that release substances able to inhibit the growth of other individual. This project aimed to evaluate the consequences of chemical control and biological control on the process of seedlings formation of African-violets inside the greenhouse, which was received applications of 8 fungicides and a biological product, in this way it was possible to determinate whether there was influence of the products on the plant development. On the laboratory it was done tests to evaluate the sensibility of *Phytium* sp. *in vitro* to fungicides, and also to evaluate the growth of *Trichoderma harzianum* over the growth of *Phytium* sp. For evaluation of the influences that Fosetyl-Al, Cloridrato of Propamocarbe, Metalaxil M+Mancozebe, Metiram+Piraclostroina, Dimetomorfe, Cimoxanil+Mancozebe, Clorotalonil, Cloridrato of Propamocarbe + Fluopicolide e *Trichoderma harzianum* had on the seedling development of African-violet, were planted leafs cuttings of the Colorado variety on the greenhouse and then appraised the roots increased, the percentage of sprouting, the amount of seedlings that had been produced and the percentage of infected leafs with the pathogen. To evaluate the *in vitro* sensibility of *Phytium* sp. to fungicides were used 8 actives ingredients in different doses and 5 repetitions. The values of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) and 100% (IC₁₀₀) were estimated based on the percentage inhibition of the mycelial growth. The integration of *Phytium* sp. with *Trichoderma harzianum* was evaluated according with the paired culture method described by Dennis & Webster (1971). There was no statistical difference between the percentage of sprouting and the infected leafs with *Phytium* sp., but in relation of the increasing of roots and the quantity of seedling produced the Fosetyl-Al and Cloridrato of Propamocarbe showed the best results with 100% of roots, 132 and 131 seedlings produced, respectively. *In vitro* the actives ingredients Cloridrato of Propamocarbe, Cloridrato

de Propamocarbe + Fluopicolide, Metalaxil-M + Mancozebe and Cimoxanil + Mancozebe were able to reduce the mycelial increasing. The *Trichoderma harzianum* can be an efficient product on the *Phytium* sp. control.

Key words: Fungicides, *Thricorderma harzianum*, greenhouse, *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

O mercado de flores e plantas ornamentais vem crescendo muito, destacando-se pelo elevado emprego de mão de obra e investimento de capital por área, utilizando uma pequena área e tendo um rápido ciclo de produção. Durante os últimos anos, no Brasil houve um aumento no volume de movimentação financeira e da demanda interna e exportada. Sendo um país que abrange grande diversidade de produtos, como, flores de corte e vaso, bulbos, folhagens, substrato, árvores e arbustos (SMORIGO, 2000), com uma grande variedade de espécies, entre elas, a violeta-africana (*Saintpaulia ionantha*), uma planta muito popular em todo o Brasil, que apresenta uma grande variedade de espécies disponíveis para comercialização. É uma planta tropical, de pequeno porte, pertencente à família *Gesneriaceae*; esta pode ser propagada de forma vegetativa por estaquia, micropropagação ou via semente (SOARES JÚNIOR, 2008). O método mais comum utilizado para a propagação da violeta-africana é por estaquia de folhas; segundo Salgado apud Pereira (2012) esta é uma forma de propagação possível, pois a folha tem capacidade de se regenerar, sendo que quando cortadas e colocadas em condições favoráveis, dá origem a uma nova planta com as mesmas características genéticas.

Uma grande dificuldade para a produção de mudas de violeta-africana é a ocorrência de doenças, que podem causar grandes prejuízos para a cultura, como impedir o enraizamento das folhas, consequentemente não havendo brotação e formação de novas mudas. *Pythium* spp., fungo oomiceto caracterizado pela formação de zoósporos biflagelados, os quais são formados dentro ou a partir dos esporângios, é um grande causador desse tipo de perda; pois é um habitante de solo, e ataca partes subterrâneas da planta ou próximas do solo, causando a podridão de raízes e do colo da planta (KRÜGNER & BACCHI, 1995).

Como formas de controle de doenças radiculares causadas por *Pythium* spp. pode-se citar os controles químico, biológico e cultural. Pelo fato de o controle químico ser um método rápido, é muito eficiente para o controle de patógenos radiculares, pois este tipo de doença pode ocasionar mudança no desenvolvimento da planta, levando a sua morte. O uso de fungicidas é considerado um dos melhores métodos, sendo prático, e de baixo custo nas aplicações, o qual pode ser via água de irrigação ou associada ao tratamento de sementes. Os agrotóxicos podem ser aplicados às plantas por pulverização, incorporação de substrato, aplicação no sulco ou aplicações em faixa sobre a fileira (SALES JR., 2005).

O controle biológico é definido como sendo “a redução da soma do inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem” (COOK & BAKER, 1983 apud MARIANO et al., 2005). O mecanismo do controle biológico se baseia em relações antagônicas, como a competição, amensalismo, predação e parasitismo. *Trichoderma* spp. é um exemplo de amensalismo, pois libera uma substância que impede o desenvolvimento do outro (SAITO, 2009).

Segundo Maffia & Mizubuti (2005) os resultados obtidos com a utilização de controle químico são imediatos, já com o controle biológico são de médio e longo prazo, mas o químico é mais agressivo ao meio ambiente que o biológico. Se utilizar o agrotóxico de forma inadequada pode causar grande impacto no meio ambiente, como desequilíbrio das populações microbianas do solo, contaminação de rios e do lençol freático (SALES JR., 2005). Os fungicidas podem ainda ter um efeito fitotóxico sobre a planta, impedindo que ela se desenvolva.

Diante disto este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito, *in vitro*, dos fungicidas e do produto a base de *Trichoderma harzianum* sobre o desenvolvimento de *Pythium* sp., para verificar se estes controlam o fungo causador de doenças radiculares na violeta-africana; comparar o efeito desses tratamentos durante a produção de mudas de violeta em seu desenvolvimento radicular, brotação, quantidade de mudas produzidas e porcentagem de folhas infectadas.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o efeito, *in vitro*, de *Trichoderma harzianum* sobre o desenvolvimento de *Pythium* sp.
- Avaliar o efeito, *in vitro*, dos fungicidas sobre o desenvolvimento de *Pythium* sp.
- Comparar, *in vivo*, o efeito dos tratamentos químico e biológico na produção de mudas de violeta-africana no enraizamento, brotação, quantidade de mudas produzidas e porcentagem de folhas infectadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Agronegócio de Flores e Plantas Ornamentais

O agronegócio de flores e plantas ornamentais no Brasil está se expandindo devido, principalmente, às condições climáticas favoráveis a cultivos de flores de clima tropical e temperado. Este setor abrange uma grande diversidade de produtos, como o cultivo de flores de corte, frescas ou secas, flores e plantas em vasos, folhagens, bulbos estacas, alporques, substratos de enraizamento e condução da muda, enxertos, arbustos e árvores de grande porte. A floricultura está presente em todas as regiões do Brasil, mas o estado de São Paulo é o maior produtor, consumidor e exportador de flores e plantas ornamentais (FRANÇA & MAIA, 2008).

Segundo Junqueira e Peetz (2014) no período de 2000 a 2008 o Brasil apresentou recordes sucessivos nas exportações de flores e plantas ornamentais, com elevação de seus resultados de US\$ 11,97 milhões, em 2000, para 35,5 milhões, em 2008; já em 2013 houve uma redução das exportações brasileiras, decaindo 8,43% em relação ao total exportado em 2012, fechando com um valor global de US\$ 23,81 milhões. As importações de produtos como, bulbos, rizomas, tubérculos, mudas de plantas e flores de corte frescas, tiveram um aumento. Por exemplo, as mudas de orquídeas importadas tiveram um aumento de 21,05% em relação a 2012. Esse aumento é explicado por diversos fatores favoráveis observados na economia nacional, como emprego, renda, ocupação e a estabilidade econômica do País, que vem sustentando um consumo mais diversificado dessas mercadorias.

O principal mercado para a floricultura brasileira é o interno, pois apresenta um grande potencial de expansão para o sucesso econômico e empresarial futuro (JUNQUEIRA & PEETZ, 2008). Já o mercado externo demanda a produção de várias espécies, conferindo uma boa oportunidade de conseguir uma parte do mercado internacional (FRANÇA & MAIA, 2008), sendo que o produto é comercializado no exterior a partir de grandes centros atacadistas (distribuidores).

Uma das grandes dificuldades para expansão deste agronegócio é o baixo consumo per capita, pois para a população o consumo de flores e plantas está muito restrito a alguns eventos como casamentos, funerais, eventos especiais, entre outros. Outros fatores que dificultam essa expansão é o número reduzido de floriculturas no país, contribuindo para a redução das vendas, pois o acesso da população ao produto é restrito; transporte inadequado, impedindo que o padrão de qualidade do produto seja mantido, sendo necessário, muitas

vezes utilização de caminhões com câmara fria, por exemplo; e a infraestrutura aeroportuária, que também necessita da utilização de câmaras frias (FRANÇA & MAIA, 2008).

No mercado de flores há uma grande riqueza de espécies, dentre elas flores tropicais como antúrio (*Anthurium andraeanum*), strelitzia (*Strelitzia* spp.), helicônia (*Heliconia* spp.), alpínias (*Alpinia purpurata*), gengibre ornamental (*Zingiber officinale*), bastão do imperador (*Etilingera elatior*), cristal azul (*Calathea burle maxii*), violeta-africana (*Saintpaulia ionantha*), copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica*), entre outras, bem como flores temperadas como rosa (*Rosa* spp.), crisântemo (*Chrysanthemum* spp.), áster (*Callistephus* spp.), gérbera (*Gerbera* spp.), etc.

3.2. Cultivo de Violeta-africana (*Saintpaulia ionantha*)

A violeta-africana (*Saintpaulia ionantha*), pertencente à família *Gesneriaceae*, é uma planta bastante popular e muito cultivada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Apresenta pequeno porte e facilidade no momento de cultivá-las, desenvolvendo-se bem à temperatura de 18 a 24°C, alto grau de umidade e luminosidade alta, não devendo ser expostas diretamente ao sol. É muito cultivada dentro de casa devido à fácil adaptação destas em ambientes internos (CRIPPA, 2001) e, se cultivadas adequadamente, permanecem floridas o ano inteiro.

A violeta (Figura 1) foi descoberta na Tanzânia, parte leste da África; apresenta sistema radicular curto, pequeno caule rematado por uma roseta de flores; as folhas são redondas de coloração verde, e as flores podem apresentar uma ou mais camadas de pétalas, de cores variadas desde o branco até diferentes tons de azul, roxo, cor-de-rosa e vermelho, dependendo da variedade (SOARES JÚNIOR, 2008).



Figura 1 - Violeta-africana (*Saintpaulia ionantha*)

A propagação pode ser de forma sexuada, via sementes, ou assexuada por micropropagação ou estaquia. As sementes são muito pequenas e devem ser obtidas através da polinização artificial, escolhendo-se plantas que apresentem características desejáveis ao consumidor. A propagação *in vitro* é realizada com a utilização de explantes, como limbo foliar, pecíolos, anteras e pétalas (célula, tecido ou órgão), os quais devem estar sadios; após realizada a assepsia, ou seja, quando são desinfestados em solução de hipoclorito de sódio por 1 minuto, depois colocados em álcool 70% por 1 minuto, e em seguida enxaguados com água destilada por 3 vezes; são introduzidos em meio de cultura e então, mantidos em ambiente com condições adequadas para seu desenvolvimento. A estaquia que pode ser realizada pelo uso de estacas foliares, é o método mais utilizado pela facilidade de realização e de enraizamento das folhas (SOARES JÚNIOR, 2008). Estaca é o segmento retirado da planta mãe, que apresenta pelo menos uma gema vegetativa capaz de gerar uma nova planta (LAJÚS et al., 2007). A propagação vegetativa por estaquia apresenta algumas vantagens, como produção de novas mudas em um curto espaço de tempo, baixo custo, método de fácil execução, maior uniformidade das mudas e não apresenta problemas de incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto (BUENO, 2012).

O cultivo de mudas de violeta, após a realização da estaquia, é feito em casa de vegetação, uma técnica que permite maior controle das condições de umidade, temperatura, luminosidade, irrigação e adubação, às quais as plantas são submetidas (VIDA et al., 2004). Segundo Lopes et al. (2005) devem ser utilizados substratos que apresentem boa estrutura, aeração, porosidade, boa retenção de água e ricos em nutrientes, pois estes influenciam no

enraizamento das plantas, podendo prejudicar sua formação. Em seu trabalho avaliou o enraizamento de estacas foliares de diferentes variedades de violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) em cinco diferentes substratos: terra+areia+esterco, areia, pó de xaxim, vermiculita e água destilada, tendo como resultados melhor enraizamento da cultivar Nancy após 40 dias do plantio, tendo maior número e comprimento de raízes no substrato água; maior número e comprimento de folíolos, bem como maior número médio de brotos no substrato pó de xaxim.

Submetida a condições adequadas, é possível obter mudas fora da época, com maior crescimento das plantas, redução da perda de nutrientes por lixiviação, redução de estresse fisiológico das plantas e maior eficiência no controle de pragas e doenças. Para isso o manejo deve ser realizado de forma correta, com controle adequado dos fatores, ambiente e solo (VIDA et al., 2004).

Em casa de vegetação o processo de formação de mudas, demonstrado na figura 2, se dá a partir da retirada da folha de plantas matrizes, sendo que em cada 6 semanas, colhem-se 6 folhas por planta. As folhas devem apresentar pecíolos com média de 0,5 cm e são plantadas em bandejas de 28x38 cm. Após 10 dias começam a aparecer as primeiras raízes na folha e depois de 3 semanas a raiz já está bem desenvolvida. Com 5 semanas começa a formação das gemas e o aparecimento dos primeiros brotos; com 7 semanas a folha é cortada na metade, para reduzir a área foliar, priorizando o transporte de fotoassimilados para a formação dos brotos; após 11 semanas os brotos formados podem ser repicados, separando-os para o plantio em outras bandejas, de 84 células; levando ainda mais 6 semanas para a muda ficar pronta para ser transplantada para o vaso final (Figura 1).



Figura 2 - Etapas realizadas para formação de mudas

Quando o manejo é realizado de forma inadequada em cultivo protegido, ou seja, irrigação irregular, falta de adubação, controle químico ou biológico inadequado, a violeta pode estar sujeita ao aparecimento de diversas doenças, as quais interferem nos processos fisiológicos da planta, prejudicando seu desenvolvimento, tendo um desempenho anormal nos processos, como absorção e transporte de água e nutrientes (REZENDE, 2011). As doenças causadas em violeta são provocadas por alguns patógenos como, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Erwinia chrysanthemi* e *Bothrytis cinerea*.

3.3. O gênero *Pythium*

Um dos patógenos que tem grande importância no cultivo da violeta pertence ao gênero *Pythium*, fungo oomiceto do Reino Chromista, Ordem Pythiales, Família *Pythiaceae*, o qual é caracterizado pela formação de zoósporos biflagelados, formados dentro ou a partir de esporângios, a partir da clivagem citoplasmática (KRÜGNER & BACCHI, 1995). Os zoósporos apresentam um flagelo, do tipo “chicote” e outro do tipo “tinsel”.

Segundo Massola Jr. (2011), em condições favoráveis do ambiente, o oósporo germina produzindo um tubo germinativo e, quando em condições de temperatura elevada (25°C a 28°C) desenvolve-se como micélio. Já em condição de temperatura baixa, o tubo germinativo cessa seu crescimento formando uma vesícula onde há a produção dos zoósporos. Os esporângios originados a partir do micélio produzem vesículas, onde se diferenciam os zoósporos. Quando são liberados nadam em direção ao hospedeiro e, quando entram em contato com a superfície da planta, perdem seus flagelos, encistam-se e germinam penetrando no tecido de seu hospedeiro.

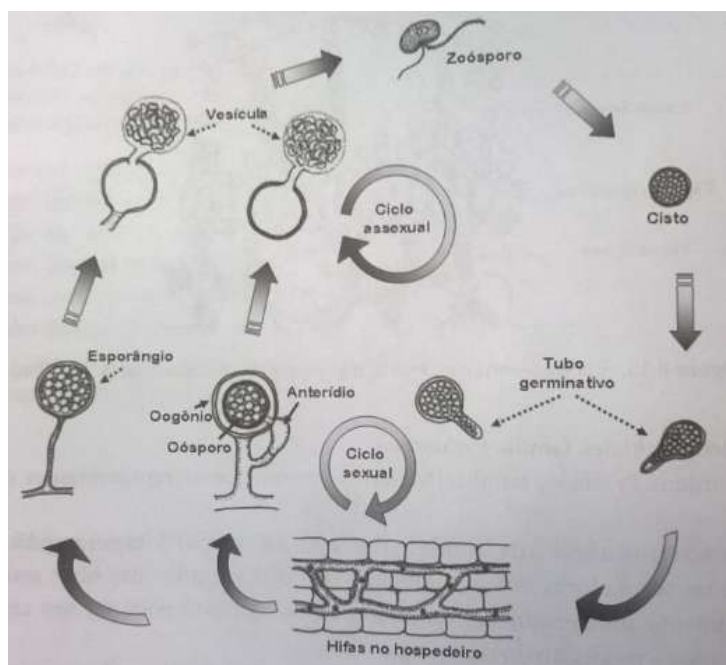


Figura 3 - Ciclo do *Pythium* sp. Fonte: Manual de Fitopatologia (2011).

É um fungo habitante de solo que ataca, principalmente, partes subterrâneas das plantas ou partes que se encontram próximas do solo. Na ausência do hospedeiro permanece dormente por meio dos oósporos, ou sobrevive saprofiticamente em restos culturais.

Em violeta-africana, *Pythium* sp. pode causar podridão radicular quando o cultivo cresce em substrato encharcado; os sintomas iniciam nas raízes mas podem, posteriormente, evoluir pelo colo da planta. Quando as raízes apresentam coloração marrom escuro e estão apodrecidas, geralmente morrem (FREITAS-ASTÚA, 2005).

3.3.1. Métodos de Manejo

O controle desse fungo pode ser realizado através de tratamentos químico, biológico, e também por métodos culturais. Uma das formas de tratamento químico é a partir da aplicação de fungicidas, método muito eficiente e utilizado para o controle de *Pythium* spp., sendo na maioria dos casos a única medida eficiente capaz de manter alta produtividade. O Brasil e também outros países economicamente desenvolvidos utilizam o controle químico em grande escala, contribuindo para o faturamento de US\$ 4,5 bilhões na indústria de fungicidas. Porém, seu uso se torna restrito quando levado em consideração questões de impacto ambiental, aplicação inadequada e o aparecimento de espécies resistentes do patógeno (SANTOS, 2010). Há diferentes tipos de fungicidas, os quais podem ser classificados de acordo com sua mobilidade na planta: 1. Sistêmicos ou móveis: capazes de penetrar na planta translocando-se via sistema vascular; 2. Imóveis: não são absorvidos nem translocados, permanecendo na superfície onde foram depositados; 3. Translaminares: penetram o limbo foliar e agem na face oposta da aplicação; 4. Mesostêmicos: redistribuem-se na superfície foliar por afinidade à cera. Os imóveis podem ser classificados em fungicidas de ação erradicante (contato) ou de ação protetora. Os sistêmicos apresentam um efeito de tratamento curativo na planta.

Podem-se realizar testes *in vitro* para avaliação do desempenho dos fungicidas em relação ao controle do fungo. Yañez (2000) realizou um experimento sobre a identificação, patogenicidade e sensibilidade a produtos químicos *in vitro* de espécies de *Pythium*, isolados de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.). Utilizou três isolados de *Pythium*, identificados como H₁, F₁ e T₁, e nove fungicidas (azoxystrobin, fluazinam, oxicloreto de cobre, mancozeb, metalaxyl + mancozeb, metalaxyl, cymoxanil + maneb, cymoxanil + famoxadone e propamocarb hydrochloride). Os fungicidas foram incorporados ao meio de cultura em diferentes concentrações; foi utilizado como inóculo um disco de micélio proveniente de colônias puras dos três isolados. A avaliação foi realizada a partir da

comparação entre o crescimento diametral médio das colônias em cada placa, com os produtos e respectivas doses, e o crescimento diametral médio das testemunhas, determinando-se a porcentagem de inibição do crescimento (P.I.C.) (Edgington et al., 1971). Os fungicidas que apresentaram maior eficiência foram o mancozeb, metalaxyl + mancozeb, cymoxanil + maneb e cymoxanil + famoxadone.

O controle biológico pode ser uma alternativa para diminuir a podridão de raízes causadas por *Pythium* spp., e é definido como “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem” (COOK & BAKER, 1983 apud MARIANO et al., 2005). Espécies do gênero *Trichoderma* são muito utilizadas como agentes de biocontrole; segundo Samuel e Hadavi (1996) apud Saito et al. (2009) o gênero *Trichoderma* pertence à classe dos fungos Mitospóricos, família Moniliacea. Apresenta crescimento rápido, formando o micélio inicialmente de coloração branca, tornando-se cotonoso e compacto com tufo verdes (DOMSH et al., 1980 apud Saito et al., 2009). O fungo *Trichoderma* spp. é um microrganismo que pode ser encontrado de forma natural no solo; participa de processos como a mineralização e decomposição dos resíduos vegetais, disponibilizando nutrientes para a planta (MENEZES et al., 2009 apud SAITO et al., 2009). Apresentam diferentes mecanismos de ação como parasitismo, competição e antibiose. Parasitismo ocorre quando um microrganismo parasita o outro, ou seja, parasita hifas e estruturas de resistência impedindo seu desenvolvimento; competição ocorre quando dois ou mais organismos competem entre si para obtenção de nutrientes, oxigênio, água, luz, espaço, entre outros fatores (MACHADO et al., 2012); e antibiose, o principal mecanismo de ação deste agente de biocontrole, ocorre quando um organismo tem capacidade de produzir metabólitos que podem prejudicar o desenvolvimento do outro (SANTOS, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes, no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), em Piracicaba, e na Estufa 2, de produção de mudas do Sítio Del Rey, em Holambra. Foram utilizadas folhas de violeta (*Saintpaulia ionantha*) das matrizes produzidas no sítio e isolado do fungo *Pythium* sp. obtido de plantas infectadas provenientes deste mesmo local.

Foram realizados dois experimentos, em laboratório e em casa de vegetação, onde foram utilizados 1 isolado de *Trichoderma* spp. e 8 fungicidas no controle do fungo patogênico *Pythium* sp.

4.1. Obtenção do Isolado

O isolado de *Pythium* sp. foi obtido de folhas de violeta (*Saintpaulia ionantha*) que já apresentavam sintomas de podridão de *Pythium*, provenientes do sítio Del Rey, em Holambra. Procedeu-se o isolamento através da retirada de alguns pedaços da folha e do caule que apresentavam a podridão marrom escura. Estes foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio por 1 minuto, depois colocados em álcool 70% por 1 minuto e, em seguida, enxaguados com água destilada por 3 vezes. Após a desinfestação foram secos em papel toalha e logo transferidos para placas de Petri contendo meio AA (Ágar-água). Depois foram mantidos em câmara de incubação sob luz fluorescente branca, com fotoperíodo de 12h e temperatura de 20 ± 2 °C, até o aparecimento de micélio característico do fungo. Após o crescimento micelial foi realizada a repicagem e transferência dos discos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) para observação do padrão de crescimento das colônias após 3 dias.

4.2. Fungicidas

Os fungicidas foram selecionados com base nos utilizados no sítio Del Rey, para comparação dos diferentes ingredientes ativos. Apenas dois destes são registrados para o controle de *Pythium* sp. em violeta, alguns são registrados para controle de *Phytophthora* spp., e como estes fungos apresentam características semelhantes, por serem ambos oomicetos, também podem ser eficientes para o controle de *Pythium* sp.

Tabela 1 - Relação de fungicidas avaliados no experimento para o controle de *Pythium* sp.

Ingrediente Ativo	Grupo Químico	Princípio Geral de Controle	Produto registrado para Violeta
Fosetyl-Al (800 g/Kg)	Fosfonato	Sistêmico	X
Clorotalonil (825 g/Kg)	Isoftalinitrila	Contato	
Metiram + Piraclostrobina (550 + 50 g/Kg)	Alquilenobis (ditiocarbamato) + Estrobilurina	Sistêmico	
Cimoxanil + Mancozebe (80 + 640 g/Kg)	Acetamida + Alquilenobis (ditiocarbamato)	Sistêmico e Protetor	
Dimetomorfe (500 g/Kg)	Morfolina	Sistêmico e Contato	
Cloridrato de Propamocarbe (722 g/L)	Carbamato	Sistêmico	X
Metalaxil-M + Mancozebe (40 + 640 g/Kg)	Acilalaninato + Alquilenobis (ditiocarbamato)	Sistêmico e Contato	
Cloridrato de Propamocarbe + Fluopicolide (625g/L + 62,6g/L)	Carbamato + Benzamida piridina	Sistêmico e Translaminar	

4.3. Identificação do fungo

Para a identificação do isolado obtido foram realizados diferentes métodos, os quais seriam possíveis para a visualização do esporângio de *Pythium* sp.:

1. Inoculação do micélio do fungo em abobrinha e pepino

Com auxílio de um furador, foi retirado discos da abobrinha e do pepino; no local do furo foi colocado um disco de meio BDA com o micélio do fungo e em seguida foi fechado novamente com a parte de cima do disco de abobrinha e pepino. Depois foram colocados em um recipiente sobre um papel filtro umedecido e cobertos com um saco plástico. Foram mantidos em temperatura ambiente em cima de uma bancada. Após três dias seria possível observar o crescimento micelial sobre a abobrinha e o pepino, o qual poderia ser colocado sobre uma lâmina com água destilada e visualizada num microscópio composto, sendo possível observar os esporângios do fungo.

2. Introdução de iscas e discos do micélio do fungo em placas de Petri com água destilada e esterilizada

2.1. Primeira isca: Cenoura

2.2. Segunda isca: Pedacos de folha de violeta

Nesse método foi colocado água destilada e esterilizada em uma placa de Petri, discos de meio com micélio do fungo e uma isca. As iscas utilizadas foram pedaços de cenoura e pedaços de folhas de violeta. Após três dias foi possível notar o desenvolvimento micelial sobre a água. A placa com o micélio do fungo foi visualizada no microscópio composto, onde foi possível observar as estruturas do fungo.

4.4. Teste de Patogenicidade

O teste de patogenicidade foi feito para confirmação do agente causal. A partir do isolado obtido foi feita a inoculação deste nas plantas de violeta; para isso foi feito ferimentos no colo da planta com o auxílio de uma agulha. A infecção foi realizada de duas maneiras: 1) Inserção do micélio no ferimento; 2) Inoculação da suspensão do fungo no substrato com realização de ferimentos no colo da planta. Foram utilizados 5 vasos de violeta, sendo um a testemunha, dois com o primeiro modo de infecção citado a cima e dois com o segundo modo.

A suspensão foi preparada com a colônia do fungo desenvolvida em 3 placas de Petri com BDA e água destilada e esterilizada. Com a ajuda de uma pipeta, foi retirada 2 mL da suspensão e introduzida no substrato perto dos ferimentos. Após 3 semanas foi possível observar os sintomas de podridão radicular, no colo e nas folhas da planta.

4.5. Testes *in vitro*

4.5.1. Método de Pareamento com *Trichoderma harzianum*.

No laboratório foram realizados estudos para avaliar a interação de *Trichoderma harzianum* com *Pythium* sp., através do método de pareamento *in vitro*. Para a avaliação do antagonismo do produto formulado a base de *Trichoderma harzianum* contra o patógeno, foi utilizado o método de cultura pareada descrito por Dennis & Webster (1971). O *Trichoderma harzianum* foi colocado nas bordas de placas de Petri contendo o meio BDA, depois de 48 horas foi colocado o *Pythium* sp. opostamente; as placas permaneceram incubados em câmara de incubação sob luz fluorescente branca, com fotoperíodo de 12 h e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Após alguns dias da instalação, quando no tratamento testemunha o patógeno atingiu metade da placa, foi realizada a avaliação do experimento, baseada na escala descrita por Bell et al. (1982):

Classe 1 = *Trichoderma* spp. cresce sobre *Pythium* sp. e ocupa toda a superfície do meio;

Classe 2 = *Trichoderma* spp. cresce sobre, pelo menos, 2/3 da superfície do meio;

Classe 3 = *Trichoderma* spp. e *Pythium* sp. ocupam, aproximadamente, metade da superfície do meio;

Classe 4 = *Trichoderma* spp. cresce sobre 1/3 da superfície do meio;

Classe 5 = *Trichoderma* spp. não cresce e *Pythium* sp. ocupa toda a superfície da placa.

Em seguida foram feitas mais duas avaliações observando o desenvolvimento de *Trichoderma harzianum* sobre *Pythium* sp., sendo uma após 6 dias e outra após 10 dias da instalação do experimento.

4.5.2. Avaliação da Sensibilidade a Fungicidas

A avaliação da sensibilidade de *Pythium* sp. a diferentes fungicidas foi realizada por meio do teste descrito a seguir:

4.5.2.1. Preparo das diluições e incorporação dos fungicidas ao meio de cultura

Para a avaliação do crescimento micelial em relação à sensibilidade de *Pythium* sp. a fungicidas, utilizou-se o método de incorporação de fungicidas ao meio de cultura BDA. Primeiramente realizou-se a diluição dos produtos comerciais em água destilada e esterilizada. Calculou-se a quantidade de produto comercial necessária para a obtenção de uma suspensão estoque de 10000 mg.L⁻¹ de ingrediente ativo. Em seguida foram realizadas diluições seriadas, obtendo-se suspensões com concentrações de 1000, 100, 10, 1 e 0,1 mg.L⁻¹.

Após a autoclavagem o meio foi resfriado até atingir a temperatura de 45°C, e transferiu-se a quantidade necessária de cada produto para o meio, obtendo as concentrações finais desejadas. O meio assim preparado foi adicionado a placas de Petri de 90 x 15 mm e deixado em repouso por 24 horas.

Todo esse procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas.

4.5.2.2. Crescimento Micelial

Discos de 6 mm de diâmetro foram retirados dos bordos de colônias com três dias de idade e transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura BDA +

fungicidas. Para os fungicidas Cimoxanil + Mancozebe e Metalaxil + Mancozebe foram utilizadas as concentrações 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 e 25 ppm; para o Cloridato de Propamocarbe + Fluopicolide e Cloridato de Propamocarbe foram utilizadas as concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 ppm; para o Metiram+Piroclostrobin foram utilizadas as concentrações 2,5; 5,0; 10; 25; 50 e 100 ppm, para o Fosetyl-Al foi utilizada as concentrações 25; 50 e 100 ppm; para o Clorotalonil foi utilizada as concentrações 300, 350 e 400 ppm e para o Dimetomorfe foi utilizada as concentrações 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 ppm. A incubação foi realizada em câmara de incubação sob luz fluorescente branca, com fotoperíodo de 12 h e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas após 48 horas de incubação, com ajuda de um paquímetro digital, por meio de medições dos diâmetros (mm) das colônias em dois sentidos ortogonais, tomando-se como valor de crescimento a média das duas medidas. Foi feita uma única medição, no momento em que a testemunha atingiu a borda da placa. O diâmetro médio das colônias de cada placa, com os produtos e respectivas doses, foram comparados com o crescimento diametral médio das testemunhas, determinando-se, dessa forma, a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), expressa pela seguinte fórmula:

$$PIC = \frac{\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratamento}}{\text{crescimento da testemunha}} \times 100$$

Para a avaliação da eficiência dos fungicidas, serão correlacionados os dados de porcentagem de inibição do crescimento micelial com o logaritmo da concentração do fungicida obtido, graficamente, o valor aproximado da dose efetiva mediana (CI_{50}) e a dose total (CI_{100}), ou seja, a concentração de ingrediente ativo necessário para inibição de 50% da colônia de fungo, e a concentração de ingrediente ativo necessário para inibição de 100% da colônia de fungo, respectivamente. Após o cálculo do CI_{50} , os fungicidas serão classificados segundo a escala de EDGINGTON et al. (1971), modificada.

Tabela 2 - Escala modificada de EDGINGTON et. al. (1971).

CI₅₀	EFICIÊNCIA do Fungicida	SENSIBILIDADE ao <i>Pythium</i> sp.
<0,01	Altamente eficiente	Altamente sensível
0,01 – 0,1	Muito eficiente	Muito sensível
0,1 - 1	Eficiente	Sensível
1 - 10	Moderadamente eficiente	Moderadamente sensível
10 - 50	Pouco eficiente	Pouco sensível
>50	Ineficiente	Insensível

4.5.2.3. Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Com as médias do diâmetro das colônias obtidas calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos tratamentos, em relação à testemunha. Através das equações de regressão, foi estimado os valores de CI₅₀ e CI₁₀₀ de cada produto.

4.6. Teste *in vivo*

Em casa de vegetação foi feito o plantio de violeta, por meio da propagação vegetativa, com a utilização de folhas com pecíolo para formação de mudas. Foram utilizadas 4 bandejas por tratamento, sendo que em cada bandeja foram colocadas 40 folhas. O substrato utilizado é uma mistura de 50% de casca de pinus compostada com 50% de fibra de coco. Após a introdução das folhas nas bandejas, foi feita a primeira aplicação dos fungicidas, sendo seguida de mais duas aplicações, com intervalo de 10 dias. Durante o processo de formação da muda foram avaliados quatro parâmetros: 1) Enraizamento após 3 semanas do plantio; 2) Porcentagem de brotação formada a partir das folhas; 3) Quantidade de mudas produzidas por tratamento; 4) Porcentagem de folhas infectadas com *Pythium* sp. após 6

semanas. A testemunha consistiu de folhas apenas irrigadas com água. A aplicação desses produtos sobre a planta foi feita por irrigação, de acordo com as doses indicadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Doses utilizadas na irrigação em casa de vegetação.

Tratamentos	Dose	Quantidade aplicada/ Bandeja(28 x 38 cm)
Testemunha	–	200 mL
Fosetyl-Al	0,75 g/L	200 mL
Clorotalonil	1 mL/L	200 mL
Metiram + Piraclostrobina	1 g/L	200 mL
Cimoxanil + Mancozebe	1 g/L	200 mL
Dimetomorfe	1 g/L	200 mL
Cloridrato de Propamocarbe	1 mL/L	200 mL
Metalaxil-M + Mancozebe	1 g/L	200 mL
<i>Trichoderma harzianum</i>	1 mL/L	200 mL

4.6.1. Enraizamento

O enraizamento foi avaliado após 3 semanas do plantio, a partir de uma escala de notas de 1 a 5, indicada a seguir:



Figura 4 - Escala de avaliação do enraizamento (Notas 1 a 5 equivalem a 100%, 75%, 50%, 25% e 0% do enraizamento).

4.6.2. Porcentagem de brotação a partir das folhas

A porcentagem de brotação formada foi calculada a partir da contagem de folhas que apresentaram brotação. A contagem foi feita após 60 dias da instalação do experimento.

4.6.3. Quantidade de mudas formadas por tratamento

A quantidade de mudas foi calculada a partir da contagem de mudas formadas por bandeja, a qual foi feita depois de 12 semanas da instalação do experimento (Figura 5). Este procedimento é chamado de repique. Uma bandeja que apresenta um bom desenvolvimento deve formar, em média, 160 mudas sendo, aproximadamente, 4 mudas por folha.



Figura 5 - Bandeja com as mudas já prontas para o repique.

4.6.4. Porcentagem de folhas infectadas com *Pythium* sp.

Foi realizada a retirada de folhas infectadas (Figuras 6 e 7), uma vez por semana, durante 30 dias após a instalação do experimento. Em seguida foi contabilizado o total de folhas infectadas por *Pythium* sp. e calculada sua porcentagem.



Figura 6 - Bandeja com folhas infectadas com *Pythium* sp.



Figura 7 - Folha infectada com *Pythium* sp.

4.6.5. Análise dos Dados

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com 4 repetições de 40 folhas. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$) pelo programa estatístico Assistat Versão 7,7 beta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação do Fungo

A partir do método que utilizou pedaços de folhas de violeta como isca em placas de Petri com água destilada e esterilizada, confirmou-se *Pythium* sp. como agente causal da podridão de raiz (Figura 8). O fungo formou um micélio sobre a água e, com a ajuda de um microscópio composto, podem-se observar as estruturas características (Figura 9).



Figura 8 - Pedaços de folhas de violeta com discos de micélio de *Pythium* sp.



Figura 9 - Esporângio de *Pythium* sp.

Nos outros métodos utilizados, tanto na inoculação do fungo na abobrinha e no pepino, quanto na utilização de pedaços de cenoura como isca, não foi possível identificar o fungo, pois nestes não houve a formação do micélio.

O método de inoculação na abobrinha e no pepino, da família botânica Cucurbitaceae, foi utilizado para identificação do fungo, pois segundo Reis & Henz (2008) o oomiceto *Phytophthora capsici* causa alguns sintomas em diversas cucurbitáceas, como o tombamento

de mudas, murcha em plantas e podridões de frutos. Desta forma, como *Pythium* e *Phytophthora* são fungos oomicetos e ambos causam podridão, foi feito o teste com essas hortaliças com objetivo de identificar o fungo.

5.2. Teste de Patogenicidade

Neste teste foi possível observar os sintomas que *Pythium* sp. causa na planta, como a podridão da raiz que pode levar à podridão do colo. Como é possível observar na Figura 10, o vaso onde o micélio foi inserido diretamente no ferimento, houve uma infecção mais rápida com relação àquele em que foi feita a inoculação do substrato com a suspensão do fungo (Figura 11). Na Figura 12 está representado um vaso de violeta em que não foi realizada nenhuma forma de inoculação, onde se tem uma planta sadia.



Figura 10 - Vaso de violeta com inserção do micélio no ferimento.



Figura 11 - Vaso de violeta com suspensão do micélio do fungo inoculado no substrato.



Figura 12 - Vaso de violeta sem inoculação (Testemunha).

5.3. Testes *in vitro*

5.3.1. Método de Pareamento com *Trichoderma harzianum*.

Tabela 4 - Resultado do teste de pareamento *in vitro*.

Repetições	A*	B*	C*	D*	Média
Testemunha	-	-	-	-	
<i>Trichoderma harzianum</i>	3	3	3	3	3

*Classificação do crescimento micelial, segundo Dennis & Webster (1971).

Conforme a Tabela 4, de acordo com o método de cultura pareada descrito por Dennis & Webster (1971), quando a testemunha atingiu metade da placa, *Trichoderma harzianum* e *Pythium* sp. cresceram sobre metade da superfície do meio em todas as repetições (Figura 13). Foram feitas ainda mais duas avaliações; após 24 horas pode-se observar um crescimento de *Trichoderma harzianum* sobre o patógeno (Figura 14), e após 72 horas da última avaliação foi verificado que o *Trichoderma harzianum* havia esporulado mais sobre o patógeno, como observa-se na Figura 15, onde é possível visualizar um outro mecanismo de ação do *Trichoderma harzianum*, o parasitismo. A partir dessas avaliações foi possível verificar que o *Trichoderma harzianum* pode ser um produto eficiente no controle de *Pythium* sp.



Figura 14 - Método de cultura pareada com *Trichoderma harzianum* e *Pythium* sp. no dia da primeira avaliação, após 4 dias da instalação do experimento. (Esquerda: *Trichoderma* spp., Direita: *Pythium* sp.).

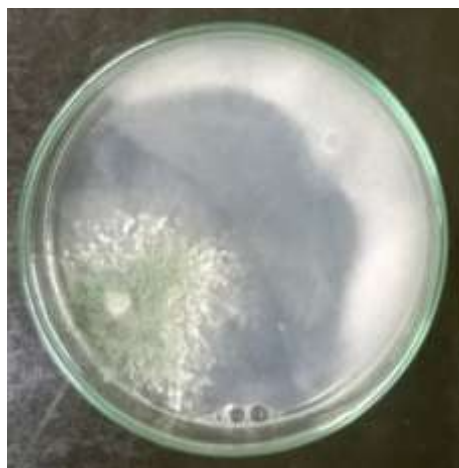


Figura 13 - Método de cultura pareada com *Trichoderma harzianum* e *Pythium* sp. no dia da segunda avaliação após 6 dias da instalação do experimento. (Esquerda: *Trichoderma* spp., Direita: *Pythium* sp.).



Figura 15 - Método de cultura pareada com *Trichoderma harzianum* e *Pythium* sp. no dia da terceira avaliação após 10 dias da instalação do experimento. (Esquerda: *Trichoderma* spp., Direita: *Pythium* sp.).

5.3.2. Avaliação da Sensibilidade de *Pythium* sp. a Fungicidas

Os resultados obtidos com relação às concentrações inibitórias de 50% e 100% de crescimento micelial estão representados na Tabela 5, e as porcentagens de inibição do crescimento micelial estão representadas graficamente nas Figuras 6 e 7.

Tabela 5 - Fungicidas e respectivas equações de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e 100% (CI₁₀₀) do crescimento micelial de *Pythium* sp.

Fungicidas	Equação de Regressão	R^2	CI (mg/L)	
			CI ₅₀	CI ₁₀₀
Fosetyl-Al	$y = 35,954x - 47,377$	0,9593	510,95	12561,6
Clorotalonil	$y = 185,89x - 417,24$	0,9951	326,23	606,05
Metiram + Piraclostrobina	$y = 59,743x - 31$	0,9439	22,69	155,85
Cimoxanil + Mancozebe	$y = 49,876x + 22,911$	0,9773	3,49	35,12
Dimetomorfe	$y = 14,753x + 2,1652$	0,9002	1747,34	4280742
Cloridrato de Propamocarbe	$y = 36,152x + 45,131$	0,945	1,36	32,94
Metalaxil-M + Mancozebe	$y = 70,706x + 9,3407$	0,9545	3,76	19,15
Cloridrato de Propamocarbe + Fluopicolide	$y = 34,583x + 43,05$	0,9617	1,59	44,34

Inibição do crescimento micelial (%)

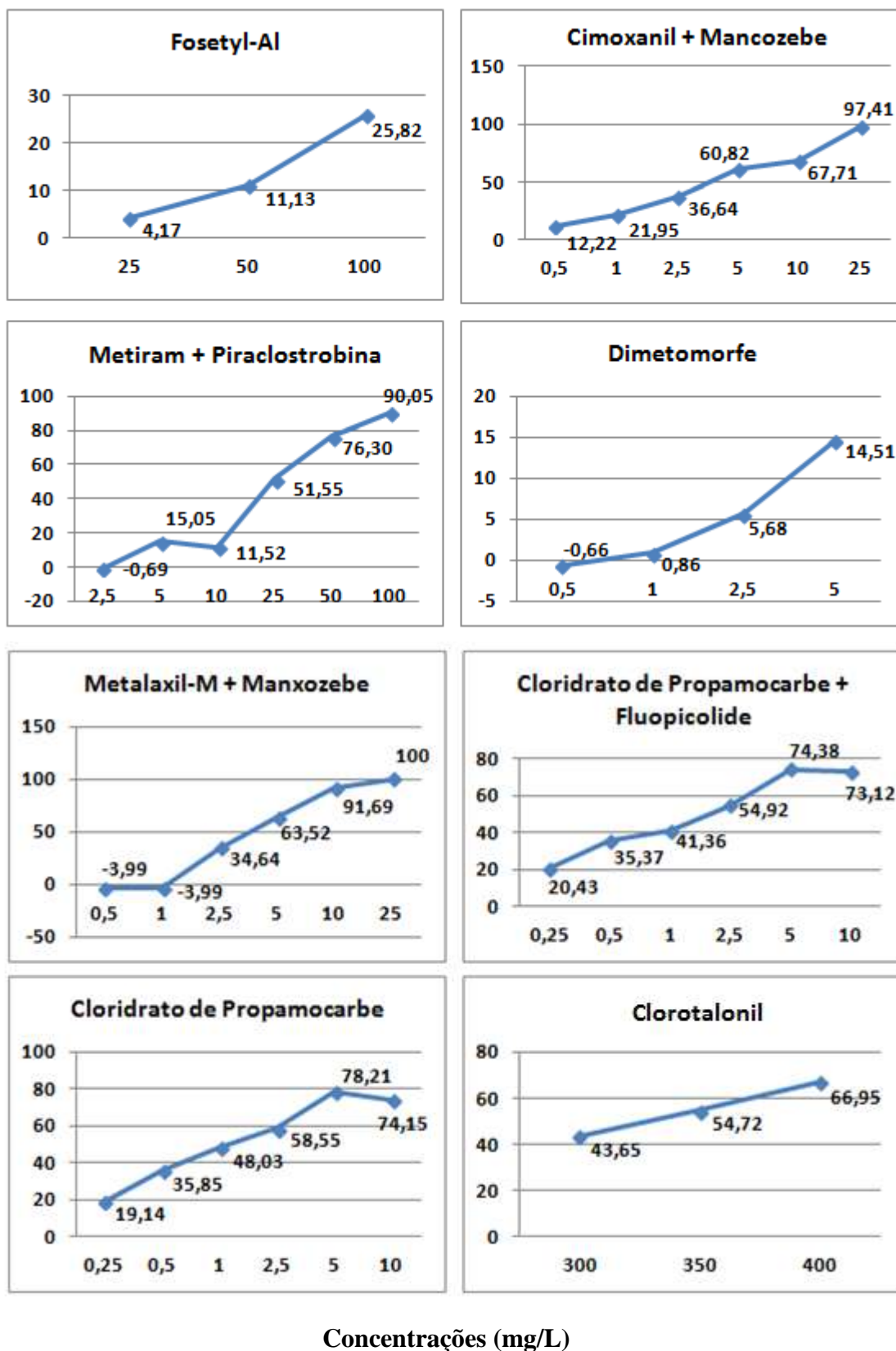


Figura 16 - Inibição do crescimento micelial (%) *in vitro* de *Pythium* sp., por 8 fungicidas, em diferentes concentrações (mg/L).

Os fungicidas no geral apresentaram CI_{50} bem variado, sendo quatro deles com valores mais baixos, entre 1 e 4 $mg.L^{-1}$, os quais são o Cimoxanil + Mancozebe, Cloridrato de Propamocarbe, Metalaxil-M + Mancozebe e Cloridrato de propamocarbe + Fluopicolide. O Metiram + Piraclostrobina apresentou CI_{50} próximo de 23 $mg.L^{-1}$; o Fosetyl-Al e Clorotalonil apresentaram um valor mais elevado com 510,95 e 326,23 $mg.L^{-1}$, respectivamente, e o Dimetomorfe apresentou o maior valor de CI_{50} , superior a 1000 $mg.L^{-1}$.

De acordo com a escala de Edginton e Khew (1971), os fungicidas Fosetyl-Al, Clorotalonil e Dimetomorfe são considerados ineficientes para o controle de *Pythium* sp., pois apresentaram CI_{50} superior a 50 $mg.L^{-1}$. O Metiram + Piraclostrobina foi considerado pouco eficiente no controle, pois apresentou CI_{50} entre 10 e 20 $mg.L^{-1}$. Os fungicidas Cimoxanil + Mancozebe, Cloridrato de Propamocarbe, Metalaxil-M + Mancozebe e Cloridrato de Propamocarbe + Fluopicolide apresentaram CI_{50} entre 1 e 10 $mg.L^{-1}$, por isso são considerados moderadamente eficientes no controle de *Pythium* sp.

Valores superiores a 20 $mg.L^{-1}$, 32 $mg.L^{-1}$, 35 $mg.L^{-1}$ e 44 $mg.L^{-1}$ de Metalaxil-M + Mancozebe Cloridrato de Propamocarbe, Cimoxanil + Mancozebe e Cloridrato de Propamocarbe + Fluopicolide, respectivamente, foram suficientes para impedir em 100% o crescimento micelial. Os outros fungicidas apresentaram valores bem mais elevados para inibição de 100% do crescimento micelial, sendo que para o Metiram + Piraclostrobina foi superior a 100 $mg.L^{-1}$, Clorotalonil superior a 600 $mg.L^{-1}$, e o Fosetyl-Al a cima de 1000 $mg.L^{-1}$.

O Dimetomorfe é um fungicida eficiente para o controle de oomicetos, mas apresentou crescimento micelial em todas as concentrações. Segundo Rodrigues (2006), este é um produto que não é efetivo para o controle de *Pythium* spp., e sim para o controle de *Phytophthora* spp., sendo possível observar que apesar de serem ambos oomicetos, há fungicidas que não são eficientes para os dois fungos.

Os resultados obtidos para o Fosetyl-Al também não foram bons, indicando ser um produto ineficiente para o controle deste fungo. Este produto é um indutor de resistência, por isso não foi eficiente no teste *in vitro*; todas as concentrações apresentaram crescimento micelial. No trabalho escrito por Fenn & Coffey (1984) no experimento *in vitro* para avaliar a sensibilidade de *Phytophthora* spp. ao Fosetyl-Al, também indicou que é necessária uma maior concentração do fungicida para inibição de 90% do crescimento micelial, sendo em média 186,5 $\mu g/mL$. Segundo Junqueira et al. (2010), a resistência induzida é um método alternativo de controle de doenças, mas é pouco estudado. Em seu trabalho avaliou o desempenho agrônomo de maracujazeiro tratado com produtos alternativos e fertilizantes

foliares; o Fosetyl-Al (233,79 g), um dos produtos usados, apresentou frutos com maior massa fresca, proporcionou incremento no teor de sólidos solúveis dos frutos e maior acidez titulável (ácido cítrico). Este fato pode ser relacionado aos resultados obtidos no experimento *in vivo*, onde o Fosetyl-Al apresentou um bom desenvolvimento radicular e produção de mudas.

5.4. Teste *in vivo*: Enraizamento, porcentagem de brotações formadas a partir das folhas, porcentagem de folhas infectadas com *Pythium* sp. e quantidade de mudas formadas, por tratamento

Os resultados obtidos em casa de vegetação com relação à porcentagem de brotações formada a partir das folhas, quantidade de mudas produzidas a partir destas brotações e a porcentagem de folhas infectadas com *Pythium* sp. estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6 - Porcentagem de brotação, quantidade de mudas produzidas e porcentagem de folhas infectadas com *Pythium* sp. por tratamento.

Tratamentos	Brotação (%)	Quantidade de Mudanças	Folhas Infectadas (%)
Fosetyl-Al	99,37 a	132,00 a	0,00 a
Cloridrato de Propamocarbe	100,0 a	131,00 a	0,62 a
Metalaxil-M + Mancozebe	96,87 a	127,75 a	3,12 a
Metiram + Piraclostrobina	95,62 a	117,75 a	3,12 a
Dimetomorfe	79,37 a	82,00 b	13,75 a
Trichodermil SC	89,37 a	79,25 b	1,25 a
Cimoxanil + Mancozebe	85,62 a	61,75 b	0,62 a
Clorotolanil	66,25 a	55,25 b	2,50 a
Testemunha	68,75 a	73,00 b	18,12 a
CV (%)	22,06	28,19	216,9

Com relação ao enraizamento podem-se observar diferenças entre os tratamentos, alguns apresentaram bom desenvolvimento radicular e outros não, verificando-se também sintomas de fitotoxicidade. Na Figura 17 indicada a seguir é possível notar essas diferenças, e na Tabela 7 pode-se observar a porcentagem de enraizamento obtida em cada tratamento.

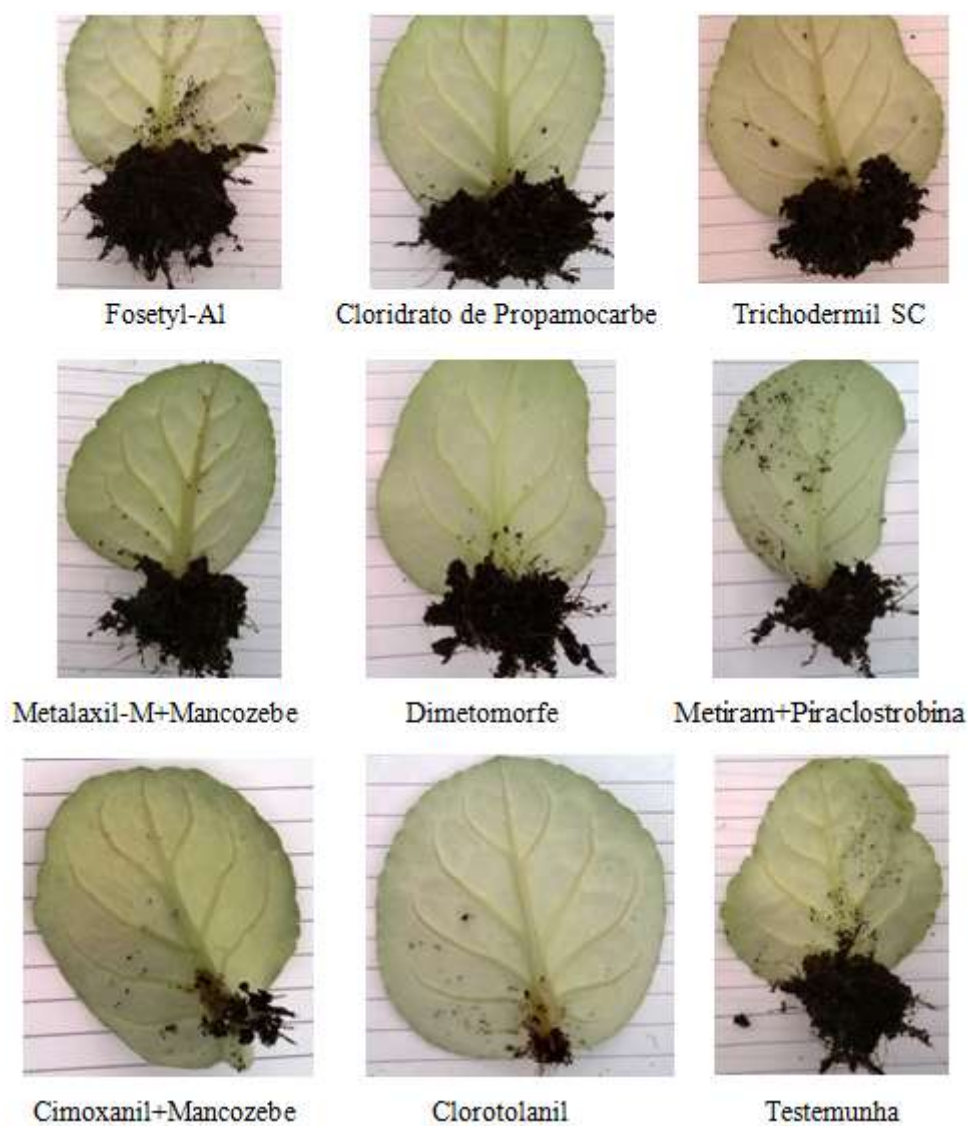


Figura 17 – Folhas de violeta-africana enraizadas após aplicação de diferentes fungicidas.

Tabela 7 - Porcentagem de enraizamento das folhas nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Enraizamento (%)
Fosetyl-Al	100
Cloridrato de Propamocarbe	100
Trichodermil SC	90
Metalaxil-M + Mancozebe	75
Dimetomorfe	75
Metiram + Piraclostrobina	65
Cimoxanil + Mancozebe	30
Clorotalonil	10
Testemunha	80

A partir da análise dos resultados pode-se notar que não houve diferença estatística entre os resultados obtidos na porcentagem de brotação e na porcentagem de folhas infectadas com *Pythium* sp., mas com relação à quantidade de mudas houve diferença estatística, indicando que os fungicidas Fosetyl-Al, Cloridrato de Propamocarbe, Metalaxil-M + Mancozebe e Metiram + Piraclostrobina apresentaram melhores resultados, produzindo, em média, 127 mudas por bandeja, sendo que o Fosetyl-Al produziu em média 132 mudas seguido do Cloridrato de Propamocarbe com 131 mudas por bandeja. O Clorotalonil foi o que apresentou menor quantidade de mudas produzidas, sendo em média 55 mudas por bandeja.

Estatisticamente Fosetyl-Al, Cloridrato de Propamocarbe, MetalaxilM + Mancozebe e Metiram + Piraclostrobina apresentaram maiores quantidades de mudas produzidas, com relação aos outros fungicidas e a testemunha. Desta forma é possível dizer que os outros fungicidas interferiram no desenvolvimento da planta, especialmente aquelas tratadas com Clorotalonil e Cimoxanil + Mancozebe que apresentaram apenas 51 e 61 mudas produzidas, respectivamente.

Em relação ao enraizamento, de acordo com a escala representada no item 4.6.1., os fungicidas que apresentaram melhores resultados foram o Fosetyl-Al, Cloridrato de Propamocarbe e *Trichoderma harzianum*, com 100%, 100% e 90%, respectivamente. Os outros fungicidas apresentaram um desenvolvimento radicular menor que a testemunha, que apresentou enraizamento referente a 80%.

O Cimoxanil + Mancozebe e o Clorotalonil foram os produtos que apresentaram menor desenvolvimento radicular, sendo 30% e 10%, respectivamente. Isto é um indicativo de fitotoxicidade, ou seja, a dose aplicada foi muito elevada, causando problemas para o enraizamento e posteriormente para a formação de brotação e mudas. Na Figura 18 pode-se notar a diferença na brotação entre os tratamentos, sendo que o Clorotalonil e o Cimoxanil + Mancozebe apresentaram menor brotação.

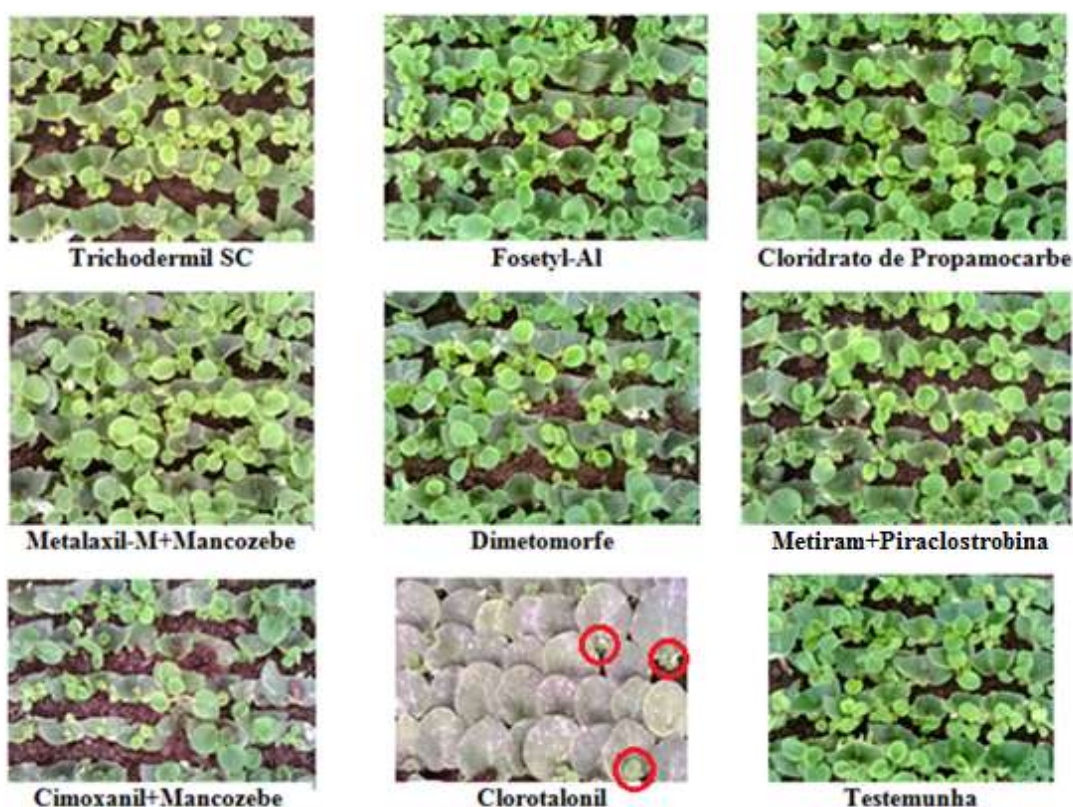


Figura 18 - Brotação das folhas de violeta-africana com aplicação de 8 fungicidas.

O fungicida Metalaxil-M + Mancozebe ainda não é registrado para violeta-africana, mas poderia ser registrado para aplicação durante o processo de produção de mudas desta planta, pois apresentou bons resultados *in vitro* e *in vivo*. Apesar da porcentagem de brotação e porcentagem de folhas infectadas com *Pythium* sp. não apresentarem diferenças estatísticas, o tratamento com este fungicida não interferiu na quantidade de mudas produzidas. O Cloridrato de Propamocarbe e Fosetyl-Al, produto que já é registrado para esta planta, também apresentaram bons resultados, sendo assim indicados para utilização durante a produção de violeta. O Cloridrato de Propamocarbe apresentou bons resultados *in vitro*, sendo classificado como moderadamente eficiente no controle de *Pythium* sp.

6. CONCLUSÕES

No experimento *in vitro* o Cloridrato de Propamocarbe, Cloridrato de Propamocarbe + Fluopicolide, Metalaxil-M + Mancozebe e Cimoxanil + Mancozebe foram os fungicidas que apresentaram melhores resultados com relação ao CI_{50} , sendo considerados fungicidas moderadamente eficientes. O Clorotalonil é um fungicida pouco eficiente para o controle de *Pythium* sp. Já o Fosetyl-Al, Clorotalonil e Dimetomorfe são ineficientes para o controle deste patógeno, apresentando CI_{50} elevado.

O produto a base de *Trichoderma harzianum* pode ser considerado um produto eficiente no controle de *Pythium* sp.

No teste *in vivo* o Fosetyl-Al, Cloridrato de Propamocarbe apresentaram os melhores resultados com relação ao desenvolvimento radicular e grande número de mudas produzidas. O produto formulado a partir de *Trichoderma harzianum* também apresentou bom desenvolvimento radicular

O Cimoxanil + Mancozebe e Clorotalonil apresentaram um baixo enraizamento, e pequena produção de mudas.

O Cloridrato de Propamocarbe e Metalaxil-M + Mancozebe foram os produtos que no geral apresentaram melhores resultados, tanto na eficiência do controle de *Pythium* sp., quanto no desenvolvimento das mudas de violeta-africana.

7. 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**, St. Paul, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BUENO. Propagação de Plantas. Instituto Federal Goiano, Campus Iporá, 12 p. 2012.

CRIPPA, L. **Violetas sempre belas e floridas**. Revista Natureza, editora Europa, ano 14, n. 3, ed. 159, p. 22-25, 2001.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. **Antagonist properties of species-groups of *Trichoderma***. I - Production of non-volatile antibiotics. Transaction of the British Mycological Society, London, v. 57, n. 1, p. 25-39, 1971.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**. Saint Paul, v.61., n.1, p.42-44, 1971.

FENN, M. E.; COFFEY, M. D. Studies on the In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Fosetyl-Al and Phosphorous Acid. **Disease Control and Pest Management**. V. 74, n.5, p. 606-611, 1984

FRANÇA, C. A. M.; MAIA, M. B. R. Panorama do Agronegócio de Fores e Plantas Ornamentais no Brasil. Universidade Federal de Rondônia, UNIR, Porto Velho – RO. **Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, Rio Branco, Acre, 10 p., 2008.

FREITAS-ASTÚA, J.; CALDARI JR., P.; GIÓRIA, R. Doenças das Plantas Ornamentais. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, V. 2, Cap. 60, p. 523-539, 2005.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. 2013: Balanço do Comércio Exterior da Floricultura Brasileira. Contexto e Perspectiva: **Boletim de Análise Conjuntural do Mercado de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil**. Hórtica Consultoria e Treinamento, 2014.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. **Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente**. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; UESUGI, C. H.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; SANTOS, E. C.; RAMOS, L. N. Desempenho Agronômico de maracujazeiros tratados com produtos alternativos e fertilizantes foliares, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 40-47, 2011.

KRÜGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, V. 1, Cap. 4, p. 46-95, 1995.

LAJÚS, C. R.; SOBRAL, L. S.; BELOTTI, A.; SAVARIS, M.; LAMPERT, S.; SANTOS, S. R. F.; KUNST, T. Ácido Indolbutírico no enraizamento de estacas lenhosas de figueira (*Ficus carica* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.1107-1109, 2007.

LOPES, J. C.; CAPUCHO, M. T. COELHO, R. I.; SCANDIAN, A. S. R. Enraizamento de estacas foliares de violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 305-314, 2005.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. Trichoderma no Brasil: O Fungo e o Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MAFFIA, L. A; MIZUBUTI, E. S. G. Epidemiologia de doenças radiculares. Cap. 9. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de**

Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005. p. 207-246.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA E. B.; GOMES, A. M. A. Controle Biológico de Doenças Radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais.** Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE; Cap. 12, p. 303-322, 2005.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A. Controle Biológico de Doenças Radiculares. Cap. 12. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais.** Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005. p. 303-322.

MASSOLA JR, N. S.; KRUNGNER, T. L. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia:** Princípios e Conceitos. 4. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, V. 1, Cap. 8, p. 149-206, 2011.

REIS, A.; HENZ, G. P. Epidemiologia e Manejo de Doenças causadas por *Phytophthora capsici* em Cucurbitáceas. **Embrapa Hortalças**, Comunicado Técnico, 5 p. Brasília, DF, 2008.

REZENDE, J. A. M.; MASSOLA JR, N. S.; BEDENDO, I. P.; KRUGNER, T. L. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia:** Princípios e Conceitos. 4. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, V. 1, Cap. 3, p. 37-58, 2011.

RODRIGUES, M. A. T. Classificação de Fungicidas de acordo com o Mecanismo de Ação proposto pelo FRAC. **Tese de mestrado.** Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu, 249 p., 2006.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 3, p. 203-208, 2009.

SALES JR, R.; MEDEIROS, E. V.; ANDRADE, D. E. G. T; PERUCH, L. A. M.; RODRIGUES, V. J. L. B. Controle Químico de Doenças Radiculares. Cap. 14. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, p. 345-366, 2005.

SALGADO, M. P. G.; FURLAN, M. R.; AOYAMA, E. M.; RODRIGUES, E.; CRUZ, L. P. Propagação assexuada de chacrona (*Psychotria viridis* Ruiz & Pavon) via estaquia foliar. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.5, n.2, p. 383-396, 2012.

SANTOS, M. V. O. *Phytophthora* spp. em Cultivos Diversos no Sul da Bahia e Identificação de Agentes de Biocontrole a estes Patógenos. **Tese de Mestrado em Produção Vegetal**, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus, Bahia, 105 p., 2010.

SMORIGO, J. N. Análise da eficiência dos sistemas de distribuição de flores e plantas ornamentais no Estado de São Paulo. Estado de São Paulo. **Dissertação (mestrado)**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 132 p. Piracicaba, 2000.

SOARES JÚNIOR, J. A. **Cultivo de Violeta-africana**. Dossiê Técnico. Rede de Tecnologia da Bahia, RETEC/IEL, BA, p. 1-21, 2008.

VIDA, J. B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMANN, D. J.; BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VERZIGNASSI, J. R.; CAIXETA, M. P. Manejo de Doenças de Plantas em Cultivo Protegido. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, n. 4, p. 355-372, 2004.