



Controle biológico da podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* e promoção de crescimento de alface hidropônica com *Clonostachys rosea*

Élida B. Corrêa¹, Wagner Bettiol² & Marcelo A.B. Morandi²

¹Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG; ²Embrapa Meio Ambiente, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil

Autor para Correspondência: Wagner Bettiol, e-mail: bettiol@cnpmma.embrapa.br

RESUMO

Clonostachys rosea foi avaliado como promotor de crescimento e no controle da podridão de raiz (*Pythium aphanidermatum*) em sistemas de fluxo laminar de nutrientes (NFT) e “floating”. Na promoção de crescimento, *Clonostachys* (0, 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ conídios/mL) foi introduzido na solução nutritiva (SN) e avaliada a massa das plantas. O biocontrole, em sistema NFT, foi avaliado introduzindo *Clonostachys* na SN (10⁶ conídios/mL) i. um dia após o transplante na ausência do patógeno; ii. três dias antes e no momento da infestação com *Pythium* e, iii. três dias antes, no momento e três dias após infestação com *Pythium*. Em sistema “floating”, *Clonostachys* foi introduzido na SN (10⁶ conídios/mL) i. quatro dias antes e no momento da infestação com *Pythium*, e ii. quatro dias antes, no momento e quatro dias após a infestação com *Pythium*. Nesses experimentos foram determinadas as massas das plantas, e a recuperação do patógeno e antagonista. O antagonista não promoveu o crescimento das plantas, entretanto protegeu-as do subdesenvolvimento causado pelo patógeno no sistema NFT. Não foi observada proteção em sistema “floating”. *Clonostachys* reduziu a incidência do patógeno nas raízes no sistema NFT em 28,6% e 42,8%, quando aplicado duas e três vezes, respectivamente.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*, biocontrole, antagonismo, hidroponia.

ABSTRACT

Biological control of *Pythium aphanidermatum* root rot and growth promotion of hydroponic lettuce by *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea was evaluated for growth promotion and control of root rot (*Pythium aphanidermatum*) in hydroponic lettuce in NFT and floating systems. For growth promotion, *Clonostachys* (0, 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ and 10⁷ conidia/mL) was added in nutrient solution (NS) and the mass of the plants was measured. To evaluate the control of the disease in NFT, *Clonostachys* was applied to the NS (10⁶ conidia/mL) i. one day after transplanting in the absence of *Pythium*; ii. three days before and simultaneously with *Pythium* infestation; and, iii. three days before, simultaneously and three days after *Pythium* infestation. To evaluate the control of root rot in floating system, *Clonostachys* was added in NS (10⁶ conidia/mL) i. four days before, and at the moment of pathogen infestation, and, ii. four days before, simultaneously, and four days after pathogen infestation. Plant mass and the recovery of pathogen and antagonist from the roots were evaluated. *Clonostachys* did not improve plant growth in the absence of *Pythium*. In the NFT system *Clonostachys* protected the plants from yield losses caused by *Pythium*, but not in the floating system. *Pythium* recovery from the roots was reduced by 28,6% and 42,8% when *Clonostachys* was applied two or three times, respectively.

Key words: *Lactuca sativa*, biocontrol, antagonist, hydroponic systems.

A alface é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil e destaca-se como a mais cultivada em sistemas hidropônicos. A principal técnica de cultivo hidropônico utilizado no Brasil é a de fluxo laminar de nutrientes, denominada NFT (“Nutrient Film Technique”). Apesar de oferecer vantagens como a antecipação do ciclo da cultura, o cultivo hidropônico exige cuidados especiais quanto à sanidade das plantas. A elevada densidade e uniformidade genética de plantas, a baixa diversidade biológica e a circulação da solução nutritiva no sistema favorecem a

dispersão de patógenos e o desenvolvimento de epidemias (Sutton et al., 2006).

Dentre os mais importantes e destrutivos patógenos das culturas em sistemas hidropônicos destacam-se espécies do gênero *Pythium* (Utkhede et al., 2000). *Pythium ultimum* Trow e *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. são espécies comumente associadas à podridão de raiz na cultura da alface hidropônica. A principal medida de controle da doença é a preventiva, por meio da utilização de mudas saudáveis, água de boa qualidade e uso de materiais e ferramentas não contaminadas (Sutton et al., 2006). Após a entrada de *Pythium* no sistema hidropônico podem ser adotadas medidas culturais para a sua desinfestação, como a limpeza por meio de soluções de cloro, radiação

Parte da Dissertação da primeira autora. Universidade Federal de Lavras. Lavras MG. 2006.

ultravioleta, filtração e elevação da temperatura da solução (Sutton et al., 2006). No entanto, medidas de desinfestação da solução nutritiva têm se mostrado pouco efetivas, pois não afetam a população do patógeno presente na zona de infecção das raízes (Khan et al., 2003; Sutton et al., 2006). O controle químico não é recomendado, pois não há fungicidas registrados para o patógeno nessa cultura no Brasil, além de, potencialmente, causarem fitotoxidez em alface cultivada em hidroponia (Utkhede et al., 2000). Em face dessas limitações, torna-se necessária a busca por alternativas para o controle da doença, sendo que a efetividade do biocontrole foi demonstrada em vários sistemas (Utkhede et al., 2000; Liu & Sutton, 2002; Khan et al., 2003). O isolado PG-710 de *Clonostachys rosea* (Link) Schroers, Samuels, Seifert e W. Gams protegeu as plantas de pepino contra a infecção por *Pythium* spp. e promoveu o crescimento, quando na presença do patógeno (Liu & Sutton, 2002). A introdução do isolado 88-710 de *C. rosea* na solução nutritiva promoveu o desenvolvimento da área foliar e do sistema radicular de plantas de pepino (Sutton et al., 2008). O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade do isolado Cr61 de *C. rosea*, obtido de restos culturais de roseira e pertencente à coleção da Embrapa Meio Ambiente, em promover o crescimento e controlar a podridão de raiz causada por *P. aphanidermatum* em alface hidropônica.

Nos estudos com promoção de crescimento, sementes de alface cv. Vera (Sakata Seed Sudamérica) foram semeadas em espuma fenólica, e, após 17 dias, foram transferidas para berçário no sistema NFT, com condutividade elétrica (CE) da solução nutritiva (Qualifertil) mantida a 0,7 mS/cm. Mudanças com 30 dias de idade foram transferidas para um sistema definitivo (NFT) formado por duas mesas (1,22 m de altura, 1,5 m de largura e 15% de declividade) sendo cada mesa composta por seis canaletas (5,9 m de comprimento com 23 furos de 5 cm de diâmetro), alimentadas individualmente por solução nutritiva (CE=1,5 mS/cm) por meio de bomba submersa com capacidade para 540 L/h (Sarlo Better, modelo B500) em tanques reservatórios de 50 L. O pH e a CE da solução nutritiva foram monitorados a cada quatro dias. O isolado de *C. rosea* (Cr61) foi multiplicado no substrato arroz em casca. Suspensões de conídios foram aplicadas nos tanques de solução nutritiva, 24 h após a transferência das plantas para o sistema definitivo, para atingir as concentrações finais de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 e 0 conídios/mL. Após 21 dias de desenvolvimento foram realizadas avaliações da massa fresca e seca das plantas. A população de *C. rosea* na solução nutritiva foi determinada no 4º e 19º dia após a sua introdução. Portanto, amostras retiradas dos tanques e diluídas em série foram transferidas para o meio BGTEA (200 g de batata, 15 g de D-glucose, 12 g de Ágar, 1000 mL de água destilada e 2 mL de Triton XR 100 + 100 mg de sulfato de estreptomicina adicionados após autoclavagem) contido em placas de Petri e incubadas por 72 h a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob luz constante, quando foi determinado o número de colônias. O experimento foi montado em duas bancadas

com seis linhas de cultivo cada (blocos), sendo cada linha composta por 20 plantas (unidades amostrais).

O controle biológico da podridão de raiz com *C. rosea* (Cr61) foi avaliado duas vezes, sendo uma no sistema NFT e outra no sistema “floating”. Para a produção do inóculo de *P. aphanidermatum* (isolado SP 1973, do Instituto de Botânica de São Paulo), discos contendo a cultura do patógeno foram transferidos para placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura V8 (100 mL de suco V8, 2 g de CaCO_3 e 16 g de Ágar em 900 mL de água destilada), com incubação por cinco dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob regime de luz contínua. A infestação do sistema NFT com o patógeno foi realizada por meio da introdução, nos tanques com 80 L de solução nutritiva, de um sachê de tela de náilon com cinco placas de meio de cultura V8 com o patógeno em pleno desenvolvimento, sendo retirado após três dias. Os seguintes tratamentos foram estudados: i. *C. rosea* aplicado 24 h após transferência das mudas e sem a infestação com o patógeno; ii. *C. rosea* aplicado três dias antes e no momento da infestação com o patógeno; iii. *C. rosea* três dias antes, no momento e três dias após a infestação com o patógeno; iv. testemunha sem inoculação e v. testemunha inoculada. Em todos os tratamentos com *C. rosea* foi utilizada a concentração de 10^6 conídios/mL de solução nutritiva obtida conforme descrito anteriormente. Mudanças de alface com 24 dias, produzidas conforme descrito anteriormente, foram transferidas para o sistema definitivo. Após 21 dias, foi avaliada a massa das plantas, bem como a recuperação de *P. aphanidermatum* e *C. rosea* das raízes. A recuperação do patógeno foi realizada transferindo 10 fragmentos de, aproximadamente, 1 cm de comprimento das raízes para meio de cultura Ágar-Água acrescido de ampicilina (250 mg/L) e rifampicina (10 mg/L). A incidência do patógeno na raiz foi determinada após quatro dias de incubação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob regime de luz constante. A mesma metodologia para a recuperação de *C. rosea* das raízes, descrita anteriormente, foi utilizada, porém em meio PCA (200 mg de cloranfenicol; 0,1 mL de paraquat e 16 g de Ágar, em 1000 mL de água). A temperatura da solução nutritiva foi monitorada diariamente no período da manhã e da tarde, por meio de um termômetro Chektemp®. O pH e a CE da solução nutritiva foram determinados a cada quatro dias. O experimento foi montado em duas bancadas com cinco linhas de cultivo cada (blocos), sendo cada linha composta por 12 plantas (unidades amostrais).

A mesma cultivar de alface e os mesmos isolados de *P. aphanidermatum* e de *C. rosea* foram utilizados no ensaio da avaliação do controle da doença em sistema “floating”. Mudanças de alface com 22 dias, produzidas em espuma fenólica, foram transferidas para bandejas de isopor contidas em caixas com 30 L de solução nutritiva (CE=1,5 mS/cm), sendo essas oxigenadas por meio de mangueiras ligadas a um compressor. A infestação com o patógeno foi realizada após oito dias da transferência das plantas para as caixas contendo solução nutritiva, conforme descrito no ensaio em NFT. *C. rosea* foi aplicado à solução nutritiva (10^6

conídios/mL) quatro dias antes e no momento da infestação com o patógeno; e quatro dias antes, no momento e quatro dias após a infestação com o patógeno. Os tratamentos foram comparados com a testemunha com e sem infestação com *P. aphanidermatum*. As plantas permaneceram por 26 dias no sistema “floating”, quando foram realizadas as avaliações descritas anteriormente. A recuperação do patógeno e o monitoramento da temperatura, da CE e do pH da solução nutritiva foram realizados conforme descritos anteriormente. O experimento foi montado em duas bancadas (blocos), contendo as caixas preenchidas com solução nutritiva e com as bandejas de isopor, sendo que, as bandejas foram compostas por 10 plantas (unidades amostrais). Para a análise dos resultados foi utilizado o pacote estatístico SAS® (SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo cada planta avaliada como uma sub-amostra dentro das parcelas em delineamento em blocos casualizados; e os tratamentos comparados pelo teste de Tukey.

Clonostachys rosea, nas concentrações de 10^3 a 10^7 conídios/mL, não promoveu o crescimento de alface cultivada em hidroponia quando aplicado 24 h após as plantas serem transferidas para o sistema definitivo. Apesar de não promover o crescimento da alface, *C. rosea* não causou efeito negativo no desenvolvimento das plantas, como o observado por Corrêa & Bettiol (2006), com a adição de *Trichoderma harzianum* (10^7 conídios/mL) na solução nutritiva. Vários fatores afetam a capacidade de promoção de crescimento de plantas por microrganismos, como o tipo do inóculo, a temperatura, o pH, a umidade, a composição da microbiota e a disponibilidade de nutrientes (Jjemba & Alexander, 1999). Assim, há necessidade de se estudar as melhores condições para a introdução de *C. rosea* com essa finalidade.

A população de *C. rosea*, após quatro dias de sua introdução nos tanques de solução nutritiva, foi de 0; 11; 10; 51 e 265 ufc/mL para os tratamentos nas concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 conídios/mL, respectivamente, sendo que não houve recuperação 19 dias após a sua introdução na solução nutritiva. A redução da população de *C. rosea* na solução pode ser explicada pela não adaptação do fungo a essas condições, acrescida pela falta de compostos orgânicos disponíveis neste ambiente para o seu crescimento. *C. rosea* é um fungo cosmopolita, podendo ser encontrado em diferentes ecossistemas em regiões tropicais, temperadas, subárticas e desérticas, sendo isolado em solos cultivados, pastos, matas, florestas, em água doce e em solos costeiros. (Sutton et al., 1997). A baixa sobrevivência do isolado Cr61 de *C. rosea* no ambiente hidropônico pode ser explicada pela maior capacidade de sobrevivência do isolado em ambientes terrestres do que em ambientes aquáticos, visto que o fungo foi isolado de restos culturais de roseira cultivada no solo. De acordo com Sutton et al. (2006), existe uma baixa disponibilidade de compostos orgânicos no início do desenvolvimento das plantas no sistema hidropônico. Entretanto, exsudados

são liberados pelas raízes para a solução possibilitando o desenvolvimento de microrganismos (Postma et al., 2008), com o desenvolvimento das plantas. Dessa forma, sugere-se que ocorra a re-introdução de *C. rosea* no sistema após a solução atingir essas condições; e que se trabalhe com isolados melhor adaptados às condições do sistema hidropônico.

Espécies de *Pythium* podem infectar raízes de alface cultivadas em hidroponia sem causar sintomas típicos da doença, como a podridão de raiz e a murcha, mas provocar o subdesenvolvimento das plantas (Utkhede et al., 2000). A aplicação de *C. rosea* foi efetiva na proteção das plantas cultivadas em sistema NFT contra a infecção do patógeno, incrementando significativamente as massas em relação à testemunha inoculada, independentemente do período de aplicação (Tabela 1). Muitas vezes essa redução no desenvolvimento não é percebida pelos produtores durante o cultivo, que perdem parte do investimento quando da comercialização. *Pythium* foi recuperado em 77% das raízes das plantas da testemunha inoculada com o patógeno. A incidência do patógeno nas raízes diminuiu proporcionalmente com a adição do antagonista na solução nutritiva, sendo de 55% quando *C. rosea* foi aplicado duas vezes e de 44% quando aplicado três vezes. Resultados semelhantes foram obtidos por Khan et al. (2003) na diminuição da incidência de *P. aphanidermatum* nas raízes de pepino hidropônico com a aplicação de *Pseudomonas chlororaphis*, e na prevenção da diminuição de biomassa, altura e produtividade. Nesse experimento a temperatura da solução nutritiva variou de 20 a 35°C, sendo favorável ao desenvolvimento da doença (Gold & Stanghellini, 1985; Sutton et al., 2006).

A recuperação de *C. rosea* ao final do experimento no sistema NFT foi de 100, 89 e 100% para as raízes dos tratamentos *C. rosea*, *C. rosea* (-3d e 0d) e *C. rosea* (-3d, 0d e +3d), respectivamente. A capacidade de colonização radicular é uma característica imprescindível de um agente de biocontrole de podridões radiculares (Howel, 2003). Os mecanismos de ação conhecidos de *C. rosea* são parasitismo, competição por nutrientes e por tecidos senescentes e indução de resistência (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2003). Considerando a efetiva presença de *C. rosea* nas raízes das plantas ao final do ensaio, a competição por espaço e nutrientes com o patógeno pode ter sido um dos mecanismos de sua ação no controle da podridão de raiz, sendo que a colonização das raízes senescentes por *C. rosea* pode ter desfavorecido a produção de inóculo secundário do patógeno.

No sistema “floating”, após 18 dias da inoculação do patógeno, observou-se redução em 41% na massa da parte aérea das plantas (Tabela 2). Nenhum tratamento controlou o subdesenvolvimento causado pelo patógeno, sendo esse re-isolado em todos os tratamentos em que foi aplicado. A temperatura da solução nutritiva durante o ensaio variou de 24,8 a 41,1°C, sendo essa condição um fator chave para o desenvolvimento da podridão de raiz causada por *Pythium*

TABELA 1 - Efeito de *Clonostachys rosea* sobre a massa fresca da parte aérea, do sistema radicular e total e massa seca do sistema radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico de fluxo laminar de nutrientes (NFT) infestado com *Pythium aphanidermatum*

Tratamento	Parte aérea	Massa fresca (g)		Massa seca (g)
		Sistema radicular	Total	Sistema radicular
Testemunha não inoculada	31,5 a ⁽¹⁾	189,8 a	219,1 a	1,3 ab
Testemunha inoculada	25,3 b	135,8b	161,3 b	1,1 b
<i>C. rosea</i> ⁽²⁾	34,5 a	180,6 a	215,6 a	1,4 a
<i>C. rosea</i> -2 aplicações ⁽³⁾	34,8 a	177,6 a	212,8 a	1,3 a
<i>C. rosea</i> -3 aplicações ⁽⁴⁾	36,3 a	172,2 a	208,3a	1,4a

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey 5%). ⁽²⁾*C. rosea* aplicado 1 dia após o transplante na ausência do patógeno. ⁽³⁾*C. rosea* aplicado três dias antes e no momento da infestação com o patógeno. ⁽⁴⁾*C. rosea* aplicado três dias antes, no momento e três dias após a infestação com o patógeno.

TABELA 2 - Efeito de *Clonostachys rosea* sobre a massa seca da parte aérea, do sistema radicular e total de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico “floating” infestado com *Pythium aphanidermatum*

Tratamento	Massa da parte aérea (g)	Massa do sistema radicular (g)	Massa total (g)
Testemunha não inoculada	0,48 a ⁽¹⁾	0,19 ⁽²⁾	0,67 a
Testemunha inoculada	0,28 b	0,18	0,46 b
<i>C. rosea</i> -2 aplicações ⁽³⁾	0,31 b	0,19	0,51 b
<i>C. rosea</i> -3 aplicações ⁽⁴⁾	0,29 b	0,19	0,48 b

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey 5%). ⁽²⁾Médias sem letra não foram significativas no teste F. ⁽³⁾*C. rosea* aplicado quatro dias antes e no momento da infestação com o patógeno. ⁽⁴⁾*C. rosea* aplicado quatro dias antes, no momento e quatro dias após a infestação com o patógeno.

(Sutton et al., 2006). Severas epidemias causadas por *P. aphanidermatum* em hidroponia são relatadas quando predominam elevadas temperaturas na zona radicular (Gold & Stanghellini, 1985; Sutton et al., 2006). Além das elevadas temperaturas na solução nutritiva, sistemas utilizando lâminas de água estáticas como o “floating” favorecem o desenvolvimento da podridão de raiz quando comparados com sistemas NFT (Gold & Stanghellini, 1985). Isto pode ser explicado pela maior concentração dos zoósporos na zona de infecção, pois esses não são transportados pela solução nutritiva. A maior predisposição das plantas devido a elevadas temperaturas da solução nutritiva e o cultivo em sistema “floating” pode explicar a ausência do controle por *C. rosea*. A capacidade de *C. rosea* em prevenir os danos causados pela colonização de *P. aphanidermatum* nas raízes de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico NFT, suprimindo o subdesenvolvimento das plantas ocasionado pelo patógeno, independente de não ter promovido o seu crescimento, indica a possibilidade de uso do antagonista nesse sistema de produção.

AGRADECIMENTO

O autor Wagner Bettiol agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Corrêa EB, Bettiol W (2006) Potencial de *Trichoderma* sp. em promover o crescimento de alface cultivada em sistema hidropônico. *Summa Phytopathologica* (Supl.) 32:S54.
- Gold SE, Stanghellini ME (1985) Effects of temperature on *Pythium* root rot of Spinach grown under hydroponic conditions. *Phytopathology* 75:333-337.
- Howell CR (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10.
- Jjemba PK, Alexander M (1999) Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. *Soil Biology & Biochemistry* 31:623-632.
- Khan A, Sutton JC, Grodzinski B (2003) Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. *Biocontrol Science and Technology* 13:615-630.
- Liu W, Sutton JC Effectiveness of microbial agents to protect *Pythium* root rot in hydroponic cucumber. Guelph: University of Guelph – Guelph – Department of Environmental Biology, 2002. Disponível em: < 199.86.26.61/online/BCTests/reports/2003/V023.pdf> Acesso em: set 2007.
- Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component on *Botrytis* blight management in commercial greenhouses.

Biological Control 26:311-317.

Postma J, Van Os E, Bonants PJM (2008) Pathogen detection and management strategies in soilless plant growing systems. In: Raviv M, Lieth JH (Eds.) Soilless culture: theory and practice. Amsterdam. Elsevier Publications. pp. 425-457.

Sutton JC, Li DW, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM (1997) *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. Plant Disease 81:316-328.

Sutton JC, Sopher CR, Owen-Going TN, Liu W, Grodzinski B, Hall JC, Benchimol RL (2006) Etiology and epidemiology of

Pythium root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. Summa Phytopathologica 32:307-321.

Sutton JC, Liu W, Ma J, Brown WG, Stewart JF, Walker GD (2008) Evaluation of the fungal endophyte *Clonostachys rosea* as an inoculant to enhance growth, fitness and productivity of crop plants. Acta Horticulturae 782:279-286.

Utkhede RS, Lévesque CA, Dinh D (2000) *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically-grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. Canadian Journal of Plant Pathology 22:138-144.

TPP 9110 - Recebido 26 Agosto 2009 - Aceito 14 Junho 2010
Editor de Seção: Marciel J. Stadnik