

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO DA PATOGENICIDADE E CONTROLE BIOLÓGICO DE
***FUSARIUM* sp. COM *TRICHODERMA* sp.**

CAROLINA DE OLIVEIRA FIALHO PEREIRA

Caxias do Sul, 2009.

CAROLINA DE OLIVEIRA FIALHO PEREIRA

ESTUDO DA PATOGENICIDADE E CONTROLE BIOLÓGICO DE

***FUSARIUM* sp. COM *TRICHODERMA* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rute Terezinha da Silva Ribeiro

Caxias do Sul, 2009.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

P436 Pereira, Carolina de Oliveira Fialho
Estudo da patogenicidade e controle biológico de *fusarium* sp. com
trichoderma sp. / Carolina de Oliveira Fialho Pereira. – 2013.
vii, 74f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia.
“Orientação: Profª Drª Rute Terezinha da Silva Ribeiro”

1. Fusarium. 2. Fungos – Tomate. 3. Controle biológico. I. Título.

CDU 2.ed. : 632.25

Índice para o catálogo sistemático:

1. Fusarium	632.25
2. Fungos – Tomate	632.25:635.64
3. Controle biológico	632.937

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Márcia Servi Gonçalves – CRB 10/1500

CAROLINA DE OLIVEIRA FIALHO PEREIRA

ESTUDO DA PATOGENICIDADE E CONTROLE BIOLÓGICO DE

FUSARIUM spp. COM TRICHODERMA spp.

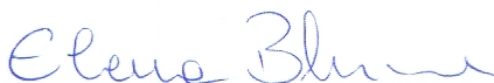
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rute Terezinha da Silva Ribeiro

DISSERTAÇÃO APROVADA EM VINTE E DOIS DE DEZEMBRO DE DOIS MIL E NOVE.



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rute Terezinha da Silva Ribeiro



Prof^a. Dr^a. Elena Blume (UFSM)



Prof. Dr. José Antônio Martinelli (UFRGS)



Prof^a. Dr^a. Neiva Monteiro de Barros (UCS)

**Aos meus pais Valentim e Maria Inês,
por sempre acreditarem.**

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Rute T. S. Ribeiro, pela paciência, dedicação e orientação.
- A CAPES pela concessão da bolsa que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos meus pais e irmãos, sempre presentes em todos os momentos, apoiando incondicionalmente minhas decisões.
- A minha avó, por ser um exemplo de força e perseverança.
- Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas Camila, Luís, Franciele, Rosemeri, Araceli, Fabiane, Elisa, Jaqueline, e em especial a técnica do laboratório e amiga Márcia, por toda a ajuda e consultas psicológicas de graça tomando um café.
- A todos os colegas e professores com quem convivi durante esses anos, em especial a colega Carina Cassini, pela ajuda nos surtos e momentos de dificuldade.
- As Professoras Mirian Salvador e Neiva Monteiro de Barros, pelas correções e sugestões muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho.
- As minhas amigas Taísa, Marina, Annia e Bárbara pelo ouvido nas horas de maior dificuldade, e pela amizade que transcende as barreiras geográficas e o tempo.
- Ao Sergio, pela paciência, amor e auxílio para todas as horas.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 O tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) e o fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	4
2.2 Formas de controle da doença	7
2.3 Raças de <i>Fusarium</i> sp. e compatibilidade vegetativa	11
2.4 Mecanismos de biocontrole empregados por <i>Trichoderma</i> sp.	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Micro-organismos	24
3.2 Meios de Cultura e Soluções	25
3.2.1 Meio BDA	25
3.2.2 Solução salina	26
3.2.3 Meio basal	26
3.2.4 Solução de Elementos Traços	26
3.2.5 Meio mínimo	26
3.2.6 Meio batata dextrose ágar com clorato	26
3.2.7 Manutenção dos microrganismos	27
3.2.8 Suspensão de conídios	27
3.2.9 Produção de conídios de <i>Fusarium</i> sp. e <i>Trichoderma</i> sp.	27
3.3 Teste de patogenicidade de <i>Fusarium</i> e identificação de raças	28
3.4 Testes de antagonismo	29
3.4.1 Avaliação de acordo com a escala de Bell <i>et al.</i> (1984)	30
3.4.2 Avaliação de inibição de crescimento da colônia de <i>Fusarium</i> sp.	32

3.5 Teste de produção de metabólitos voláteis	32
3.6 Testes de controle biológico de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Fusarium</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	33
3.7 Análise dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCG)	34
3.7.1 Geração de mutantes não utilizadores de nitrato	34
3.7.2 Caracterização de fenótipos de mutantes <i>nit</i>	35
3.7.3 Testes complementares	35
3.8 Métodos Estatísticos	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Testes de Patogenicidade	47
4.2 Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> sp. contra <i>Fusarium</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	40
4.2.1 Resultados de acordo com a Escala de Bell	40
4.2.2 Inibição de crescimento da colônia de <i>Fusarium</i> sp.	43
4.3 Avaliação da produção de metabólitos voláteis por <i>Trichoderma</i> sp.	46
4.4 Controle Biológico	55
4.5 Grupos de Compatibilidade Vegetativa	60
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta de tomateiro apresentando sintomas de fusariose	6
Figura 2. Via de utilização do nitrato e hipoxantina em <i>Neurospora crassa</i> e <i>Aspergillus nidulans</i> (adaptado de Correl <i>et al.</i> 1987).	14
Figura 3. Modelo simplificado identificando os passos no processo de interação da compatibilidade vegetativa e alguns dos genes relacionados a este processo (adaptado de Leslie & Zeller, 1996).	15
Figura 4. Anastomose entre mutantes de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cumerinum</i> gerados em meio contendo NaNO ₃ como fonte de nitrogênio (adaptado de Ahn <i>et al.</i> , 1998).	17
Figura 5. Estrutura química de alguns compostos produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. (adaptado de Vinale <i>et al.</i> 2005, 2008).	21
Figura 6. Processo de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sp. em <i>Rhizoctonia solani</i> . (adaptado de Harman <i>et al.</i> 2004).	23
Figura 7. Desenho esquemático da realização do teste de confronto direto entre isolados de <i>Fusarium</i> sp. e de <i>Trichoderma</i> sp.	31
Figura 8. Representação da escala de notas de Bell <i>et al.</i> (1982) modificada, utilizada nos testes de confronto direto para avaliação do antagonismo nas placas.	31
Figura 9. Desenho esquemático da realização do teste de produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> sp.	33
Figura 10. Plântulas de tomateiro inoculadas com isolado 1205/2 após 3 dias de tratamento.	37
Figura 11. Isolados de <i>Fusarium</i> sp. obtidos de plantas mortas com tratamentos com isolados 1205/2 e TO 11.	40
Figura 12. Micoparasitismo dos isolados T8 e T17 contra o isolado TO 11.	41
Figura 13. Sobreposição da colônia do isolado 26380 de Fol pelo isolado T1 de <i>Trichoderma</i> sp.	41
Figura 14. Inibição do crescimento do isolado TO 11 contra o isolado T4.	44

Figura 15. Diâmetro das colônias do isolado Fusarium 23 de <i>Fusarium</i> sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. em relação ao controle.	47
Figura 16. Diâmetro da colônia do isolado Fusarium 27 de <i>Fusarium</i> sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp., em relação ao controle.	47
Figura 17. Comparativo entre colônias do isolado Fusarium 27.	48
Figura 18. Diâmetro da colônia do isolado TO 11 de <i>Fusarium</i> sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp., em relação ao controle.	49
Figura 19. Diâmetro da colônia do isolado TO 245 de <i>Fusarium</i> sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp., em relação ao controle.	49
Figura 20. Diâmetro da colônia da linhagem 26380 de <i>Fusarium</i> sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados isolados de <i>Trichoderma</i> sp., em relação ao controle.	50
Figura 21. Comparativo entre colônias do isolado 26380, grupo controle (A), e na presença de metabólitos voláteis do isolado T8 (B).	50
Figura 22. Diâmetro da colônia da linhagem 34970 de <i>Fusarium</i> sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. em relação ao controle.	51
Figura 23. Colônias da linhagem 34970 em teste de metabólitos voláteis com isolado T17 de <i>Trichoderma</i> sp.	51
Figura 24. Diâmetro da colônia da linhagem OSU 451 de <i>Fusarium</i> sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. em relação ao controle.	52
Figura 25. Diâmetro da colônia da linhagem MM 66 de <i>Fusarium</i> sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. em relação ao grupo controle .	53
Figura 26. Diâmetro da colônia do isolado 1205/2 de <i>Fusarium</i> sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. em relação ao controle.	54
Figura 27. Testes de controle biológico.	55

Figura 28. Corte transversal de caule de planta de tomateiro apresentando entupimento dos vasos.	57
Figura 29. Altura das plantas de tomateiro em teste de controle biológico tratadas com os isolados T6 e T17 de <i>Trichoderma</i> sp., em relação ao tratamento controle contendo somente os isolados de Fol 1205/2 e TO 245.	58
Figura 30. Comprimento das raízes de plantas de tomateiro em teste de controle biológico tratadas com os isolados T6 e T17 de <i>Trichoderma</i> sp., em relação ao tratamento controle contendo somente os isolados de Fol 1205/2 e TO 245.	58
Figura 31. Peso seco da parte aérea das plantas de tomateiro em teste de controle biológico tratadas com os isolados T6 e T17 de <i>Trichoderma</i> sp., em relação ao tratamento controle contendo somente os isolados de Fol 1205/2 e TO 245.	59
Figura 32. Peso seco das raízes de plantas de tomateiro em teste de controle biológico tratadas com os isolados T6 e T17 de <i>Trichoderma</i> sp., em relação ao tratamento controle contendo somente os isolados de Fol 1205/2 e TO 245.	60
Figura 33. Colônias do isolado <i>Fusarium</i> 23 crescidas em meio BDC.	61
Figura 34. Colônias dos isolados TO 11 e 34970 crescidas em meio MM.	61
Figura 35. Heterocário de mutantes da linhagem 26380.	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Isolados de <i>Fusarium</i> sp. utilizados no presente trabalho.	24
Quadro 2. Isolados de <i>Trichoderma</i> sp. utilizados no presente trabalho.	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção, área e produtividade do cultivo de tomate no Brasil ao longo dos anos (IBGE).	5
Tabela 2. Grupos de compatibilidade vegetativa de <i>F. oxysporum</i> listados de acordo com formae specialis.	18
Tabela 3. Identificação de mutantes não utilizadores de nitrato (<i>nit</i>) de <i>Fusarium oxysporum</i> através do crescimento em diferentes fontes de nitrogênio (adaptado de Correl <i>et al.</i> 1987).	35
Tabela 4. Severidade de doença causada por isolados de <i>Fusarium</i> spp. após 15 e 30 dias de experimento em cultivares de tomateiro suscetível e resistente a raça 1, raças 1 e 2 e raça 3 de acordo com escala de Vakalouakis <i>et al.</i> (2004).	39
Tabela 5. Antagonismo <i>in vitro</i> entre linhagens de <i>Trichoderma</i> sp. e isolados de <i>Fusarium</i> sp. de acordo com a escala de Bell <i>et al.</i> (1982).	42
Tabela 6. Porcentagem da inibição do crescimento de isolados de <i>Fusarium</i> sp. ocasionado por <i>Trichoderma</i> sp. em teste de confronto direto, de acordo com a equação de Abdell-Fattah <i>et al.</i> (2007).	45
Tabela 7. Índice de severidade de doença em teste de controle biológico dos isolados TO 245 e 1205/2 de <i>Fusarium</i> sp. pelos isolados T6 e T17 de <i>Trichoderma</i> sp. de acordo com a escala de Vakalounakis <i>et al.</i> (2004).	56
Tabela 8. Raça e grupo de compatibilidade vegetativa dos isolados de Fol.	62

RESUMO

Os fungos fitopatogênicos pertencentes ao gênero *Fusarium* são conhecidos causadores de doenças de plantas em diversos hospedeiros. Dentre os quais se destaca o tomateiro, atacado pelas três raças conhecidas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), causadoras da murcha vascular. Para o controle dessa doença, o emprego de microrganismos, como os isolados antagonistas de *Trichoderma* sp. pode ser uma alternativa ao emprego de agroquímicos. No presente trabalho foi avaliada a patogenicidade de dez isolados de *Fol* em cultivares diferenciadoras de tomateiro, sendo que apenas quatro se mostraram patogênicos a cultivar suscetível, e nenhum deles foi diagnosticado como pertencente à raça 3. Os resultados obtidos nos testes de confronto direto com os isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram alta variabilidade em relação à capacidade micoparasítica, com os melhores resultados de sobreposição para os isolados T3, T8 e T17. Nestes casos foi observada evidência de sobreposição da colônia do hospedeiro para pelo menos seis dos nove isolados antagonistas. Em relação à capacidade inibitória destes isolados, os resultados de maior inibição de crescimento da colônia do fitopatógeno foram obtidos para os isolados T2 e T3. A linhagem 34970 de *Fol* foi a mais resistente às ações antagonistas dos isolados de *Trichoderma* sp., e o isolado TO 11 sofreu as maiores médias de inibição. Em teste de produção de metabólitos voláteis somente os isolados *Fusarium* 23, *Fusarium* 27 e 34970 de *Fol*, foram inibidos após 120 horas de teste. No controle biológico da fusariose do tomateiro, provocada pelo isolado TO 245 de *Fol*, as plântulas tratadas com os isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp. apresentaram menor incidência de doença, com notas iguais a 1,25 e 0,75 respectivamente em comparação a 1,87 do grupo controle, de acordo com a escala de severidade de doença de Vakalounakis *et al.* (2004). Os tratamentos com os isolados T6 e T17 em substrato contaminado com o isolado 1205/2 de *Fol* apresentaram valor de 0,50 e 0,38, de acordo com a escala, em comparação com 0,50 do tratamento controle. As médias de alturas, comprimento e peso seco das raízes não apresentaram diferença estatística para nenhum dos tratamentos, porém o peso seco da parte aérea foi significativamente maior para as plantas tratadas com o isolado T6 em substrato infestado pelo isolado 1205/2 de *Fol*. Todos os isolados patogênicos pareados com as linhagens padrão dos grupos de compatibilidade vegetativa apresentaram sinais de heterocariose com a linhagem padrão 34970 correspondente ao GCV 0030, indicando uma possível similaridade genética entre os isolados utilizados.

PALAVRAS-CHAVE: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; controle biológico; tomateiro; grupos de compatibilidade vegetativa.

ABSTRACT

Phytopathogenic fungi belonging to *Fusarium* genera are known as the agents responsible of many diseases in plants. Among these, tomato plants are attacked by the 3 races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), which causes vascular wilt. To control this disease, many techniques have been employed, mostly the use of resistant cultivars and chemical fungicides. Alternatively, the use of antagonistic microorganisms for biological control and decrease of inoculum of plant pathogens by introducing mass production of *Trichoderma* sp. has been studied for many years. In this study we evaluated the pathogenicity of 10 isolates of Fol on differential cultivars of tomato, where only four of ten isolates proved pathogenic to susceptible cultivar to this disease and none of which was diagnosed as belonging to race 3. The results obtained in tests of direct confrontation with *Trichoderma* sp. isolates showed high variability in relation to mycoparasitism, with the best results for aggressiveness the isolates T3, T8 and T17. In these cases it was observed evidence of growth of the host colony for at least six of nine isolates tested. Regarding the inhibitory effect of these isolates, the results of greater inhibition of colony growth of plant pathogenic fungus were obtained for the isolated T3 and T2. The strain 34970 of Fol was the least inhibited by isolates of *Trichoderma* sp., and isolated TO 11 showed the highest average of inhibition. With regards to the production of volatile metabolites, only the isolates Fusarium 23, Fusarium 27 and 34970 of Fol were inhibited after 120 hours of testing. In the biological control of Fusarium wilt of tomato caused by isolate TO 245, seedlings treated with isolates T6 and T17 of *Trichoderma* sp. showed a lower incidence of disease, with 1.25 and 0.75 respectively compared to 1.87 of the control group in accordance with scale of severity of disease by Vakalounakis *et al.* (2004). The treatments with the isolates T6 and T17 in substrate inoculated with isolate 1205/2 showed values of 0.5 and 0.375 according to the scale, compared with 0.5 in the control treatment without the presence of *Trichoderma* sp. The average height, length and dry weight of roots did not differ significantly for any treatment. The dry weight of shoot was significantly higher for plants treated with isolate T6 in substrate infested by the isolated 1205/2. All the pathogenic isolates of Fol were paired with the standard strains of vegetative compatibility groups and showed signs of heterokaryosis with the standard strain 34970 corresponding to VCG 0030, indicating a possible genetic similarity among the isolates used.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos cosmopolitas do gênero *Fusarium* Snyder & Hansen são conhecidos por causarem doenças em uma ampla variedade de plantas. A fusariose é uma doença vascular que provoca interrupção na translocação da seiva ascendente, redução do crescimento dos brotos, murcha de folhas e frutos e, escurecimento interno do caule. As plantas infectadas podem morrer subitamente e normalmente em reboleiras. Os prejuízos devidos a fusariose são decorrentes da infecção e morte de mudas, morte de plantas durante o desenvolvimento vegetativo e podridão dos frutos, que perdem seu valor comercial. O fungo ataca a planta a partir do solo, penetra em suas raízes, invade seu sistema vascular causando flexão e curvatura das folhas mais velhas, para baixo.

Entre as plantas hospedeiras de *Fusarium* spp. está o tomateiro, cuja cultura ocupou mundialmente, no ano de 2001, área superior a 3,7 milhões de hectares com uma produção de aproximadamente 100 milhões de toneladas. O Brasil tem se destacado entre os dez países maiores produtores, tendo alcançado em 2003, um total de 3.641.400 toneladas de tomate. A fusariose é uma das doenças mais disseminadas nos países onde esta hortaliça é cultivada. O uso de implementos para manejo de solos e controle de plantas daninhas causa ferimentos nas raízes, provocando aberturas que favorecem a infecção pelo fungo. Solos mal drenados e principalmente com excesso de matéria orgânica favorecem a ocorrência da doença. Altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar aumentam a sua severidade.

Para deter a ação do patógeno são utilizados métodos de controle físicos, culturais, químicos e biológicos. Um dos métodos de controle mais utilizados até recentemente era o da fumigação do solo com brometo de metila. Esse método é eficiente para desinfestação, entretanto é um dos responsáveis pela redução da camada de ozônio, sendo por esse motivo impostas

restrições a seu uso. No Brasil, a comercialização de brometo de metila para desinfestação dos solos é proibida. Atualmente, a técnica de controle da fusariose empregada baseia-se na utilização de cultivares modificadas geneticamente para resistência às diferentes raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H. N. Hans.

Entre as alternativas aos métodos convencionais de controle está à solarização, que consiste em cobrir o solo úmido com polietileno transparente durante os meses de maior radiação solar, com o objetivo de promover o aumento de sua temperatura e destruir propágulos dos fungos. Entretanto, esse método pode ser de alto custo e a maioria dos produtores prefere plantar no solo outra cultura. Outra técnica é o controle microbiológico do patógeno com microrganismos antagonistas para manter a população patogênica abaixo dos níveis passíveis de causar dano econômico à cultura.

Os fungos e as bactérias são os microrganismos mais utilizados para controle biológico. Entre os fungos, algumas espécies do gênero *Trichoderma* sp. Person têm se destacado como antagonistas de uma gama de patógenos causadores de doenças em várias culturas, entre esses *Fusarium* sp. Essas espécies de biocontrole possuem um amplo espectro de ação, atuando de diversas maneiras na interface planta/fitopatógeno e indiretamente, controlando várias doenças.

Entre as diversas formas de atuação, as espécies antagonistas de *Trichoderma* sp. desenvolvem micoparasitismo, antibiose, competição por nutrientes, indução de resistência e solubilização de nutrientes para as plantas. Outra característica relevante é a de que são altamente resistentes a uma ampla gama de substâncias tóxicas, o que leva a hipótese de sua utilização em sistemas de Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Para que o controle de doenças seja feito de uma maneira eficiente o conhecimento do agente causal de doenças é necessário. As técnicas moleculares e de compatibilidade vegetativa

servem para caracterização de isolados e para análises de similaridade genética além de auxiliarem a descobrir vias de introdução de doenças em determinadas regiões.

Tendo em vista que no Rio Grande do Sul há uma alta incidência da fusariose do tomateiro, propomos a caracterização de patogenicidade de alguns isolados, realização de testes de confronto direto e avaliação do efeito dos metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* sp. contra isolados de *Fusarium* f. sp. *lycopersici*, e caracterização dos grupos de compatibilidade vegetativa dos isolados de *Fusarium* f. sp. *lycopersici*, além do controle microbiológico da murcha do tomateiro com o emprego de isolados antagonistas de *Trichoderma* sp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e o fungo *Fusarium oxysporum*

A cultura de tomate é a terceira com maior volume de produção no Brasil. São comercializadas anualmente cerca de 3 milhões de toneladas, das quais 80% estão nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Goiás. A cultura do tomate de mesa é altamente sensível às pragas e doenças, exigindo uso intensivo de defensivos químicos, os quais oferecem grandes riscos de contaminação aos trabalhadores, consumidores e ambiente em geral (Santos & Noronha, 2001).

A produção global do tomate duplicou nos últimos 20 anos, sendo um dos principais fatores para a expansão da cultura, o crescimento do consumo reforçado pela procura por alimentos mais saudáveis. Entre 1985 e 2005, a produção mundial *per capita* de tomate cresceu cerca de 36%, passando de 14 kg para 19 kg por pessoa ao ano (Simão & Rodríguez, 2008).

De acordo com dados do IBGE, o rendimento médio deste cultivo é de cerca de 57.435 kg/ha de área cultivada, produtividade que vem aumentando ao longo do tempo devido aos avanços das técnicas fitossanitárias (Tabela 1). A exportação de tomates frescos, de tomates preparados ou conservados e na forma de molhos de tomate, no ano de 2005, foi de 476.9809 e 2.585 toneladas, respectivamente. Os principais países importadores foram Argentina, Paraguai e Uruguai.

Fusarium oxysporum Snyder & Hansen, é um fungo comumente encontrado no solo, onde sobrevive na forma de clamidósporos e cresce saprofiticamente na matéria orgânica. Essa espécie também inclui muitos patógenos de plantas que podem induzir necrose ou murchas em culturas de importância econômica.

Tabela 1: Produção, área e produtividade do cultivo de tomate no Brasil ao longo dos anos (IBGE, 2005).

Ano	Produção (kg)	Área colhida (1000. ha)	Rendimento médio (kg/ha)
1990	2.261	61	37.143
1991	2.344	61	38.510
1992	2.141	52	41.014
1993	2.348	54	43.706
1994	2.689	62	43.407
1995	2.715	62	43.752
1996	2.649	71	37.317
1997	2.718	65	41.781
1998	2.784	64	43.569
1999	3.305	66	50.356
2000	3.005	57	52.976
2001	3.103	57	53.980
2002	3.653	63	58.428
2003	3.709	63	58.423
2004	3.516	60	58.445
2005	3.155	55	57.435

A fusariose do tomateiro é causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) e ocorre em todas as regiões do Brasil. Na década de 70, nas áreas em que o cultivo já estava estabelecido por um período mais prolongado de tempo, era comum a destruição de 100% das plantas cultivadas ou a redução drástica do período de colheita devido à morte prematura das plantas (Galli, 1980).

Plantas de tomateiro com sintomas de fusariose apresentam murcha das folhas superiores, principalmente nas horas mais quentes do dia. As folhas mais velhas tornam-se amareladas e, muitas vezes, observa-se murcha ou amarelecimento em apenas um lado da planta ou da folha (Figura 1). Os frutos não se desenvolvem, amadurecem ainda pequenos e a produção é reduzida. Ao cortar o caule próximo às raízes, verifica-se necrose do sistema vascular (xilema). Temperaturas altas (em torno de 28 °C), solos arenosos com pH baixo e o ataque de nematóides

favorecem a doença. O fungo sobrevive no solo por períodos superiores há sete anos, principalmente por meio de microescleródios (estrutura de resistência do fungo) (Embrapa, 2008).



Figura 1: Planta de tomate apresentando sintomas de fusariose.

No Brasil a fusariose já foi uma doença importante para o tomateiro estaqueado, quando se plantavam variedades suscetíveis. Com o advento de cultivares resistentes às raças 1 e 2, no final dos anos 1970 a doença passou a apresentar uma importância menor. Nos últimos anos, porém, com o surgimento de uma terceira raça deste patógeno, medidas de controle eficientes e seguras têm se tornado prioridade no cultivo de tomate (Kimati *et al.* 2005).

Em determinadas regiões da China (Zhejiang), a fusariose tornou-se um problema sério, causando a morte de 30 a 60% das plantas de tomate cultivadas em estufa (Zhihao *et al.* 2000). Em relação ao cultivo hidropônico, a murcha causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* é uma das doenças que mais causa prejuízos, normalmente ocorrendo no estágio médio para final do período de cultivo. O controle é difícil devido ao fato de haver circulação da água contaminada, facilitando assim a disseminação deste patógeno para todas as plântulas (Song *et al.* 2004).

Na clínica de diagnose de doenças de plantas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, mais de 50% das amostras de plantas doentes têm recebido diagnóstico de doença causada por *Fusarium* spp. Dentre as espécies de plantas que são recebidas para análise, o tomateiro é o segundo que mais apresenta patologias, com menor número de amostras somente que a videira, a qual representa um cultivo muito comum na região nordeste do Estado do Rio Grande do Sul.

2.2 Formas de controle da doença

Dentre os fungicidas testados por Kopacki & Wagner (2006) para controle de *F. avenaceum* Fr. Sacc., patogênico ao crisântemo, somente foram eficientes na dose recomendada: difenoconazole, flusilazol e carbendazim. Aqueles que continham captan, mancozeb e chlorotanol, não inibiram o crescimento micelial dos fungos e nem apresentaram efeito duradouro na cultura em longo prazo. Outro aspecto a ser considerado é que ao se trabalhar com produtos químicos deve-se ter mais cautela em relação à variabilidade genética nas populações, já que os isolados patogênicos podem diferir na sensibilidade aos fungicidas.

Para o controle de *F. subglutinans* Wollenw. & Reinking, os únicos fungicidas que provocaram inibição de crescimento micelial a partir de 100 ppm foram tebuconazole e thiabendazole. Captan e tiofanato metílico, apresentaram inibição menor ou igual a 85%, mesmo sendo aplicada uma dose de 1000 ppm (Fischer *et al.* 2006).

Com sintomas muito semelhantes àqueles produzidos no tomateiro, no feijoeiro o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder é um dos maiores problemas fitossanitários da Colômbia e região Andina. O manejo convencional desta enfermidade pelos agricultores é difícil, sendo necessária à aplicação de fungicidas, que por vezes, se mostram

ineficientes incrementando os custos de produção, contribuindo para a contaminação ambiental e deteriorando a biota do solo (Avendaño *et al.* 2006).

Outro exemplo de insucesso de controle da murcha é verificado na videira, causada por *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*, considerada como um dos principais fatores de morte nas cultivares *Vitis riparia* e *V. berlandieri*. Segundo Andrade *et al.* (1993), a utilização de fungicidas químicos no controle do patógeno do sistema radicular da videira tem sido insuficiente. Assim, uma forma de controle da doença pode ser a utilização de plantas de variedades resistentes associadas à biofungicidas, o que poderia aumentar a eficiência do controle.

Outro hospedeiro suscetível ao patógeno é o abacaxizeiro, uma vez que as perdas podem atingir até 100% da produção. As cultivares mais plantadas no Brasil, são suscetíveis à doença, constituindo um problema sério de controle (Santos *et al.* 2002).

O cultivo da banana (*Musa* spp.), no Estado de Roraima é uma das principais atividades agrícolas de pequenos e médios produtores, com produção de cerca de 23.720 toneladas/ano. Dentre as doenças, o mal do Panamá, causado pelo fungo de solo *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Smith) Snyder & Hansen é considerada uma das principais, sendo a utilização de cultivares resistentes o principal método de controle empregado (Nechet *et al.* 2004).

O controle de doenças ocasionadas por *Fusarium* sp. envolve várias medidas e práticas culturais, incluindo todas aquelas de caráter preventivo como calagem, irrigação, adição de matéria orgânica e, principalmente o uso de cultivares que apresentam resistência genética (Carvalho *et al.* 2005).

O uso de cultivares resistentes se constitui em um dos métodos mais utilizados para evitar os prejuízos decorrentes da fusariose do tomateiro. Diferentes mecanismos foram descritos como possíveis responsáveis pela redução da colonização por fitopatógenos em cultivares resistentes, incluindo a formação de barreiras que previnem o progresso do fungo, confinamento do patógeno

ao xilema primário, proliferação de vasos livres do patógeno, restrição do crescimento do mesmo além de indução de produção de fitoalexinas (De Cal *et al.* 2000).

Dentre as formas clássicas de controle da fusariose empregadas, a rotação de culturas pode ser citada como um exemplo. Os sistemas de integração lavoura-pecuária também têm promovido a supressão de patógenos que sobrevivem no solo. Neste caso, a supressão de patógenos é creditada ao manejo de espécies de *Brachiaria* sp. que, junto ao aporte de matéria orgânica no solo e a formação de palhada, estimulam o desenvolvimento de fungos e bactérias que reduzem o inóculo de patógenos (Louzada *et al.* 2004).

O controle químico da fusariose tem se mostrado ineficiente e é um dos fatores que induzem pesquisadores e produtores rurais na busca de alternativas mais eficazes, porém, sem que provoquem aumento nos níveis de poluição do solo e da água.

Um método alternativo para o controle de doenças causadas por *Fusarium* sp. é o emprego de microrganismos antagonistas, como por exemplo, as bactérias antagonistas presentes na rizosfera das plantas. No caso da podridão radicular do pepino (*Cucumis sativus* L.), causada por *Fusarium solani* (Mart.) Hans, destacam-se *Bacillus subtilis* Cohn e *Pseudomonas* spp. Schroeter que podem chegar a inibir até 78% do crescimento micelial do patógeno (Melo & Valarini, 1995).

Em testes de confronto entre *Trichoderma harzianum* e *F. oxysporum* f. sp. *radicis* - *lycopersici* (Jarvis & Shoemaker) Hibar *et al.* (2005), obtiveram resultados de mais de 65% de inibição do patógeno após um período de 4 dias a 25°C. Decorridos 6 dias, *T. harzianum*, além de inibir crescimento micelial, também invadiu e esporulou sobre as colônias do patógeno, demonstrando a sua capacidade como micoparasita.

Utilizando a mesma técnica, Paradela (2002) avaliou *in vitro*, o comportamento de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* J. G. Kuhn e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. em

relação à 11 isolados de *Trichoderma* spp., e obteve resultados variados de antagonismo em relação às linhagens utilizadas. Os isolados de *Trichoderma* spp. comportaram-se de modo diferente em relação a agressividade, exercendo antagonismo do tipo antibiose, parasitismo e competição.

Fungos pertencentes a este gênero já foram relatados controlando com sucesso outras espécies de *Fusarium* sp., como no trabalho de Luongo *et al.* (2005) em que ocorreu significativa diminuição da esporulação de *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., *F. graminearum* (Schwein.) Petch, e *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, quando crescidos na presença do antagonista *Trichoderma*, de leveduras e de *Fusarium* não patogênico. A redução de esporulação variou entre quase 100% a menos de 20%, e muitos destes microrganismos foram selecionados para mais testes e potencial aplicação em milho e outras plantas.

Como uma alternativa que vem sendo empregada recentemente, a utilização de *F. oxysporum* não patogênico pode reduzir a severidade de doença e manter saudável o desenvolvimento das plantas. Plantas de tomateiro tratadas com suspensões de esporos desta forma não patogênica antes de serem transplantadas para substrato previamente infestado com isolados patogênicos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mostraram menor severidade da doença e médias de alturas maiores em relação ao controle que não recebeu o tratamento com *Fusarium* sp. não patogênico (Silva & Bettioli, 2005).

Larkin & Fravel (1998) utilizaram diferentes bactérias e fungos da rizosfera para controle da murcha vascular do tomateiro causada por *Fol.* Os resultados foram satisfatórios para *Fusarium* não patogênico (redução de até 100% de incidência da doença) e *T. hamatum* (64%), e para a combinação de *Fusarium* não patogênico com *Pseudomonas* (60%).

Apesar do aspecto promissor da utilização de *Fusarium* sp. não patogênico no controle da fusariose, ainda existe a necessidade de mais pesquisa nessa área já que os mecanismos de

controle ainda não foram totalmente compreendidos. Como exemplo da importância desses estudos, pode-se citar o trabalho de Forsyth *et al.* (2006) em que alguns isolados não patogênicos do gênero suprimiram a murcha causada por *Fusarium*, enquanto outros aumentaram o desenvolvimento da doença, o que reflete a diversidade de respostas do hospedeiro ao estímulo gerado pelo fungo. Não há, porém, uma explicação detalhada do motivo de ocorrência dessas diferenças de resposta ao desenvolvimento de doença.

2.3 Raças de *Fusarium* sp. e compatibilidade vegetativa

Isolados de *F. oxysporum* que são patogênicos ao mesmo hospedeiro, ou que possuem a mesma amplitude de hospedeiros, são designados *formae speciales*, sendo que já foram descritas mais de 70 destas formas (Kistler, 1997).

Quando há um alto nível de especialização, *formae speciales* podem ser associadas à patogenicidade em apenas uma espécie hospedeira. Muitas *formae speciales* podem ser subdivididas em raças, tendo-se como base a sua virulência em diferentes cultivares de um hospedeiro (Armstrong & Armstrong, 1981).

A expressão da resistência à raça-específica é qualitativa, completa ou quase completa, controlada por um ou poucos genes (monogênica, oligogênica) de grande efeito fenotípico conhecidos pela denominação de genes maiores ou genes de efeito principal. A expressão destes genes também pode ser modificada pela ação de outros genes maiores ou menores (epistasia), pelo estágio de desenvolvimento da planta e pelo tecido atacado (Stadnik & Talamini, 2004).

Em geral, esses genes (*R*) maiores de resistência operam em um sistema proposto por Flor (1971) de gene-a-gene com os genes de avirulência (*avr*) do patógeno. Essa hipótese implica que a incompatibilidade requer um gene dominante de resistência no hospedeiro e um gene dominante correspondente de avirulência no patógeno. Na ausência de um desses dois genes, o

reconhecimento do patógeno não ocorre, as defesas da planta não são iniciadas e ocorre a doença (Mes *et al.* 1999).

Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* têm sido agrupados em 3 raças de acordo com a sua habilidade de causar doenças em diferentes cultivares de tomate, possuidoras de diferentes loci de resistência à doença de acordo com Reis *et al.* (2004). Três loci de resistência já foram identificados em *Lycopersicon*. O locus I foi obtido de *L. pimpinellifolium* 'PI 79532', em 1940, e controla a resistência à raça 1. Um novo locus de resistência foi identificado e caracterizado no acesso 'PI 126915', que é um híbrido natural entre *L. esculentum* e *L. pimpinellifolium*, em 1945. Uma terceira raça de patógeno, capaz de infectar cultivares carregando ambos os loci I e II, foi registrado na Austrália (Grattidge & O' Brien, 1982), sendo posteriormente detectado em alguns estados nos Estados Unidos (Cai *et al.* 2003) e no México (Valenzuela-Ureta *et al.* 1996).

No Brasil, a raça 3 foi reportada no Estado do Espírito Santo no ano de 2005, quando Reis *et al.* (2005) analisaram a patogenicidade de sete isolados de *F. oxysporum* oriundos de plantas murchas de tomateiro das variedades 'Carmen' e 'Alambra', ambas consideradas resistentes às raças 1 e 2. Os resultados das aplicações destes isolados em variedades resistentes à raça 3 indicaram tratar-se desta mesma raça do patógeno, já que não houve incidência da doença nesta variedade.

O segundo relato desta raça no país foi feito no ano de 2007, no Estado do Rio de Janeiro por Reis & Boiteux (2007), que testaram através de testes de patogenicidade, isolados obtidos de plantas resistentes às raças 1 e 2 que apresentavam sintomas de doença. Sete destes isolados foram caracterizados como pertencentes à raça 3, reforçando a hipótese de transmissão da doença via sementes contaminadas, uma vez que registra o aparecimento quase simultâneo do mesmo patógeno em duas áreas de produção de tomate, geograficamente isoladas.

Atualmente a maioria das cultivares de tomate de mesa ou de processamento utilizados no Brasil possui genes de resistência para as raças 1 e 2 de Fol. Dessa forma, existe uma constante pressão de seleção sobre o patógeno, o que explica o fato de os isolados coletados mais recentemente no RJ e ES serem todos da raça 3 (Reis *et al.* 2006). Novas raças de *Fusarium*, causadoras de murcha que superam a resistência de cultivares comerciais, continuam surgindo. Essa afirmação talvez possa explicar porque a murcha do tomateiro permanece como uma doença séria e persistente, apesar dos esforços intensivos dos geneticistas no desenvolvimento de cultivares com genes de resistência (De Cal *et al.* 2000).

Recentemente, técnicas analíticas envolvendo fisiologia e compatibilidades vegetativas têm sido utilizadas para estudar a taxonomia, filogenia e as relações patogênicas entre espécies. Em genética, os testes de compatibilidade vegetativa tem sido úteis para a caracterização da diversidade entre isolados, podendo diferenciar populações patogênicas e não patogênicas. Além disso, a compatibilidade vegetativa serve como um marcador polimórfico, podendo também ser utilizado reconhecimento “self/ non-self”, como ferramenta para construção de mapas genéticos, para isogenização de linhagens e para identificar se duas linhagens são idênticas (Leslie, 1996).

A técnica de compatibilidade vegetativa foi desenvolvida por Puhalla (1985), a partir da técnica desenvolvida por Cove (1976), e obteve a geração de mutantes *nit* de *F. oxysporum* em meio contendo clorato. A seleção dos mutantes foi realizada ao serem repicados os setores de crescimento rápido das colônias para meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio e observado o crescimento ralo e sem micélio aéreo dos mutantes. A formação de heterocários de mutantes derivados da mesma linhagem parental era indicada pelo desenvolvimento de denso micélio aéreo na região de encontro das duas colônias dos mutantes *nit*, isto é, as colônias sofriam anastomose. Esses mutantes *nit* foram usados para forçar heterocariose e, por

consequência, testar isolados de *F. oxysporum* para compatibilidade vegetativa uns com os outros.

Para um maior conhecimento da compatibilidade vegetativa entre mutantes *nit*, a via de redução do nitrato foi bem caracterizada no trabalho de Correl *et al.* (1987). De acordo com esses autores são necessárias duas enzimas para reduzir nitrato a amônio (Figura 2), sendo que numerosos genes controlam a assimilação de nitrato e sua regulação é complexa. O clorato é um análogo do nitrato que tem sido muito útil para estudar a assimilação do nitrato em fungos. A redução de clorato para clorito, pela nitrato redutase pode resultar em toxicidade do clorato para estes microrganismos. Apesar de serem possíveis outros modos de ação, em geral linhagens sensíveis ao clorato podem reduzir nitrato a nitrito, mas linhagens resistentes ao clorato não conseguem. Isso explicaria o crescimento ralo das mutantes resistentes em meio mínimo contendo nitrato como única fonte de nitrogênio.

Estudando a via de redução do nitrato em *F. moniliforme*, Klittich & Leslie (1988) concluíram que o controle genético (loci *nit*) dessa espécie é muito similar ao encontrado em *Neurospora* e *Aspergillus*, porém a regulação do metabolismo do nitrogênio como um todo pode ser diferente.

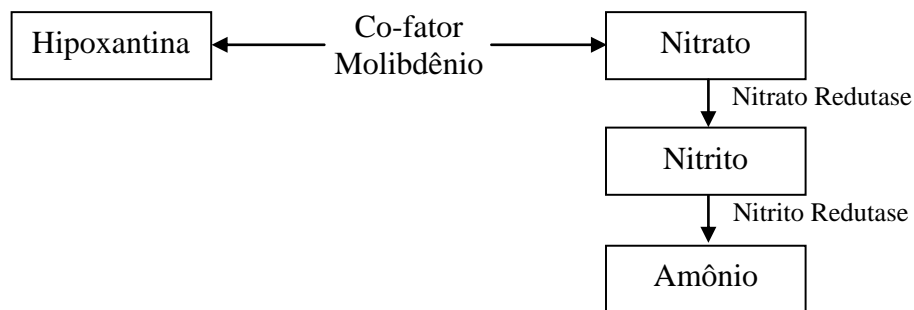


Figura 2. Via de utilização do nitrato e hipoxantina em *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans* (adaptado de Correl *et al.* 1987).

Quando dois isolados de um fungo são vegetativamente compatíveis, suas hifas podem fazer contato, fundir e formar heterocário que em muitos casos, forma-se quando alelos idênticos existem em cada locus *vic/het*. A heterocariose ou sua reação contrária de incompatibilidade já foram encontradas em muitos fungos incluindo *F. oxysporum*, nos quais a fase sexual não é conhecida e a troca de material genético ocorre através de mecanismos parassexuais (De Oliveira & Da Costa, 2003).

Os genes *het* pertencem a um grupo maior de genes responsáveis pelo estabelecimento e manutenção do heterocário estável (Figura 3). Os processos mecânicos e genéticos que levam a interação *het* começam antes da fusão de hifas, seguem por uma ou mais redes sinalizadoras e culminam na formação de um heterocário estável ou no processo de morte da célula (apoptose) (Leslie & Zeller, 1996).

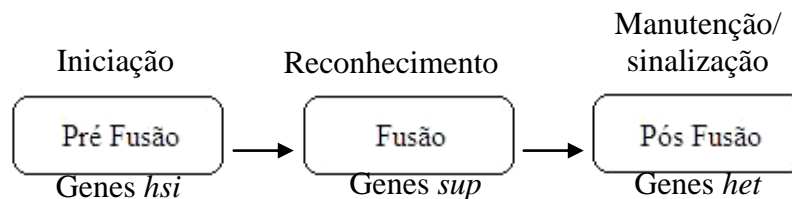


Figura 3. Modelo simplificado identificando os passos no processo de interação da compatibilidade vegetativa e alguns dos genes relacionados a este processo (adaptado de Leslie & Zeller, 1996).

Os isolados compatíveis ou não entre si são designados para grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) de acordo com sua capacidade de formar heterocário com uma linhagem padrão de cada grupo. Um alto grau de homologia é necessário para isolados serem compatíveis vegetativamente, sugerindo que raças patogênicas dentro de um mesmo GCV podem diferir em um número relativamente pequeno de loci. Diversidade patogênica dentro de um GCV indica o prospecto de interação parassexual potencialmente significativa, sendo que essa parassexualidade

pode levar ao desenvolvimento e disseminação de novas raças no futuro (Jacobson & Gordon, 1988).

Análises genéticas e enzimáticas em *F. oxysporum* sugerem que raças do mesmo GCV possuem relações muito próximas, enquanto isolados da mesma raça em GCVs diferentes são distintos uns dos outros. Neste sistema, é dado aos isolados de compatibilidade vegetativa um código consistindo de quatro ou cinco dígitos, com os primeiros três dígitos correspondendo a especialização ao hospedeiro, ou *formae speciales*, e os últimos dígitos correspondendo aos GCV's dentro das *formae speciales* (Kistler *et al.* 1998).

Desde o início de aplicação desta técnica de compatibilidade, mutantes *nit* têm sido utilizados para examinar os GCV's, as relações entre raças e GCV, e GCV e análises genéticas em muitas *formae speciales* (Ogiso *et al.* 2002). Quatro grupos de compatibilidade vegetativa já foram reportados para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. As raças 1 e 2 ocorrem nos GCV's 0030 a 0032 e a raça 3 ocorre nos GCV's 0030 e 0033 (Cai *et al.*, 2003).

Na tentativa de determinar a relação entre os GCVs e a virulência de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, Ahn *et al.* (1998) aplicaram a técnica de Correl *et al.* (1987) para geração de mutantes. Para esta forma *speciali* foi encontrada relação entre a virulência (raça) e o grupo de compatibilidade dos isolados, comprovado pela anastomose de hifas em meio mínimo (Figura 4). Esta associação entre raça e GCV, porém é rara em *F. oxysporum*, sendo sua causa ainda não comprovada.

Dentre as *formae speciales* de *F. oxysporum* com GCV's já analisados pode-se citar *vasinfectum* W.C. Snyder & H.N. Hansen (Fernandez *et al.* 1994), *cepae* W.C. Snyder & H.N. Hansen (Swift *et al.* 2002), *cucumerinum* Snyder & H.N. Hansen (Vakalounakis & Fragdiaskis, 1999), *gladioli* (Massey) Snyder & H.N. Hansen (Mes *et al.* 1994), *radicis-lycopersici* (Katan *et*

al. 1991), *lentis* W.L. Gordon (Belabid & Fortas, 2002) e para a espécie *F. graminearum* (McCallum *et al.* 2001).

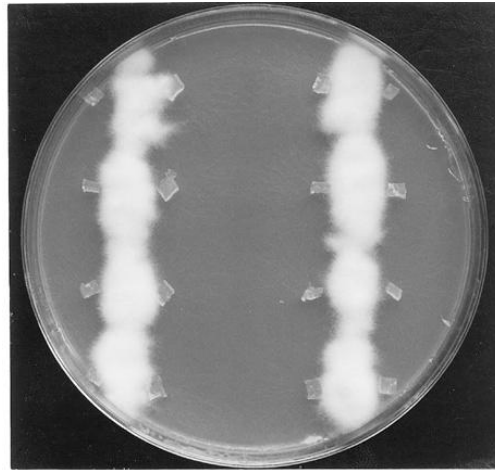


Figura 4. Anastomose entre mutantes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumerinum* gerados em meio contendo NaNO_3 como fonte de nitrogênio (Ahn *et al.* 1998).

Até o ano de 1999, haviam sido listadas 38 *formae speciales* em *F. oxysporum*, com 49 VCGs de acordo com Katan & Di Primo (1999) (Tabela 2).

Outra aplicação da utilização de GCV's é para a diferenciação correta entre *Fol* e *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, pois em situações ainda desconhecidas a campo, ocorre sobreposição dos sintomas causados por estes dois agentes patogênicos do tomateiro. Esses testes vêm sendo utilizados e têm se mostrado uma ferramenta eficiente para diferenciação de isolados (Gale *et al.* 2003).

Um grande número de GCV's é comumente registrado em fungos que se reproduzem sexualmente, como *F. moniliforme* (teleomorfo *Giberella fujikuroi*) J. Sheld. Em contraste, fungos que se reproduzem exclusivamente assexuadamente, como as *formae speciales* de *F. oxysporum*, em geral possuem GCV's subdivididos em grupos, o que indica um elevado grau de similaridade (Vakalounakis *et al.* 2004).

Tabela 2. Grupos de compatibilidade vegetativa de *F. oxysporum* listados de acordo com formae specialis.

formae speciales	Hospedeiro	Código f. sp.	Nºs designados para os GCV's	Número de GCV's
<i>adzukicola</i>	<i>Vigna angularis</i>	100-	1001-1008	17
<i>allii</i>	<i>Allium sativum</i>	040-	10011-10019	1
<i>asparagi</i>	<i>Asparagus</i>	036-	0400	2
<i>basilici</i>	<i>Ocimum</i>	042-	0420	1
<i>batatas</i>	<i>Ipomoea</i>	010-	0100, 0101, 0104	3
<i>cepae</i>	<i>Allium cepae</i>	012-	0120-0126; 0128-01224	24
<i>conglutinans</i>	<i>Brassica</i>	018-	0180-0183	6
<i>cubense</i>	<i>Musa</i>	002-	0020-0022 0025, 0027, 0028	6
<i>cucumerinum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	029-		2
<i>dianthi</i>	<i>Dianthus</i>	043-		4
<i>erythroxyli</i>	<i>Erythroxyllum</i>	101-	1011-1013	3
<i>fragariae</i>	<i>Fragaria</i>	034-	0340-0345	6
<i>garlic</i>	<i>Allium sativum</i>	041-		1
<i>gladioli</i>	<i>Gladiolus</i>	019-	0190	1
<i>lagenariae</i>	<i>Lagenaria</i>	044-	0440	1
<i>lilii</i>	<i>Lilium</i>	031-		2
<i>lini</i>	<i>Linum</i>	003-	0030-0033	4
<i>lupini</i>	<i>Lupinus</i>	032-	0320	1
<i>lycopersici</i>	<i>Lycopersicon</i>	013-	0130-0136, 0138	8
<i>melongenae</i>	<i>Solanum melongena</i>	008-	0080-0082	3
<i>melonis</i>	<i>Cucumis melo</i>	045-	0450-0456	7
<i>niveum</i>	<i>Citrullus</i>	016-	0161-0168	8
<i>opuntiarum</i>	<i>Opuntia</i>	007-	0070-0073	5
<i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	026-	0260, 0261	2
<i>lisi</i>	<i>Pisum</i>	009-	0090-0094 0096-0099	9
<i>radicis-cucumerinum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	022-	0220	1
<i>radicis-lycopersici</i>	<i>Lycopersicon</i>	033-	0330-0332	3
<i>raphani</i>	<i>Raphanus</i>	006-	0060	1
<i>spinaciae</i>	<i>Spinacia</i>	023-	0230	1
<i>tracheiphilum</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	020-	0201, 0202	2
<i>tulipae</i>	<i>Tulipa</i>	011-	0110-0119 01111-01112	12
<i>vanillae</i>	<i>Vanilla</i>	046-		
<i>vasinfectum</i>	<i>Gossypium</i>			
<i>zingiberi</i>	<i>Zingiber</i>			

GCV- grupo de compatibilidade vegetativa

f. sp.- formae specialis

2.4 Mecanismos de biocontrole empregados por *Trichoderma* sp.

Os fungos utilizados no biocontrole, pertencentes ao gênero *Trichoderma*, possuem capacidade de interagir parasiticamente e simbioticamente com diferentes substratos e organismos vivos, incluindo plantas e microrganismos. Podem utilizar uma variedade de fontes de nutrientes e estão entre os mais resistentes à ação antagonista de micróbios, toxinas e substâncias químicas, naturais ou produzidas pelo homem, além de poderem degradar algumas dessas moléculas (Woo *et al.* 2006).

Como exemplo desta resistência, espécies de *Trichoderma* podem produzir enzimas que degradam cianido e permitem o crescimento normal de plantas em solos com concentrações de 50 ou 100 ppm deste composto (Harman, 2006).

Os mecanismos de atuação pelos quais esses fungos agem são variados, podendo ocorrer através da produção de metabólitos voláteis ou não, competição por nutrientes e espaço, micoparasitismo, aumento da tolerância ao estresse da planta através de aumento de enraizamento e promoção de crescimento, solubilização e sequestro de nutrientes inorgânicos e inativação das enzimas dos patógenos (Harman, 2000).

A antibiose ocorre durante interações entre espécies de *Trichoderma* e outros fungos, envolvendo compostos difusíveis de baixo peso molecular ou antibióticos, inibidores de crescimento micelial de fungos alvo.

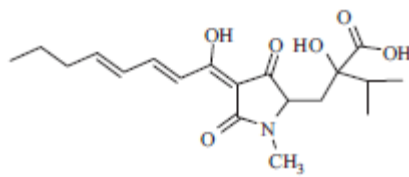
Dennis & Webster (1971a e b) relataram que espécies de *Trichoderma* produzem compostos voláteis e não voláteis capazes de inibir o crescimento micelial de uma variedade de fungos, e que esta produção de substâncias antifúngicas varia de acordo com o isolado. A produção de metabólitos secundários é linhagem dependente e inclui substâncias antifúngicas pertencentes a uma variedade de classes de compostos químicos. Eles foram classificados de

acordo com Ghisalberti & Sivasithamparam (1991) em três categorias: (i) antibióticos voláteis e derivados isocianidos; (ii) compostos solúveis em água; e (iii) “peptaibols”, que são oligopeptídeos lineares de 12 a 22 aminoácidos.

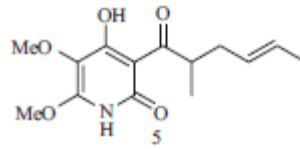
Dentre esses metabólitos (Figura 5) pode-se citar o ácido harziânico, alameticinas, tricolinas, massoilactona, harzianopiridona, glisopreninas, ácido heptelídico (Benítez *et al.* 2004), paracelsina, trichopolina A e B, trichorzianina, trichotoxina A, B e AB40 (Shaw & Taylor, 1986), antraquinonas, butenolides, izonotrininas (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991), gliotoxina e gliovirina (Howell, 2003), e trichoviridina, koninginina A, viridiol, viridina, harzianodiona (Vinale *et al.* 2008). Dentre os metabólitos mais estudados pode-se citar a harzianolide e a 6-n pentil-2H-piran-2-ona e seu análogo 6-n pentenil-2H-piran-2-ona, presentes em várias espécies de *Trichoderma* e responsável pelo aroma de côco associado aos fungos deste gênero, além de apresentarem boa atividade contra patógenos formadores de escleródios.

Segundo Howell (2006), o antibiótico gliotoxina é produzido por linhagens “Q” de *T. virens*, as quais possuem um espectro de ação contra bactérias, actinomicetos e fungos, e age sinergicamente com quitinases em atividades antifúngicas. Já, o antibiótico gliovirina produzido por linhagens “P” deste mesmo fungo possui um espectro mais limitado de ação e não é efetivo contra bactérias, actinomicetos e a maioria dos fungos, sendo um potente inibidor de oomicetos como *Pythium* spp. Pringsheim e *Phytophthora* spp. (Mont.) De Bary.

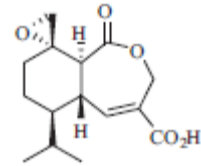
No trabalho de Küçük & Kivanç (2003) que avaliaram o efeito de metabólitos voláteis e não voláteis de *T. harzianum* contra vários fungos fitopatogênicos, foi constatado que os metabólitos não voláteis são mais efetivos para inibir o crescimento de *F. oxysporum*, *R. solanii* e *Sclerotium rolfsii* Sacc., em comparação aos voláteis.



ácido harziânico



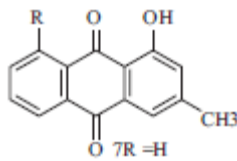
harzianopiridona



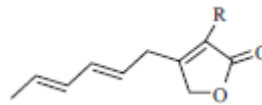
ácido heptelídico

Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Leu-Aib-Ile-Gln-Gln-Leuol

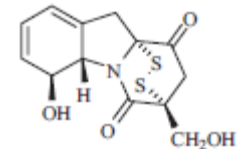
trichorzianina



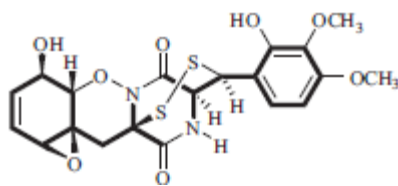
antraquinona



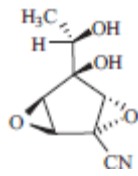
butenolides



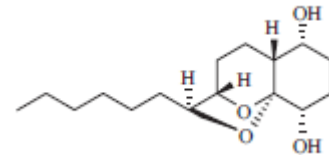
gliotoxina



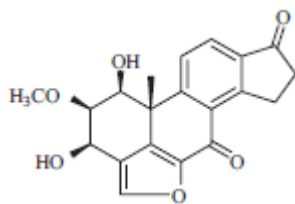
gliovirina



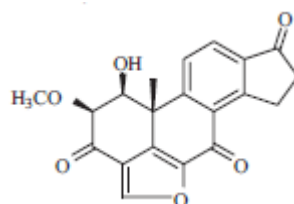
trichoviridina



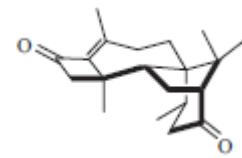
koningina A



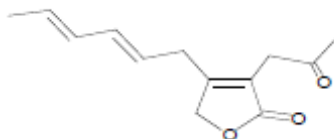
viridiol



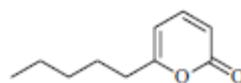
viridina



harzianodiona



harzianolide



6-n-pentil-2H-piran-2-ona

Figura 5. Estrutura química de alguns compostos produzidos por *Trichoderma* spp. (adaptado de Vinale *et al.* 2005, 2008).

Esses mesmos autores estudaram as interações entre linhagens antagonistas de *T. harzianum* e patógenos de plantas, presentes no solo (Küçük e Kivanç, 2004). A conclusão foi de que os metabólitos produzidos pelo antagonista inibem o crescimento de fitopatógenos como *Fusarium* sp.

A antibiose precede o micoparasitismo e colonização do hospedeiro, provocando efeitos diversos nas células dos hospedeiros, tais como: retração do plasmalema, quebra de organelas, desintegração do citoplasma e perda de turgor (Bélanger *et al.* 1995).

Os eventos que levam ao micoparasitismo (Figura 6) acontecem em uma série de passos que iniciam com a detecção de outros fungos e consequente crescimento ao redor destes por parte do antagonista. Após o contato inicial, *Trichoderma* sp. se prende ao hospedeiro, crescendo com movimento espiral ao redor da hifa e formando apressórios sobre a superfície da hifa alvo (Figura 6a). Ao finalizar essa etapa, produz uma série de enzimas degradadoras de parede celular e provavelmente alguns antibióticos, principalmente na interface entre o apressório e a hifa do fungo alvo. Os efeitos combinados destas atividades resultam na dissolução da parede da célula e parasitismo do fungo alvo (Figura 6b). Na região onde o apressório se prende, são produzidos orifícios com entrada direta da hifa de *Trichoderma* no lúmen do hospedeiro (Harman *et al.* 2004) (Figura 6c).

Uma lista parcial de gêneros de fungos patogênicos que podem ser afetados por *Trichoderma* spp. inclui: *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*, *Endothia*, *Fulvia*, *Fusarium*, *Fusicladium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Monilia*, *Nectria*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Venturia*, *Verticillium* e fungos causadores de podridões de madeira (Monte, 2001).

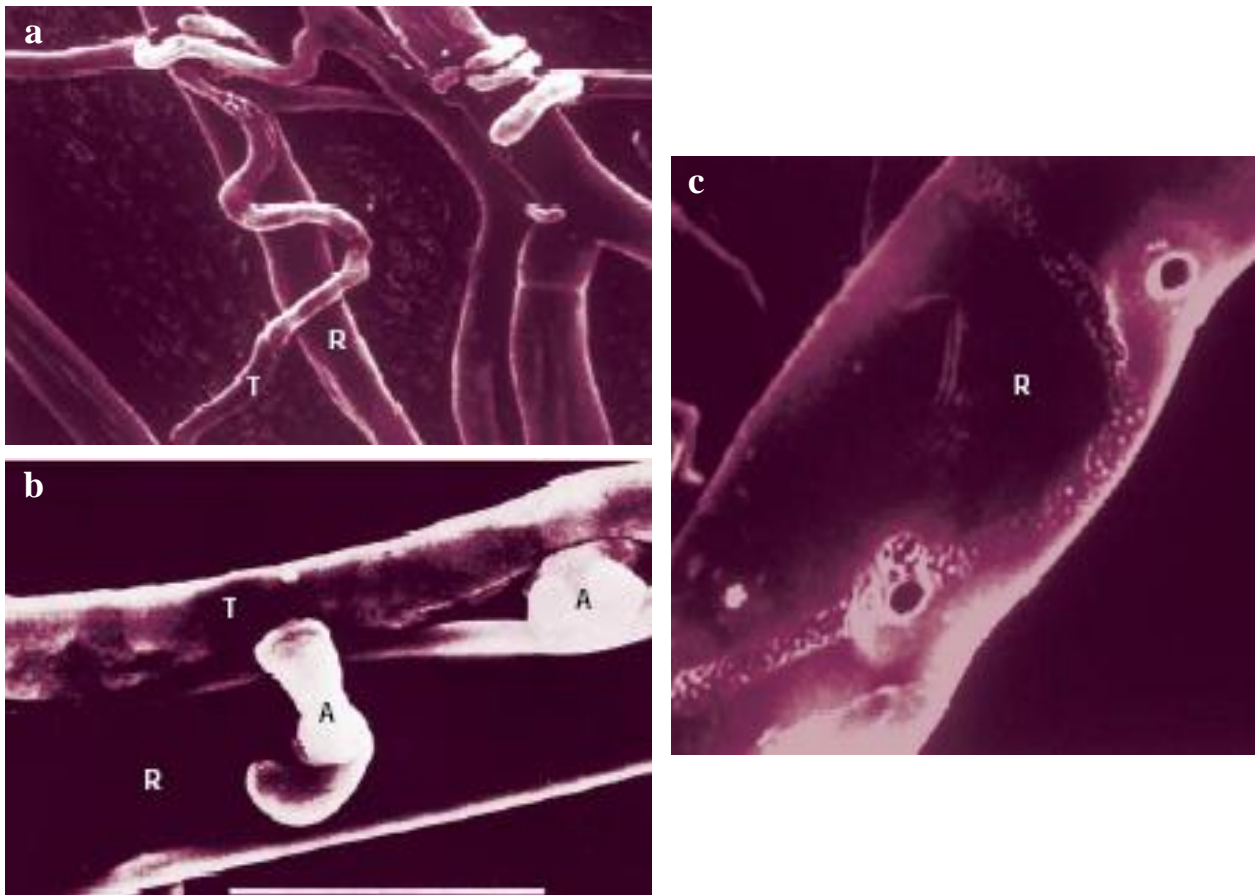


Figura 6. Processo de micoparasitismo de *Trichoderma* sp. em *Rhizoctonia solani*. (a) formação do apressório; (b) parasitismo na hifa do hospedeiro; (c) orifícios deixados pelo apressório. T- *Trichoderma* spp. R- *Rhizoctonia solani* A- apressório (adaptado de Harman *et al.* 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram os isolados de *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. de acordo com os quadros 1 e 2.

Quadro 1. Isolados de *Fusarium* sp. utilizados no presente trabalho.

Isolado/Linhagem	Origem Geográfica	Raça	VCG
589	Rio Grande do Sul	NI	NI
859	Rio Grande do Sul	NI	NI
921	Rio Grande do Sul	NI	NI
921/2	Rio Grande do Sul	NI	NI
1205/1	Rio Grande do Sul	NI	NI
1205/2	Rio Grande do Sul	NI	NI
Fusarium 23 [°]	Espírito Santo	2	NI
Fusarium 27 [°]	Espírito Santo	1	NI
TO 11 ^{°°}	São Paulo	2	NI
TO 245 ^{°°}	São Paulo	2	NI
26380*	Estados Unidos	3	0033
34970*	Estados Unidos	2	0030
MM 66**	Estados Unidos	2	0032
OSU 451**	Estados Unidos	2	0031

[°] Concedidos pelo Dr. Ailton Reis da Embrapa Hortaliças, Distrito Federal.

^{°°} Concedidos pelo Dr. Rômulo Kobori da Empresa Sakata Seeds através do Dr. Wagner Bettiol da Embrapa Meio Ambiente, Jagariúna-SP.

* Concedidas pela Dra. Kerry O' Donnell do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

** Concedidas pela Dra. Liane Rosewich Gale do Departamento de Patologia de Plantas da Universidade de Minnesota.

NI- não identificado.

Os isolados Fusarium 23, Fusarium 27, TO 11 e TO 245, tiveram suas raças identificadas e serviram como controle para identificação das mesmas nos testes de patogenicidade.

As linhagens 26380, 34970, OSU 451 e MM66 foram previamente identificadas como Fol, e são as linhagens padrão dos grupos de compatibilidade vegetativa desta *formae speciales*.

Os isolados 589, 859, 921, 921/2, 1205/1 e 1205/2 de *Fusarium* sp. pertencem à coleção do laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas e não possuíam identificação de espécie, raça e grupo de compatibilidade vegetativa.

Quadro 2. Isolados de *Trichoderma* sp. utilizados no presente trabalho.

Isolado	Cultura de origem	Origem geográfica
T1	Videira	Rio Grande do Sul
T2	Gérbera	Rio Grande do Sul
T3	Pepino	Rio Grande do Sul
T4	Videira	Rio Grande do Sul
T6	Amor perfeito	Rio Grande do Sul
T8	-	Rio Grande do Sul
T15	Macieira	Rio Grande do Sul
T17	Macieira	Rio Grande do Sul
T19	Macieira	Rio Grande do Sul
T5A	-	-

3.2 Meios de Cultura e Soluções

3.2.1 Meio BDA

Para a manutenção, crescimento e avaliação do antagonismo foi utilizado o meio BDA (Batata Dextrose Ágar). Foram pesados 200 gramas de batata descascadas e cozidas em 1 litro de água destilada por 20 minutos, o caldo foi filtrado e ao filtrado resultante foram acrescentados 20 gramas de glicose, 20 gramas de ágar e água autoclavada até completar 1L, sendo após autoclavado por 20 minutos, a 121 °C e 1 atm de pressão.

3.2.2 Solução salina

Foi constituída de 9 gramas de NaCl em 1 L de água destilada, sendo após autoclavada por 20 minutos, a 121 °C e 1 atm de pressão. Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente.

3.2.3 Meio basal

Em 1 L de água destilada foram acrescentados os seguintes reagentes: 30 g de sacarose, 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de KCl, 10 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 20 g de ágar e 0,2 mL de uma solução de elementos traços e autoclavado a 121 °C e 1 atm por 15 minutos.

3.2.4 Solução de elementos traços

Em 95 mL de água destilada foram acrescentados: 5g de ácido cítrico, 5g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 1g $\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 mg H_3BO_3 , 50 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ e autoclavado a 121 °C e 1 atm por 15 minutos.

3.2.5 Meio mínimo

Em 1 L de meio basal foi acrescentado 2g de NaNO_3 e autoclavado a 121 °C e 1 atm por 15 minutos.

3.2.6 Meio batata dextrose ágar com clorato

O meio batata dextrose ágar foi feito da maneira citada no item 3.2.1, sendo depois adicionado 15 g de KClO_3 e autoclavado a 121 °C e 1 atm por 15 minutos.

3.2.7 Manutenção dos micro-organismos

Os micro-organismos foram mantidos em meio BDA e repicados a cada período de 4 semanas. Após crescimento em estufa durante 7 dias, os repiques foram mantidos em refrigeração a temperatura de 4° C até repique posterior.

3.2.8 Suspensão de conídios

Na produção de suspensões de conídios de *Trichoderma* spp. foram utilizadas placas contendo meio BDA em cuja superfície foram desenvolvidas as linhagens por 7 dias a 28 °C com fotofase de 12 horas, em incubadora tipo BOD. Às placas foi acrescentada água destilada esterilizada e, com a o auxílio de uma alça de Drigalski a superfície foi lavada. A este conteúdo foi acrescentado água destilada e autoclavada suficiente para completar o volume de 50 mL de suspensão. A determinação da concentração de conídios na suspensão foi feita com o auxílio de uma Câmara de Neubauer.

3.2.9 Produção de conídios de *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp.

Como substrato de crescimento para o fungo foi utilizado milho pipoca triturado umedecido e esterilizado. O inóculo primário do fungo foi misturado a 100 g de grãos em sacos plásticos. Após sete dias de colonização em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas o milho foi incorporado ao substrato de enraizamento das plantas, na proporção de 20 g/kg de substrato conforme Melo & Valarini (1995). A concentração final de conídios foi determinada em Câmara de Neubauer a partir de uma suspensão feita com 1g de substrato colonizado diluído em 10 mL de solução salina, e a viabilidade foi avaliada por diluição plaqueamento em meio BDA e contagem de colônias.

Para a produção de conídios de *Trichoderma* sp. foi utilizada a mesma técnica, substituindo-se o milho pipoca por arroz.

3.3 Teste de patogenicidade de *Fusarium* e identificação de raças

A partir de placas de manutenção dos isolados de *Fusarium* sp., foi feita uma suspensão adicionando-se água destilada e autoclavada e lavando-se a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski para liberação de micélio e conídios. Após, a concentração da suspensão foi ajustada para 1×10^6 propágulos por mL, por meio de diluição quando necessário.

Foi empregado o seguinte conjunto de cultivares diferenciadoras de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Super Marmande (suscetível à todas as raças), Industrial (resistente à raça 1), Rasteiro (resistentes às raças 1 e 2), produzidas pela empresa Isla sementes. As sementes da cultivar BHRS-2,3 (resistente às três raças do patógeno) foram fornecidas pelo Dr. Ailton Reis, Embrapa Hortaliças e os experimentos foram realizados de acordo com Reis *et al.*, (2004).

As sementes dos genótipos foram semeadas no substrato comercial Plantmax® autoclavado, em bandejas plásticas medindo 29 cm x 43 cm, mantidas em estufa por 14 dias para enraizamento. Decorrido este período, as plântulas foram retiradas das bandejas e suas raízes lavadas em água corrente para retirada do substrato. A seguir, um segmento de cerca de 0,5 cm da extremidade de cada raiz, foi cortado e descartado. Na sequência, o sistema radicular de cada plântula foi mergulhado na suspensão de esporos do patógeno, durante 5 minutos, e logo depois as mesmas foram transferidas para bandejas de isopor de 128 células, preenchidas com substrato comercial autoclavado. Para o tratamento testemunha, foi utilizada apenas água destilada e autoclavada. Foi aplicado também 1 mL da suspensão de cada fungo nas células da bandeja

diretamente no substrato de enraizamento, para cada um dos testes. Cada tratamento foi avaliado em 10 plantas, com duas repetições.

A irrigação foi realizada diariamente com água potável, aumentando-se a quantidade de acordo com o desenvolvimento das plântulas.

A avaliação da severidade da doença foi realizada em 15 e 30 dias, baseando-se em escala de notas variando de 0 a 3 de acordo com Vakalounakis *et al.* (2004), relacionada com a presença de sintomas visíveis na parte aérea, como o aparecimento de folhas com o aspecto queimado, de cor marrom na base das plantas; folhas torcidas, cloróticas e/ou murchas; e planta morta. De acordo com a percentagem de sintomas visíveis na parte aérea, foi utilizada a escala a seguir:

- (0) - ausência de sintomas;
- (1) - murcha leve ou moderada, descoloração vascular leve do caule;
- (2) - murcha e descoloração vascular severas;
- (3) - planta morta.

Para confirmação de morte por fusariose, as plantas que apresentaram sinais da doença foram tratadas em uma solução de álcool 70% por 1 minuto, sendo em seguida imersas em solução 10% hipoclorito pelo mesmo período de tempo, deixadas para secar em capela e colocadas em placas de Petri contendo meio BDA de acordo com Alfenas & Mafia (2007). A confirmação da morte por *Fol* foi feita ao observar-se o crescimento de colônias do fitopatógeno a partir das plantas e das estruturas de crescimento e reprodução, ao microscópio ótico.

3.4 Testes de antagonismo

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* sp. contra os isolados de *Fol* foi avaliado de duas maneiras: pela escala de Bell *et al.* (1982) para avaliar o micoparasitismo em relação ao fungo fitopatogênico, e pela metodologia descrita por Abdell-Fattah *et al.* (2007).

Para antagonismo foram utilizados os isolados de *Fusarium* sp. que se mostraram patogênicos ao tomate nos testes de patogenicidade. Também foram incluídas nos testes as linhagens 26380 e 34970 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, linhagens padrão dos grupos de compatibilidade vegetativa e pertencentes à raça 3.

3.4.1 Avaliação de acordo com a escala de Bell *et al.* (1984)

Para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, foi transferido um disco de ágar colonizado pelo fungo fitopatogênico utilizando-se um tubo de Zeni, a 0,5 cm da borda da placa, que depois de fechada foi mantida em estufa BOD por 48 horas. Decorrido esse período, para a mesma placa foi transferido um disco de ágar colonizado por um isolado de *Trichoderma* sp. a 0,5 cm da borda da placa em ponto equidistante do inóculo do isolado de *Fusarium* sp., de acordo com a Figura 7. As placas foram mantidas em estufa a 26° C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e fotofase de 12 horas. Após oito dias foi realizada a avaliação do crescimento dos fungos, baseada no critério de Bell *et al.* (1982) adaptado, no qual foi utilizada a seguinte escala de notas de 1 a 5 (Figuras 7 e 8): (1) antagonista cresce e ocupa toda a placa; (2) antagonista cresce, sobrepondo-se sobre a colônia do patógeno (2/3 da placa); (2,5) antagonista cresce, sobrepondo-se somente sobre a borda da colônia do patógeno; (3) antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa (sem sobreposição); (4) patógeno cresce sobrepondo-se sobre a colônia do antagonista (2/3 da placa); (5) patógeno cresce e ocupa toda a placa.

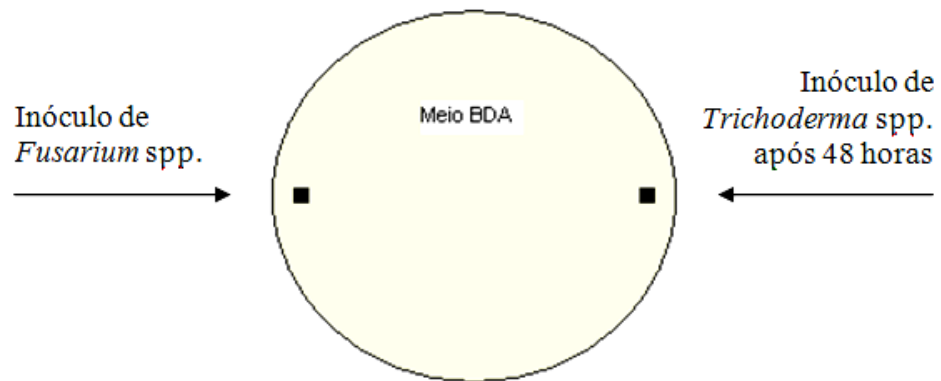


Figura 7. Desenho esquemático da realização do teste de confronto direto entre isolados de *Fusarium* sp. e de *Trichoderma* sp.

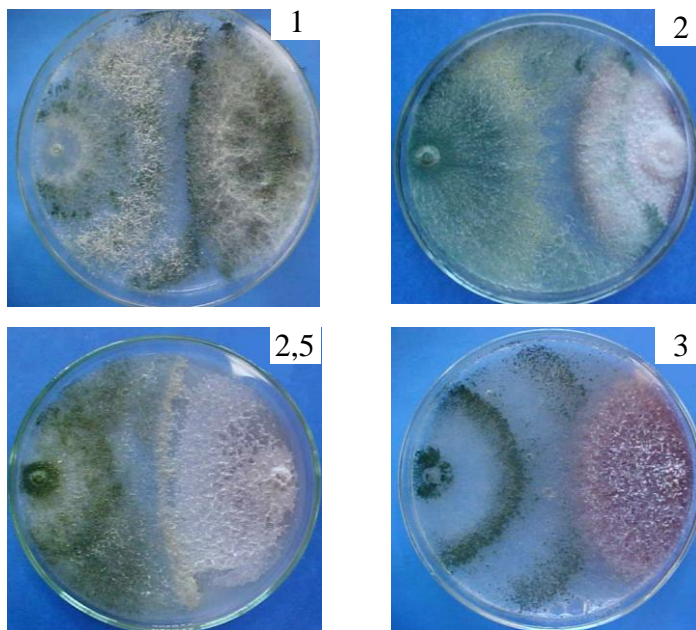


Figura 8. Representação da escala de notas de Bell *et al.* (1982) modificada, utilizada nos testes de confronto direto para avaliação do antagonismo nas placas. (1) Antagonista cresce e ocupa toda a placa; (2) Antagonista cresce, sobrepondo-se sobre a colônia do patógeno (2/3 da placa); (2,5) Antagonista cresce, sobrepondo-se somente sobre a borda da colônia do patógeno; (3) Antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa).

3.4.2 Avaliação de inibição de crescimento da colônia de *Fusarium* sp.

Os crescimento das colônias de *Fusarium* sp. foi medido decorridos 8 dias após a colocação do inóculo de *Trichoderma* sp. nos testes de confronto direto. Utilizando-se um paquímetro foi realizada medida do raio da colônia do fungo fitopatogênico confrontado com os isolados do antagonista, além da medida do grupo controle contendo somente o isolado de *Fusarium* sp.

Os resultados então foram avaliados de acordo com a seguinte fórmula de Abdell-Fattah *et al.* (2007) para calcular a porcentagem de inibição de crescimento provocado pelos isolados de *Trichoderma* sp.:

% inibição = $[\text{crescimento controle} - \text{crescimento teste} / \text{crescimento controle}] \times 100$; que indica a porcentagem de inibição da colônia do fungo antagonizado em relação ao controle.

3.5 Teste de produção de metabólitos voláteis

A avaliação do efeito dos metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* sp. *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Dennis & Webster (1971b) e Figura 9. Dois fundos de placas de Petri contendo meio BDA foram individualmente inoculados utilizando-se um tubo de Zeni, a partir de colônias do patógeno e do antagonista, crescidas em placas controle por cinco dias, sendo os fundos ajustados e fechados com fita crepe. O controle não continha o antagonista *Trichoderma* sp. As culturas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com fotofase de 12 horas. Os tratamentos foram conduzidos com três replicatas. O crescimento radial foi medido após 48 e 120 horas de incubação.

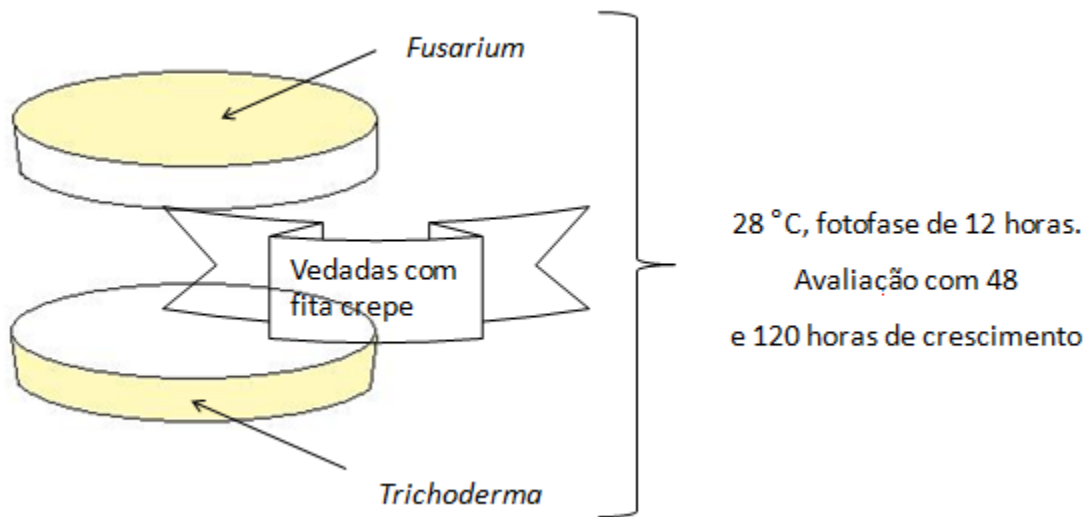


Figura 9. Desenho esquemático da realização do teste de produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* sp.

3.6 Testes de controle biológico de *Trichoderma* sobre *Fusarium f. sp. lycopersici*

Este experimento foi realizado com o tomateiro de forma preventiva de acordo com Melo & Valarini (1995). Foram utilizados os isolados T17 e T6 de *Trichoderma* sp., determinados de acordo com o experimento de confronto direto entre *Trichoderma* sp. e *Fusarium* sp. Foram utilizados os isolados 1205/2 e TO 245 de *Fol*, selecionados a partir dos resultados obtidos nos testes de patogenicidade.

Dez dias antes da semeadura das sementes de tomate, o solo foi tratado com 20 g de milho triturado e colonizado por *Fusarium* sp./kg de solo. Passado este período, foi determinada a população de *Fol* presente em um grama de solo misturado em 10 mL de solução salina em câmara de Neubauer. A viabilidade dos propágulos de *Fusarium* sp. foi verificada pela determinação do número de UFC presentes no substrato, em meio BDA. Para o tratamento biológico, o arroz colonizado pelos isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp. foi lavado em água até ser obtido uma suspensão com 1×10^8 conídios/mL. Plântulas de tomateiro com

aproximadamente 15 dias tiveram as extremidades de suas raízes cortadas (0,5 cm) e depois foram imersas em uma das suspensões de *Trichoderma* sp. por um período de 5 minutos, conforme o tratamento. Em seguida, as mudas foram transplantadas para os substratos infestados com um dos isolados 1205/2 ou TO 245 de *Fol.* Cada tratamento foi realizado em 10 plantas, acompanhado do tratamento controle.

A morte de plantas foi mensurada semanalmente e, após 45 dias foi avaliada a presença ou não de sintomas da doença de acordo com a escala de severidade da doença descrita por Vakalounakis *et al.* (2004). As medidas de alturas da plantas e comprimento das raízes foram determinadas utilizando-se uma régua milimetrada. O peso seco foi determinado separando-se a parte aérea das raízes e secando-se cada uma das partes em estufa por cerca de 48 horas a 50 °C. A confirmação de morte foi realizada de acordo com Alfenas & Mafia (2007), com identificação das estruturas reprodutivas do fungo ao microscópio ótico.

3.7 Análise dos grupos de compatibilidade vegetativa (GCV)

3.7.1 Geração de mutantes não utilizadores de nitrato

Os testes foram realizados de acordo com Correl *et al.* (1987), sendo os isolados de *Fusarium* sp. repicados de uma placa controle para placas contendo meio BDA acrescentado de clorato. Após o repique, as placas inoculadas foram mantidas em estufa BOD a 28 °C e fotofase de 12 horas. Diariamente foram analisados setores de crescimento mais rápido, sendo estes setores repicados para meio mínimo contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Neste meio as colônias que cresceram ralas e sem micélio aéreo foram consideradas mutantes *nit.*

3.7.2 Caracterização de fenótipos de mutantes *nit*

Os fenótipos destes mutantes foram designados em diferentes classes fenotípicas com base em seu crescimento em meio contendo uma das diferentes fontes de nitrogênio seguintes: meio mínimo, meio nitrito e meio hipoxantina. Para identificação, as colônias de mutantes foram repicadas para cada um destes meios e seu crescimento comparado com o parental após 4 dias de crescimento de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Identificação de mutantes não utilizadores de nitrato (*nit*) de *Fusarium oxysporum* através do crescimento em diferentes fontes de nitrogênio. (adaptado de Correl *et al.* 1987).

Mutação	Designação do mutante	Crescimento em diferentes fontes de nitrogênio ^a		
		Nitrato	Nitrito	Hipoxantina
Nenhuma	Selvagem	+	+	+
Nitrato redutase (locus estrutural)	<i>nit1</i>	-	+	+
Co-fator Molibdênio (<i>Loci</i>)	NitM	-	+	-

(a) Crescimento em meio basal com diferentes fontes de nitrogênio; (+) típico crescimento selvagem; (-) crescimento ralo sem micélio aéreo.

4.7.3 Testes complementares

Foram considerados mutantes compatíveis vegetativamente àqueles que complementaram um ao outro em meio mínimo, ocorrendo o desenvolvimento de micélio aéreo denso onde as colônias dos 2 mutantes *nit* se encontraram. O pareamento foi feito retirando-se o micélio de cada colônia com o auxílio de um tubo de Zeni e colocando-se a cerca de 1-2 cm de distância em placa de Petri contendo meio mínimo. As placas foram incubadas em estufa como descrito anteriormente por cerca de 14 dias e então avaliadas quanto à complementação (ocorrência de anastomose de hifas e formação de heterocáριο). Todos os mutantes *nit* recuperados do mesmo parental foram pareados com no mínimo um *nit1* e um NitM daquele mesmo parental. Um

mutante *nit1* e um mutante NitM de cada isolado foi pareado em todas as combinações possíveis com um mutante *nit1* e um Nit M de todos os isolados pra confirmação dos GCVs.

3.8 Métodos Estatísticos

Os resultados foram avaliados pela análise de variância One-Way ANOVA, com o pós-teste de Tukey para um $p < 0,05$, utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes de Patogenicidade

Embora oriundos de plantas de tomateiro, para a maioria dos isolados da Serra Gaúcha, após 15 dias de teste não foi observado sintomas de doença em nenhuma das cultivares utilizadas. Somente o isolado 1205/2 de *Fol* ocasionou sintomas de doença como amarelecimento e necrose das folhas mais velhas, murcha da planta seguida muitas vezes de morte, nas cultivares suscetível e na resistente à raça 1, alcançando nível 3 na escala, com morte de todas as plântulas contaminadas e não sendo observados sinais de doença na cultivar resistente às raças 1 e 2, assim como para a cultivar resistente à raça 3 (Figura 10).

Essa avirulência observada para os isolados da Serra Gaúcha talvez possa ser devido ao alto tempo de armazenamento em congelador de algumas amostras. Outra hipótese seria a de pressão de seleção por avirulência devido ao repique freqüente desses isolados em meio de cultura.

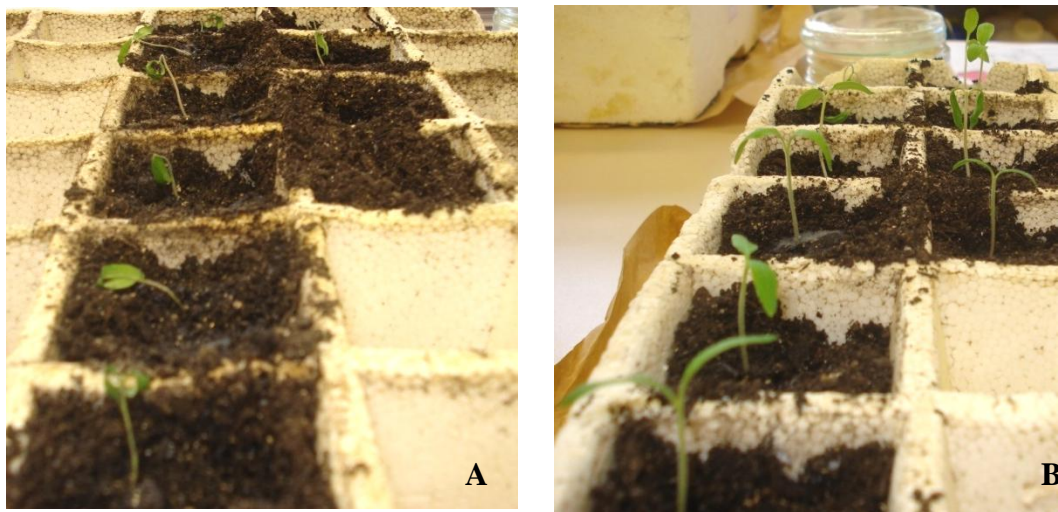


Figura 10. Plântulas de tomateiro inoculadas com isolado 1205/2 após 3 dias de tratamento. A- cultivar suscetível com sintomas de doença. B- cultivar resistente as raças 1 e 2 sem sintomas.

Os isolados TO 11 e TO 245, oriundos de São Paulo causaram sintomas de doença nas cultivares suscetível e resistente à raça 1, com notas de 1,7 e 2,6 de acordo com a escala de severidade de Vakalounakis *et al.* (2004). No entanto, nas cultivares resistentes as raças 2 e 3 não foram observados sintomas de doença.

Com os isolados Fusarium 23 e 27, oriundos do Espírito Santo foram observados sintomas em cultivar suscetível. Na cultivar resistente à raça 1 porém, somente Fusarium 23 causou sintomas de fusariose nas plântulas de tomate. Nas outras cultivares não foram observados sintomas de doença.

Com 30 dias de avaliação os resultados de patogenicidade, de acordo com a escala utilizada, foi observado a maior severidade para o isolado 1205/2, atingindo nível 3 na cultivar suscetível e 2,8 na cultivar resistente à raça. Este isolado foi classificado como pertencente à raça 2 já que não foram observados sintomas de doença em cultivar resistente as raças 1 e 2, e tampouco na cultivar resistente a raça 3.

O isolado TO 245 obteve nota de 2,6 e o isolado TO 11 nota de 2,55 em cultivar resistente a raça 1 (Tabela 4).

Para o isolado Fusarium 27 não houve incidência de doença em cultivar resistente a raça 1, e para Fusarium 23 a nota da severidade da doença foi de 1,70 (Tabela 4). Estes resultados confirmam as classificações em raças 1 e 2 respectivamente, de acordo com os resultados obtidos por Reis *et al.* (2005).

Nenhum dos isolados de *Fol* da Serra Gaúcha, causou sintomas de doença na cultivar resistente as raças 1 e 2, descartando a possibilidade de algum dos isolados serem pertencentes raça 3.

Os demais isolados testados não causaram doença em nenhuma das cultivares tratadas, sendo classificados como possíveis avirulentos. Da mesma forma, Cai *et al.* (2003) obtiveram

três isolados de *Fol* oriundos de plantas com sintomas de doença que não ocasionaram sintomas em cultivares suscetíveis, sendo classificados como endofíticos e não patogênicos.

Nenhum isolado pertencente à raça 3 foi detectado entre os seis isolados de *Fusarium* sp. obtidos de plantas com sintomas de murcha-de-fusarium no Estado do Rio Grande do Sul.

Os isolados TO 11, TO 245, Fusarium 23 e Fusarium 27 foram utilizados como controle de identificação das raças nas cultivares, já que possuíam raça conhecida, confirmando-se as mesmas nos testes de patogenicidade realizados.

Tabela 4. Severidade de doença causada por isolados de *Fusarium* sp. após 15 e 30 dias de experimento em cultivares de tomateiro suscetível e resistente à raça 1, raças 1 e 2 e raça 3 de acordo com escala de Vakalounakis *et al.* (2004): (0) - ausência de sintomas; (1) - murcha leve ou moderada, descoloração vascular leve do caule; (2) - murcha e descoloração vascular severas; (3) - planta morta;.

Isolados de <i>Fusarium</i>	Cultivares de tomateiro ^a							
	Super Marmande		Industrial		Rasteiro		BHRS-2,3	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
589	0	0	0	0	0	0	0	0
859	0	0	0	0	0	0	0	0
921	0	0	0	0	0	0	0	0
921/2	0	0	0	0	0	0	0	0
1205/1	0	0	0	0	0	0	0	0
1205/2	3	3 ^a	2,8 ^a	2,8 ^a	0	0	0	0
Fusarium 23	0,9 ^c	1,7 ^b	1,7 ^a	1,7 ^a	0	0	0	0
Fusarium 27	1,9 ^{ab}	2,2 ^{ab}	0	0	0	0	0	0
TO 11	1,5 ^b	2,7 ^{ab}	1,7 ^a	2,55 ^a	0	0	0	0
TO 245	1,8 ^{ab}	2,4 ^{ab}	2,6 ^a	2,6 ^a	0	0	0	0
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0

* Médias seguidas da mesma letra em cada dia de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey (p< 0,05).

^a - Cultivares diferenciadoras utilizadas para designação de raça: Super Marmande (susceptível), Industrial (resistente à raça 1), Rasteiro (resistente às raças 1 e 2) e BHRS-2,3 (resistente às raças 1, 2 e 3).

O reisolamento do agente causal da doença confirmou a morte causada por fusariose, já que se pôde observar as colônias de *Fusarium* sp. em placa de todas as amostras de plantas mortas (Figura 11).

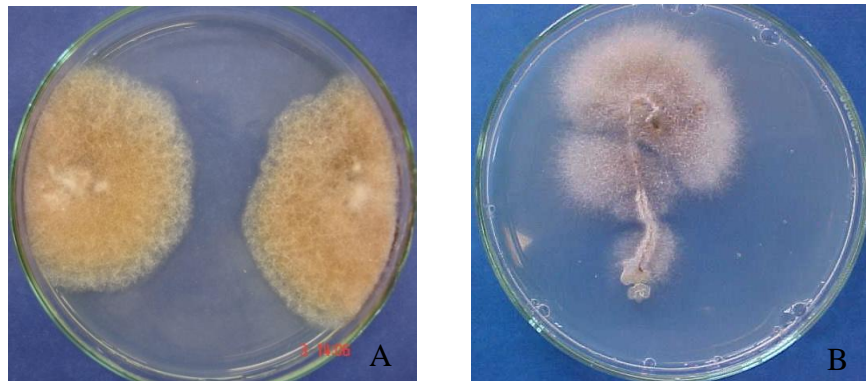


Figura 11. Isolados de *Fusarium* sp. obtidos de plantas mortas com tratamentos com isolados 1205/2 (A) e TO 11 (B)

4.2 Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* contra *Fusarium* f. sp. *lycopersici*

4.2.1 Resultados de acordo com a Escala de Bell

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados obtidos, podendo ser observado que as menores médias gerais da escala foram alcançadas com os isolados T3, T8 e T17. Para o isolado *Fusarium* 23, a diferença estatística entre os valores dos efeitos alcançados por cada um dos isolados de *Trichoderma* sp. confrontados, não foi significativamente diferente, porém, todos diferiram do tratamento testemunha contendo somente o isolado de *Fol*.

Para o isolado *Fusarium* 27, as menores médias foram apresentadas com os isolados T3, T8 e T17 de *Trichoderma* sp. com evidências de micoparasitismo sobre o fungo fitopatogênico. Sobre o isolado TO 11 de *Fol* os isolados T8 e T17 de *Trichoderma* sp. ocuparam 2/3 da superfície do meio de cultura, esporulando e sobrepondo a colônia do hospedeiro sugerindo uma forte ação micoparasita (Figura 12). Da mesma forma, os isolados T1, T3, T8 e T 17 cresceram sobre o isolado TO 245, sendo que T17 sobrepôs totalmente à colônia do patógeno.

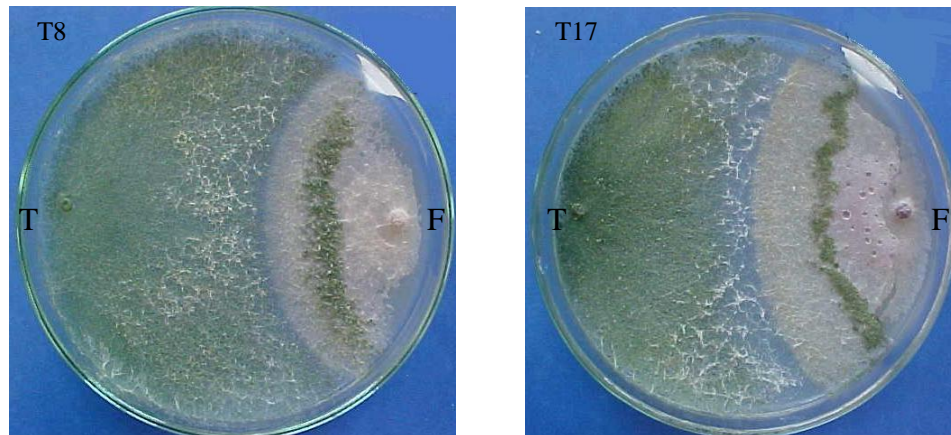


Figura 12. Micoparasitismo dos isolados T8 e T17 contra o isolado TO 11. Em cada placa, (T) = *Trichoderma*, (F) = *Fusarium*.

Na avaliação do antagonismo de todos os isolados de *Trichoderma* sp. sobre a linhagem 26380 de *Fusarium* sp., todos os resultados foram significativos em relação ao tratamento testemunha. A maior diferença encontrada foi quando em confronto direto com o isolado T15. Não diferiram do isolado T15 de *Trichoderma* sp. os isolados T1, T3, T17, T19 e T5A, com evidência de sobreposição da colônia do fungo fitopatogênico em pelo menos uma das replicatas testadas (Figura 13).



Figura 13. Sobreposição da colônia da linhagem 26380 de Fol pelo isolado T1 de *Trichoderma* sp.

Em relação à linhagem 34970 de *Fusarium* sp., oriunda dos Estados Unidos, a sobreposição total da colônia do fitopatógeno somente foi observada com o isolado T17. Não houve diferença estatística entre os demais isolados, porém, todos diferiram do tratamento testemunha.

As observações de micoparasitismo só foram verificadas para o isolado 1205/2 de *Fusarium* sp. da serra gaúcha contra o isolado T3 e T8 de *Trichoderma* sp. Os demais isolados antagonistas não diferiram significativamente do tratamento testemunha.

Tabela 5. Notas do antagonismo *in vitro* entre linhagens de *Trichoderma* sp. e isolados de *Fusarium* sp. de acordo com a escala de Bell *et al.* (1982) (1)- Antagonista cresce e ocupa toda a placa; (2)- Antagonista cresce, sobrepondo-se sobre a colônia do patógeno (2/3 da placa); (2,5)- Antagonista cresce, sobrepondo-se somente sobre a borda da colônia do patógeno; (3)- Antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa (nenhum organismo sobrepõe o outro); (4)- Patógeno cresce sobrepondo-se sobre a colônia do antagonista (2/3 da placa); (5)- Patógeno cresce e ocupa toda a placa;

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>								
	Notas do antagonismo								
	Fus. 23	Fus. 27	TO 11	TO 245	26380	34970	MM66	OSU 451	1205/2
T1	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	2 ^{ca}	2 ^{cdA}	2,83 ^{ba}	2,33 ^{ba}	2,83 ^{ba}	3 ^{aA}
T2	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{aA}
T3	3 ^{bb}	2,33 ^{caB}	3 ^{bb}	2 ^{caB}	2,66 ^{bcdAB}	3 ^{bb}	2,5 ^{baB}	2,5 ^{baB}	1,66 ^{ba}
T4	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	2,83 ^{bcA}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{aA}
T6	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{aA}
T8	3 ^{ba}	2,7 ^{bcA}	2 ^{ca}	2 ^{ca}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	1,66 ^{ca}	2,83 ^{ba}	2,66 ^{abA}
T15	2,66 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	1,66 ^{da}	2,5 ^{ba}	2,83 ^{ba}	2,5 ^{ba}	3 ^{aA}
T17	2,66 ^{ba}	2 ^{ca}	2 ^{ca}	1,66 ^{ca}	2,16 ^{cdA}	1,83 ^{ca}	2 ^{ca}	1,66 ^{ca}	3 ^{aA}
T19	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	2,66 ^{ba}	2,33 ^{cdA}	2,83 ^{ba}	2,66 ^{ba}	2,5 ^{ba}	3 ^{aA}
T5A	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	2,33 ^{cdB}	2,66 ^{baB}	3 ^{ba}	3 ^{ba}	3 ^{aA}
Testemunha	4 ^a	4 ^a	4,66 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

** Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fus. 23= *Fusarium* 23; Fus. 27= *Fusarium* 27.

Os resultados obtidos indicam o potencial dos isolados de *Trichoderma* sp. em relação à capacidade de micoparasitismo quando comparados aos resultados observados por Gómez *et al.* (1997), em que dez isolados de *Trichoderma* sp. mostraram maior capacidade de antagonismo contra *Rhizoctonia* sp., com apenas um resultado de sobreposição em teste de confronto direto contra *Fusarium* sp. Os resultados encontrados nos testes de confronto direto no atual trabalho, sugerem o potencial de aplicação dos isolados T3, T8 e T17 no controle de *Fol*, desde que apresentaram sobreposição de colônias em pelo menos seis dos nove isolados de *Fusarium* sp. confrontados.

A capacidade de biocontrole, no entanto, depende de vários fatores além do micoparasitismo, sendo o método de confronto direto uma das maneiras de realizar seleção de isolados com potencial de aplicação em controle biológico. Esta hipótese pode ser reforçada pelo trabalho de Sánchez *et al.* (2007) que observaram que o parasitismo de *T. longibrachiatum* em *Thielaviopsis paradoxa* é feito através da produção de enzimas extracelulares que degradam os constituintes da parede celular e de metabólitos difusíveis não voláteis que também estão envolvidos no antagonismo por *Trichoderma* sp.

4.2.2 Inibição de crescimento da colônia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

As médias dos dados de inibição de crescimento situaram-se entre 31% e 53%. O isolado T3 de *Trichoderma* sp. inibiu em uma média de 53% o desenvolvimento fúngico do fitopatógeno *Fusarium* 23, sendo que contra todos os outros isolados do antagonista, exceto o isolado T19, não houve diferença estatística (Tabela 6).

O comportamento do isolado *Fusarium* 27 diante dos isolados de *Trichoderma* sp., serviu como base para dividir estes últimos em dois grupos: (1) provocaram maior inibição do fungo

alvo, como os isolados T2, T3, T4, T6 e T8; e (2) provocaram menor inibição, representados pelos isolados restantes. O maior valor ficou em 47% de inibição e o menor em 37%.

O isolado TO 11 de *Fusarium* sp. apresentou as maiores médias de inibição, com o maior valor de 53%, determinado pelos isolados T1, T2 e T4 (Figura 14), e o menor valor de 42% contra o isolado de *Trichoderma* sp. T15.

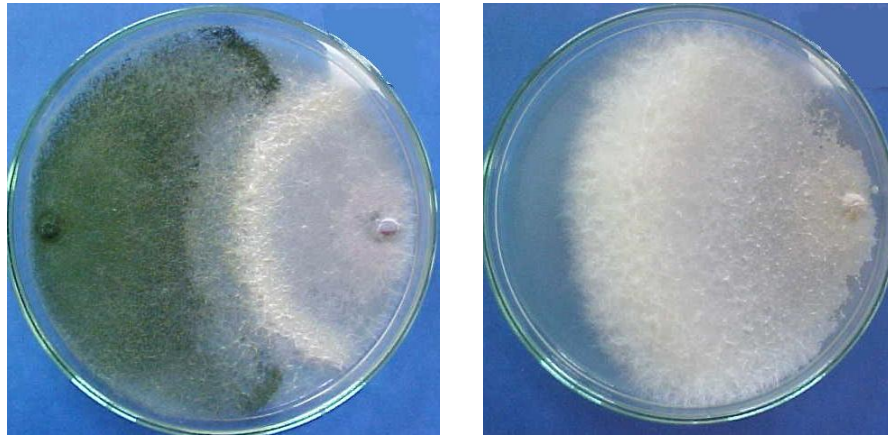


Figura 14. Inibição do crescimento do isolado TO 11 contra o isolado T4.

Não houve diferença significativa entre os isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolado TO 245, com um valor médio total de inibição de 36%.

Para a linhagem 26380 de *Fol*, a maior inibição foi quando confrontada diretamente com os isolados T2 ou T3, com 44% e 47%, respectivamente e, em relação à linhagem 34970 do patógeno não houve resultados significativos de inibição de crescimento.

Os testes de confronto direto dos isolados T3 e T8 de *Trichoderma* sp. contra o isolado 1205/2 de *Fusarium* sp. apresentaram as maiores médias de inibição (46%). A menor inibição (30%) foi encontrada quando confrontada contra o isolado T5A de *Trichoderma* sp. (Tabela 6).

A linhagem MM6 apresentou os menores valores médios de inibição contra o isolado T19 de *Trichoderma* sp., com apenas 29%, e as maiores médias de inibição contra o isolado T1, com 44% de inibição.

Para a linhagem OSU 451 de *Fol*, os menores valores de inibição foram observados no confronto com os isolados T19, T15 e T2, e com maior inibição com T1, T4, T6 e T5A.

Tabela 6. Porcentagem de inibição do crescimento de isolados de *Fusarium* ocasionado por *Trichoderma* em teste de confronto direto, de acordo com a equação de Abdell-Fattah *et al.* (2007).

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>								
	Porcentagem de inibição								
	Fus. 23	Fus. 27	TO 11	TO 245	26380	34970	MM 66	OSU 451	1205/2
T1	45 ^{abAB}	41 ^{bB}	53 ^{aA}	44 ^{aAB}	39 ^{abB}	35 ^{aB}	44 ^{abB}	42 ^{abAB}	34 ^{abB}
T2	47 ^{abAB}	47 ^{aAB}	53 ^{aA}	41 ^{aB}	44 ^{aAB}	31 ^{aC}	32 ^{bcdC}	34 ^{dC}	45 ^{abAB}
T3	53 ^{aA}	43 ^{aB}	49 ^{abAB}	38 ^{aBC}	47 ^{aAB}	34 ^{aC}	37 ^{bcdBC}	38 ^{abcdBC}	46 ^{aAB}
T4	48 ^{abAB}	45 ^{aAB}	53 ^{aA}	41 ^{aBC}	41 ^{abBC}	36 ^{aBC}	37 ^{bcdC}	42 ^{abBC}	41 ^{abBC}
T6	47 ^{abA}	43 ^{aAB}	51 ^{abA}	38 ^{aBC}	38 ^{abBC}	33 ^{aC}	37 ^{bcdBC}	44 ^{aA}	40 ^{abBC}
T8	48 ^{abA}	47 ^{aAB}	51 ^{abA}	39 ^{aAB}	35 ^{bB}	35 ^{aB}	46 ^{aAB}	40 ^{abcdAB}	46 ^{aAB}
T15	46 ^{abA}	37 ^{bBC}	42 ^{bAB}	34 ^{aBC}	40 ^{abA}	31 ^{aC}	31 ^{bcdC}	34 ^{dBC}	35 ^{abBC}
T17	47 ^{abAB}	37 ^{bB}	48 ^{abA}	39 ^{aAB}	43 ^{abAB}	39 ^{aAB}	41 ^{abcAB}	37 ^{abcdB}	37 ^{abB}
T19	41 ^{bA}	37 ^{bB}	46 ^{abA}	36 ^{aBC}	37 ^{abB}	30 ^{aC}	29 ^{dC}	33 ^{dBC}	35 ^{abB}
T5A	44 ^{abA}	36 ^{bAB}	46 ^{abA}	37 ^{aAB}	40 ^{abAB}	31 ^{AB}	35 ^{bcdAB}	41 ^{abA}	30 ^{bB}

*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

** Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fus. 23= *Fusarium* 23; Fus. 27= *Fusarium* 27.

Além disso, todos os isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram crescimento mais rápido que os isolados de *Fusarium* sp., ocupando cerca de metade da placa mesmo sendo repicado 48 horas depois de *Fol*. Resultados similares foram encontrados por Abdel-Fattah *et al.* (2007) que registraram inibição de 48% no crescimento de colônias de *Bipolaris oryzae* quando confrontado com *Trichoderma* sp. A mesma velocidade de crescimento do antagonista após oito dias de teste foi observada, sendo esta uma das vantagens da utilização de isolados deste gênero.

Comparando as duas formas de avaliação dos testes de confronto direto, pode-se observar que isolados como T2, que apresentou resultados de pouca sobreposição de colônias do patógeno, com média 3,00 na escala, apresentou médias de inibição de crescimento altas, com as maiores taxas de inibição dos isolados TO 11 e Fusarium 27. O isolado T3 que apresentou sobreposição contra seis dos nove isolados de *Fol*, também apresentou médias altas de inibição. Os mesmos resultados de antagonismo foram também observados para T8 e T17 em relação aos isolados de *Fol*.

Esses resultados, porém não permitem concluir a respeito da relação entre o micoparasitismo e o efeito inibitório de *Trichoderma* sp. Não existem resultados que indiquem quais dos métodos de avaliação utilizados é o mais importante para a capacidade de biocontrole de espécies pertencentes a este gênero. Ou se, na hipótese de esta capacidade resultar da ação sinérgica de todos os mecanismos, quais métodos seriam os mais indicados para realização de seleção de isolados em laboratório.

4.3 Avaliação da produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* sp.

A inibição de crescimento, por meio da produção de metabólitos voláteis, foi testada com três isolados de *Trichoderma* sp. (T3, T8 e T17), selecionados nos testes de antagonismo em confronto direto contra todos os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, tendo como critério a maior incidência de micoparasitismo.

Conforme a Figura 15, a inibição do crescimento do isolado Fusarium 23 pelo isolado T17 de *Trichoderma* sp., foi observado tardiamente nas 120 horas, com uma redução de 0,83 cm no diâmetro da colônia.

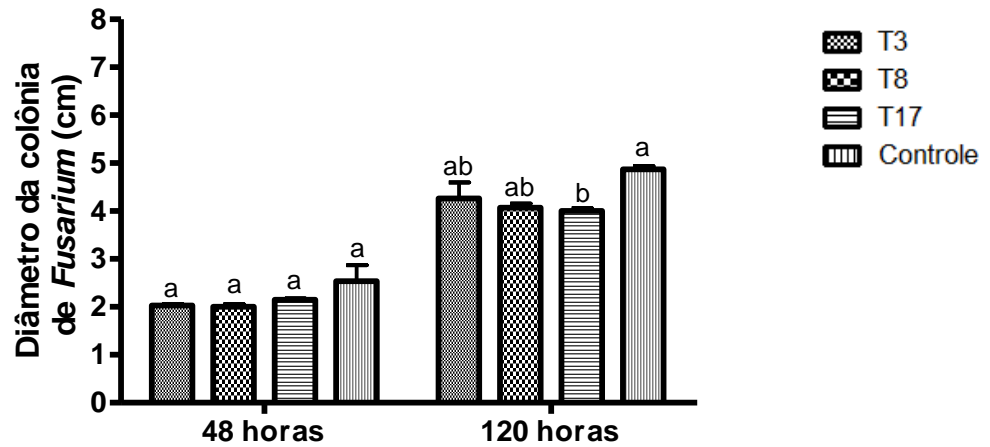


Figura 15. Diâmetro das colônias do isolado *Fusarium* 23 de *Fusarium* sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos de *Trichoderma* sp. em relação ao controle.

* Médias seguidas da mesma letra para cada tempo avaliado não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Legenda:

Em relação ao isolado *Fusarium* 27, a inibição induzida por todos os isolados de *Trichoderma* foi significativa em 120 horas (Figura 16). Podem ser observadas as médias das medidas do diâmetro das colônias após 120 horas de crescimento. No grupo controle a média alcançada foi de 6,76 cm e de 3,75; 3,8; e 3,8 cm para T3, T8 e T17, respectivamente.

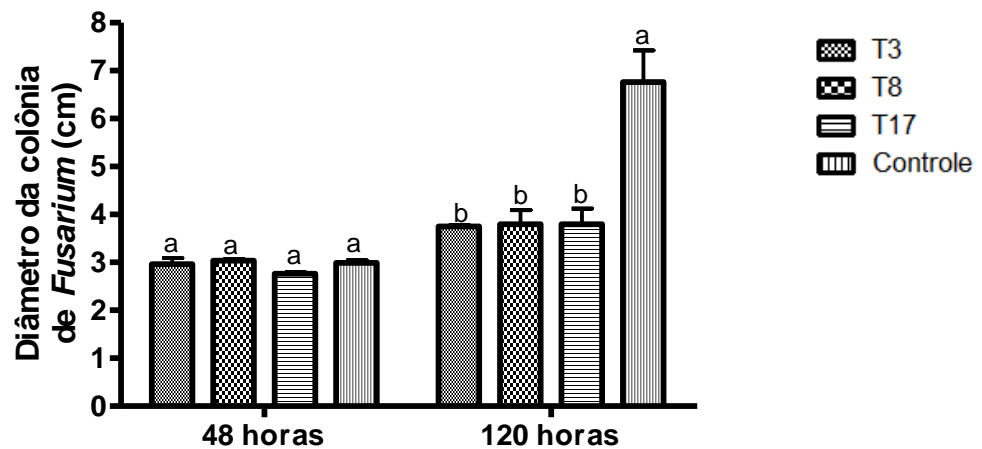


Figura 16. Diâmetro das colônias do isolado *Fusarium* 27 de *Fusarium* sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* sp. em relação ao controle.

* Médias seguidas da mesma letra para cada tempo avaliado não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Figura 17 pode ser observado que além da redução do diâmetro da colônia, os metabólitos liberados pelo isolado T3 de *Trichoderma* sp. provocam alterações morfológicas em que as hifas do isolado *Fusarium* 27 se mostram mais ralas. Da mesma forma, Dal Bello *et al.* (1997) também observaram que o efeito dos metabólitos voláteis de *Trichoderma* sp. pode se manifestar diretamente sobre as hifas dos fitopatógenos (afinamento e escurecimento) e evitando a formação de escleródios, sem ser observado necessariamente no crescimento e esporulação, mas produzindo um efeito inibidor indireto.

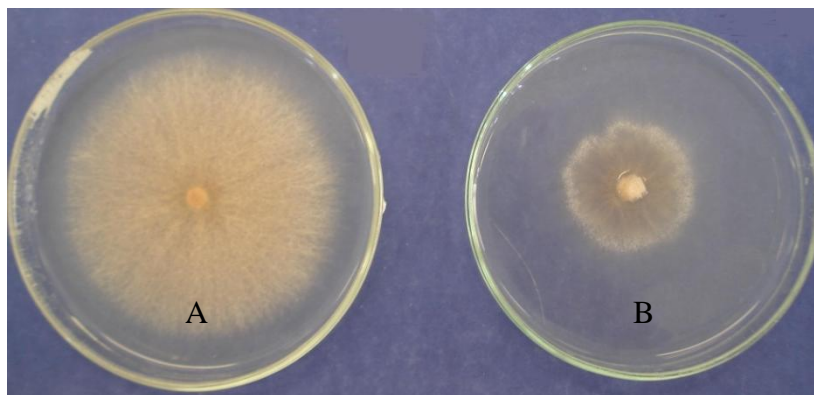


Figura 17. Comparativo entre colônias do isolado *Fusarium* 27, grupo controle (A), e na presença de metabólitos voláteis liberados pelo isolado T3 de *Trichoderma* sp.(B).

Reforçando os dados relatados por Paradela (2002), de que os isolados de *Fusarium* sp. podem responder diferentemente às ações antagonistas de microrganismos, os resultados apresentados na Figura 18 demonstram a alta resistência do isolado TO 11, que não foi inibido pelos metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* sp. avaliados.

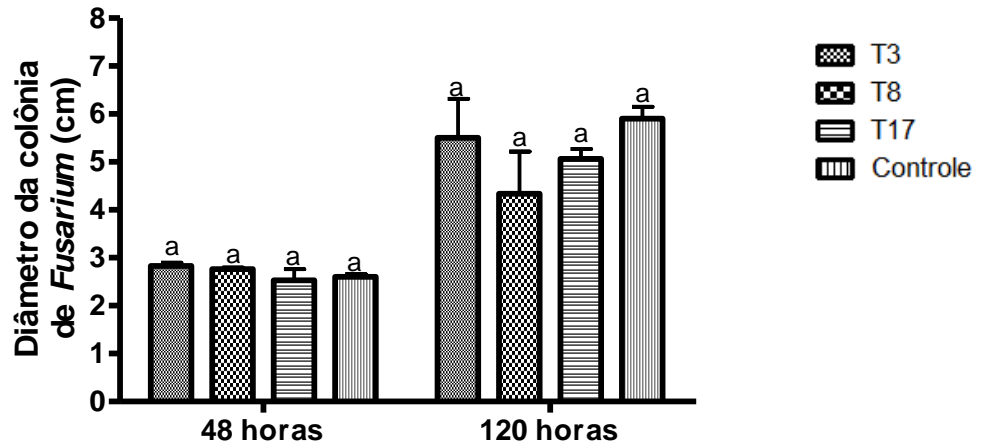


Figura 18. Diâmetro das colônias do isolado TO 11 de *Fusarium* sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* sp. em relação ao controle .

* Médias seguidas da mesma letra para cada tempo avaliado não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De forma bastante semelhante, o isolado TO 245 de *Fusarium* sp. foi inibido somente até 48 horas de crescimento sob os gases liberados pelo isolado T3 de *Trichoderma* sp. Após 120 horas essa diferença não foi mais significativa em relação ao grupo controle (Figura 19).

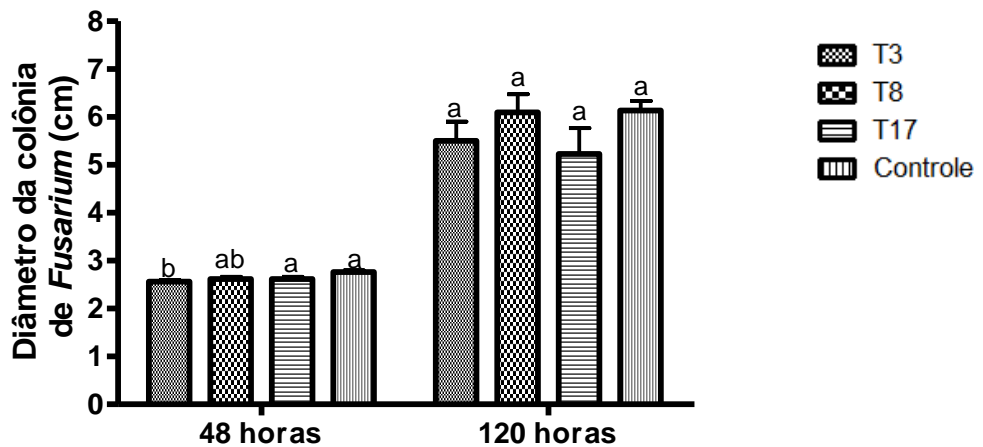


Figura 19. Diâmetro das colônias do isolado TO 245 de *Fusarium* sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* sp. em relação ao controle.

* Médias seguidas da mesma letra para cada tempo avaliado não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Embora neste trabalho tenha sido observada uma inibição variável do desenvolvimento das colônias da linhagem 26380 pertencente à raça 3 de Fol em confronto direto com os isolados de *Trichoderma* sp. (Tabela 5), no tratamento com metabólitos voláteis não ocorreu inibição significativa em relação ao controle, como pode ser observado na Figura 20.

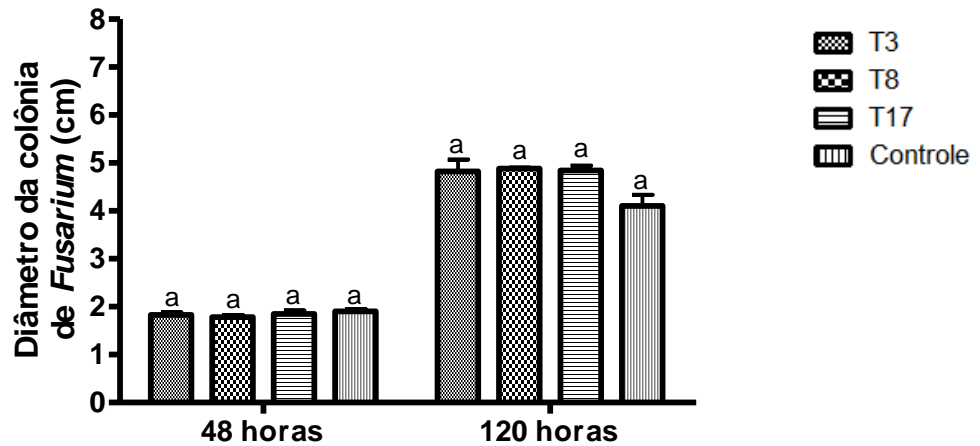


Figura 20. Diâmetro das colônias da linhagem 26380 de *Fusarium* sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* sp. em relação ao controle

* Médias seguidas da mesma letra para cada tempo avaliado não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Foi observado, porém, que no tratamento com o isolado T8 de *Trichoderma* sp. houve uma inibição da esporulação das colônias dos isolados de *Fusarium* sp., sendo observada esporulação nas colônias não confrontadas do controle (Figura 21).

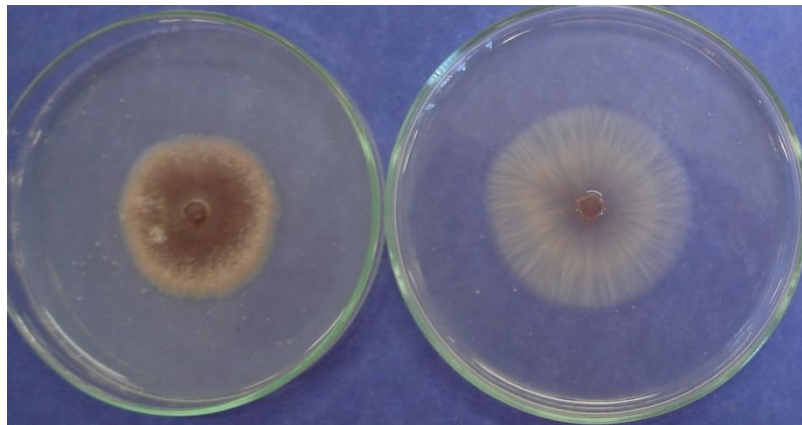


Figura 21. Comparativo entre colônias da linhagem 26380, grupo controle (A), e na presença de metabólitos voláteis liberados pelo isolado T8 de *Trichoderma* sp. (B).

Para a linhagem 34970 houve inibição significativa de crescimento quando em conjunto com cada um dos 3 isolados de *Trichoderma* sp. em relação ao controle após 120 horas de teste (Figura 22) . O diâmetro médio do crescimento pareado com o isolado T17 de *Trichoderma* sp. alcançou 3,5 cm em comparação com 4,9 cm do controle (Figura 23).

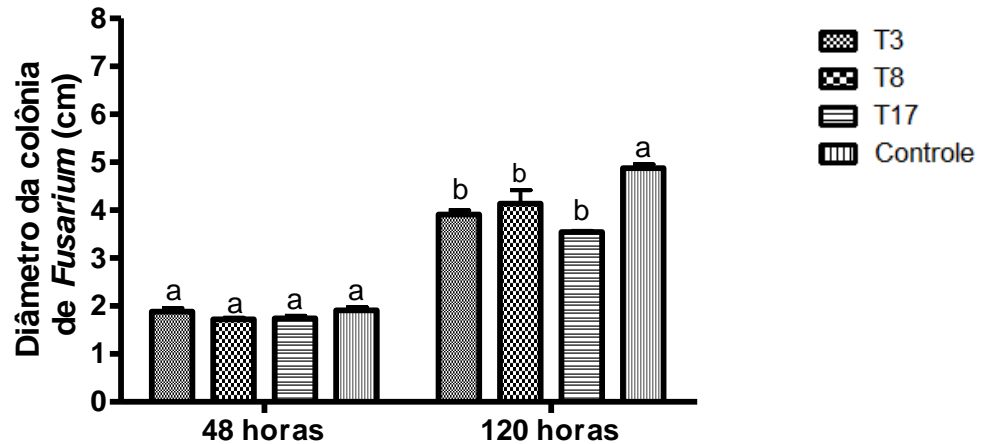


Figura 22. Diâmetro das colônias da linhagem 34970 de *Fusarium* sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* sp. em relação ao controle.

* Médias seguidas da mesma letra para cada tempo avaliado não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

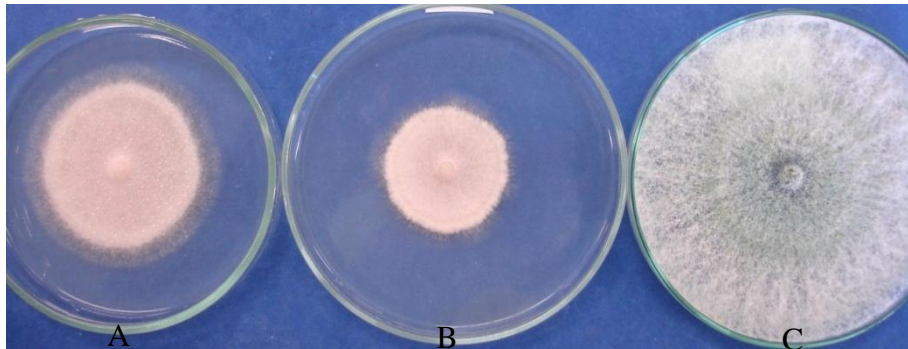


Figura 23. Colônias da linhagem 34970 em teste de metabólitos voláteis liberados pelo isolado T17 de *Trichoderma* sp. (A). Ao centro linhagem testada (B) e controle (C).

Pode ser esperada uma variabilidade na capacidade de antagonismo das espécies e mesmo dos isolados antagonistas dentro do gênero *Trichoderma*, e da mesma forma para a capacidade de

resistência dos isolados de *Fusarium* sp., já que essas características são complexas e determinadas por vários genes ou conjuntos de genes, tanto no antagonista como no patógeno.

Na Figura 24, podem ser observados os dados obtidos em relação ao crescimento da linhagem OSU 451 de *Fol* na presença dos isolados de *Trichoderma* sp. que demonstram ausência de efeito sobre o desenvolvimento da patógeno alvo, por quaisquer um dos isolados de *Trichoderma* sp. avaliados.

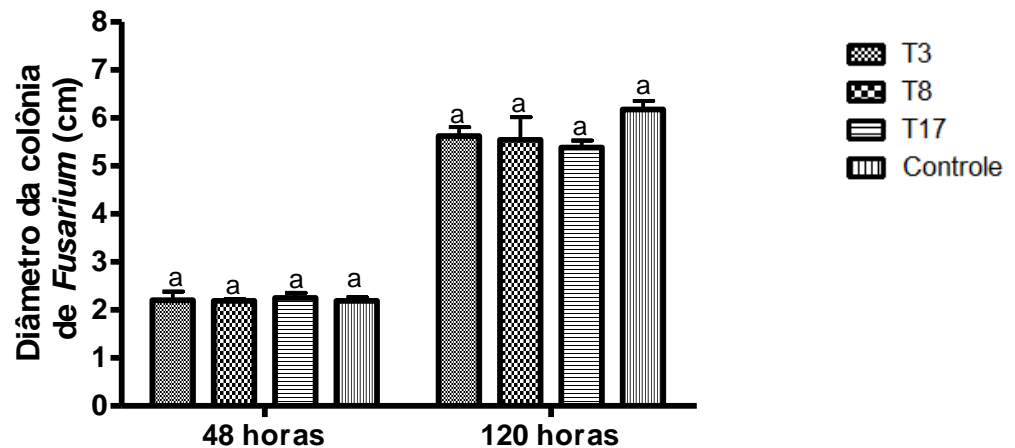


Figura 24. Diâmetro das colônias da linhagem OSU 451 de *Fusarium* sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* sp. em relação ao controle.

* Médias seguidas da mesma letra para cada tempo avaliado não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na figura 25 pode-se observar que não houve diferença estatística de crescimento do isolado MM 66 de *Fol* contra nenhum dos isolados de *Trichoderma* sp. em ambas as avaliações realizadas.

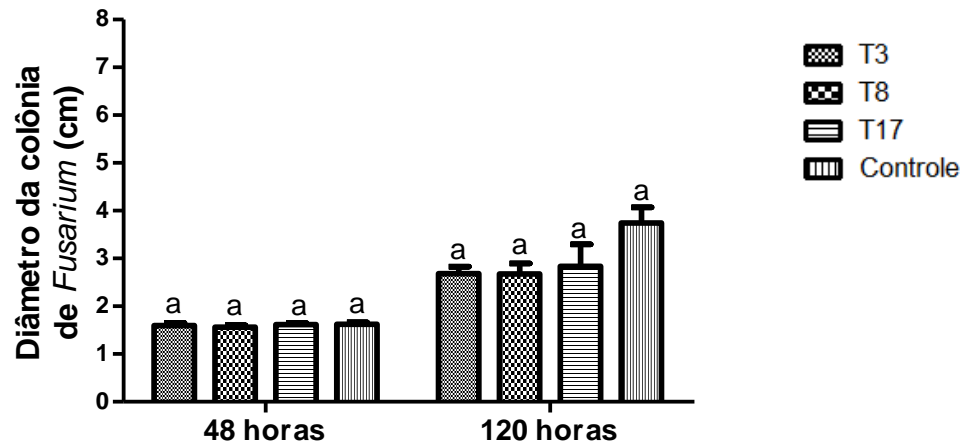


Figura 25. Diâmetro das colônias da linhagem MM 66 de *Fusarium* sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* sp. em relação ao controle.

* Médias seguidas da mesma letra para cada tempo avaliado não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados apresentados na Figura 26 demonstram que o isolado 1205/2 de *Fusarium* sp. não sofreu inibição por nenhum dos isolados de *Trichoderma* sp. desafiados, durante todo o tempo do experimento.

Em trabalho de Küçük & Kivanç (2003), foram testados metabólitos voláteis e não voláteis de linhagens de *T. harzianum* contra diversos fungos fitopatogênicos, sendo então observado que os isolados de *Fusarium* spp. apresentaram maior resistência, em relação aos outros fungos como *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium* sp. A variabilidade das respostas obtidas nas avaliações da inibição provocada por competição e produção de metabólitos voláteis entre os isolados no presente trabalho reforçam os resultados obtidos pelos autores, uma vez que foram avaliadas três raças de *Fusarium* sp. contra dez isolados de *Trichoderma* sp., que também apresentaram comportamento variável em relação aos isolados de *Fusarium* sp.

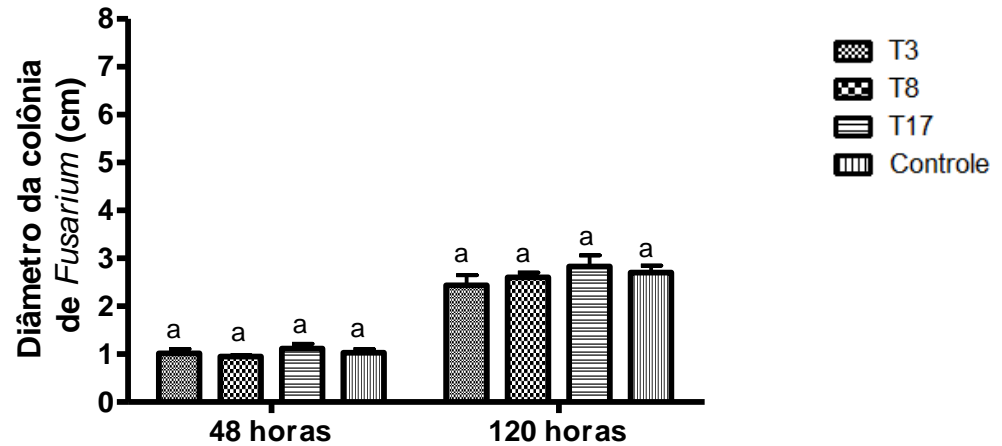


Figura 26. Diâmetro da colônia do isolado 1205/2 de *Fusarium* sp. em teste de inibição por metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* sp. em relação ao grupo controle.

* Médias seguidas da mesma letra para cada avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A baixa capacidade inibitória apresentada por isolados de *Trichoderma* sp. através da produção de metabólitos voláteis não necessariamente indica a falta de possibilidade de sua aplicação para controle de doenças *in vivo*. Vários outros mecanismos como a competição por ferro (Segarra *et al.* 2009) e nutrientes, produção de sideróforos, colonização da rizosfera da planta (Benítez *et al.* 2004) e indução de resistência (Woo *et al.* 2006) já foram descritos na literatura como fatores chave no combate de agentes causadores de doenças de plantas. Além disso, autores como Bélanger *et al.* (1995) reportam como sendo as mais promissoras linhagens de *Trichoderma* sp. para serem aplicadas no controle biológico de doenças de plantas aquelas produtoras de metabólitos não voláteis.

A capacidade de biocontrole de doenças de plantas por parte de *Trichoderma* sp. não se restringe, no entanto, aos métodos avaliados neste trabalho. A atuação coordenada de vários mecanismos ao mesmo tempo faz com que seja muito difícil o surgimento de linhagens fitopatogênicas resistentes ao seu controle e podem garantir sua eficiência no controle de doenças a campo. Desta maneira, mesmo que um mecanismo de controle seja predominante para um

isolado, isso não exclui a possibilidade que um ou mais dos outros mecanismos possam representar um papel importante no comportamento antagonista de um determinado isolado de *Trichoderma* sp.

4.4 Controle Biológico

Decorridos 45 dias após o plantio das plântulas de tomateiro em substrato tratado com *Trichoderma* sp. e contaminado com os isolados de *Fusarium* sp., foi possível observar sintomas de doença nas plantas dos tratamentos com substrato infestado pelos isolados TO 245 e 1205/2 de *Fol*, como pode ser observado na Figura 27. As plantas doentes apresentaram sintomas de murcha em diferentes graus da escala de severidade, além de folhas amareladas ou necrosadas com decorrente murcha em alguns casos.

Na avaliação do controle biológico do isolado TO 245 de *Fusarium* sp., as plântulas tratadas com os isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp. apresentaram menor grau de severidade de doença, com notas iguais a 1,25 e 0,50 respectivamente, em comparação a 1,87 do tratamento controle sem *Trichoderma* sp., de acordo com a escala de Vakalounakis *et al.* (2004) (Tabela 7).



Figura 27. Testes de controle biológico A- Planta de tomateiro apresentando sinais de morte por fusariose no tratamento contendo somente o isolado TO 245 de *Fol*. B- planta saudável com o isolado T17 de *Trichoderma* sp. em substrato contendo o isolado TO 245 de *Fol*.

Nas plantas tratadas com o isolado 1205/2 de *Fusarium* sp., os sintomas observados foram menos severos (Tabela 7). Os tratamentos com os isolados T6 e T17 alcançaram notas iguais a 0,50 e 0,38 respectivamente, de acordo com a escala de severidade, em comparação a 0,50 do tratamento controle sem a presença de *Trichoderma* sp.

Tabela 7: Índice de severidade de doença em teste de controle biológico dos isolados TO 245 e 1205/2 de *Fusarium* sp. pelos isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp. de acordo com a escala de Vakalounakis *et al.* (2004): (0) - ausência de sintomas; (1) - murcha leve ou moderada, descoloração vascular leve do caule; (2) - murcha e descoloração vascular severas; (3) - planta morta;

Isolados de <i>Fusarium</i>	Isolados de <i>Trichoderma</i>		
	T6	T17	Controle
TO 245	1,25	0,5	1,87
1205/2	0,5	0,375	0,5

Estes resultados corroboram com os de Luongo *et al.* (2005), em que foi analisada a capacidade de colonização por *Fusarium* sp. em trigo e milho, quando na presença de antagonistas como *Trichoderma* sp. com reduções moderada e significativa da doença.

Outro trabalho com resultados similares, em que foi avaliada a eficácia de redução da fusariose em tomateiro (Larkin & Fravel 1998) utilizou isolados de *T. hamatum* apresentando diminuição de incidência da doença em até 64%. Além desses hospedeiros, *Trichoderma* sp. já foi reportado parasitando esclerócios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) e reduzindo incidência dessa doença em tomateiro em até 88% (Abdullah *et al.* 2008)

O controle da fusariose por organismos antagonistas envolve mecanismos que restringem o crescimento e extensão da colonização do patógeno, seja de maneira física através da criação de barreiras, ou pela indução na planta para a produção de fitoalexinas (De Cal *et al.* 2000).

Nas plantas que apresentaram sinais de doença foi possível observar a obstrução dos vasos do caule, como confirmação da morte por fusariose, em comparação as plantas tratadas e sem sintomas de doença com os vasos desobstruídos (Figura 28).

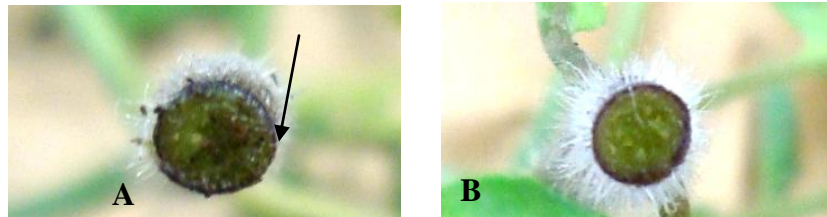


Figura 28. Corte transversal de caule de planta de tomateiro apresentando entupimento dos vasos (A) em destaque, e corte de planta de tomateiro saudável, sem entupimento dos vasos (B).

O controle biológico pode ser uma alternativa eficiente ao emprego de cultivares resistentes às raças de Fol, já que este método além de exercer constante pressão de seleção por novas raças é oneroso para os pequenos produtores rurais já que as sementes de tomateiro que são resistentes às raças deste patógeno são mais caras.

O tratamento biológico com espécies de *Trichoderma* sp. pode estimular o desenvolvimento de plantas, porém nas condições deste trabalho este resultado não foi observado. A altura das plantas tratadas com *Trichoderma* sp. não apresentou diferença significativa para ambos os tratamentos (Figura 29). De forma semelhante, Ethur *et al.* (2008), não encontraram diferenças nos tratamentos realizados com *T. harzianum* no substrato e sementes de tomateiro em relação ao desenvolvimento e vigor das mudas.

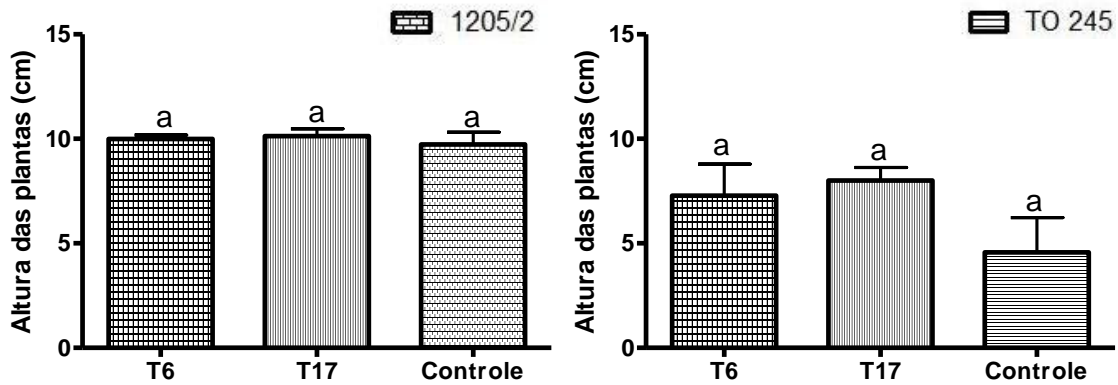


Figura 29. Altura das plantas de tomateiro em teste de controle biológico tratadas com os isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp., em relação ao tratamento controle contendo somente os isolados de Fol 1205/2 e TO 245.

O comprimento das raízes das plantas de tomateiro também não apresentou diferença significativa significativa em relação ao tratamento controle não tratado com *Trichoderma* sp. (Figura 30).

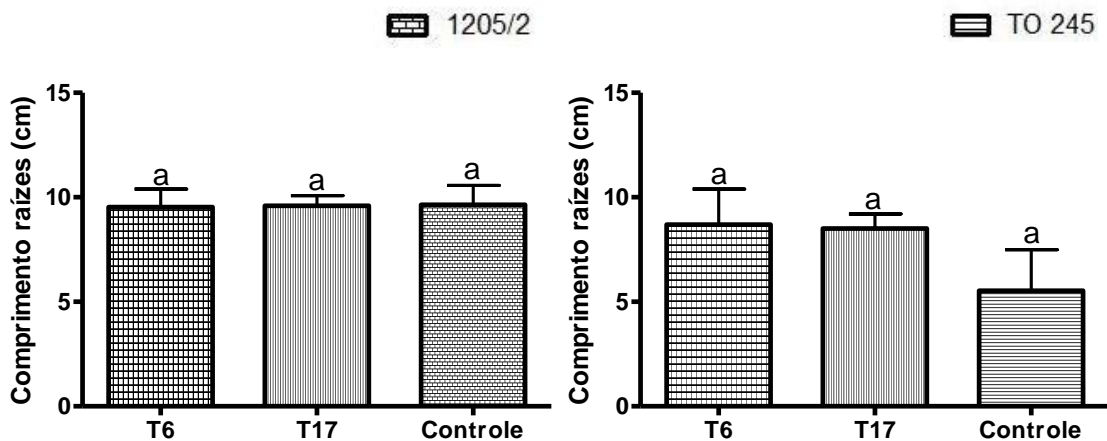


Figura 30. Comprimento das raízes de plantas de tomateiro em teste de controle biológico tratadas com os isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp., em relação ao tratamento controle contendo somente os isolados de Fol 1205/2 e TO 245.

O peso seco da parte aérea das plantas de tomateiro tratadas com os isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp. apresentou valores de 0,044g e 0,039g respectivamente, em relação a 0,031g do controle (Figura 31). Para o substrato inoculado com o isolado TO 245 e os isolados de

Trichoderma sp. não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos e em relação ao tratamento controle.

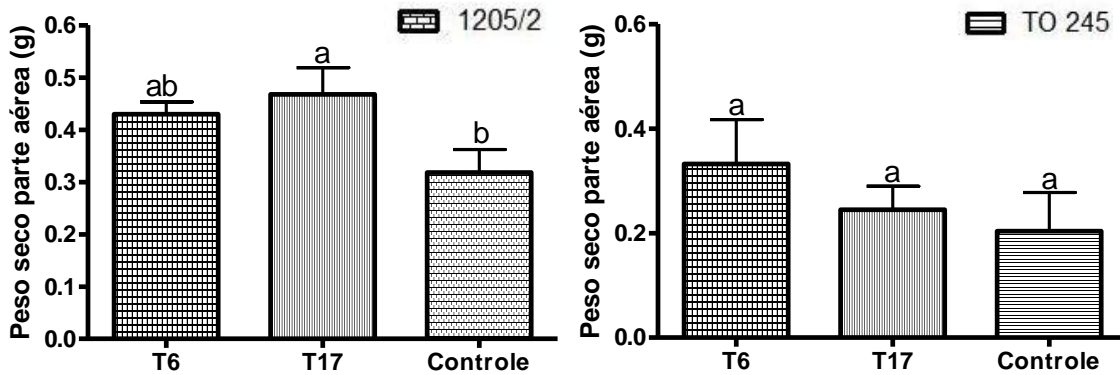


Figura 31. Peso seco da parte aérea das plantas de tomateiro em teste de controle biológico tratadas com os isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp., em relação ao tratamento controle contendo somente os isolados de Fol 1205/2 e TO 245.

O peso seco das raízes não apresentaram diferença estatística em nenhum dos tratamentos realizados para nenhum dos substratos inoculados com isolados de Fol (Figura 32). Da mesma forma, utilizando metodologia de inoculação de antagonistas para controle da fusariose do tomateiro, González *et al.* (2004) não obtiveram resultados que diferiram do tratamento controle em teste utilizando somente *Trichoderma* sp. Os melhores resultados foram obtidos quando combinando este com processo químico de tratamento do solo.

Resultados diferentes foram encontrados por Avendaño *et al.* (2006) que evidenciaram um aumento importante no volume da raiz e no número de radículas de feijoeiro, quando tratadas com *Trichoderma* sp. em conjunto com *Pseudomonas fluorescens*. A aplicação de agentes de controle biológico combinados é outra possibilidade a ser considerada, já que ao atuarem com mecanismos diferentes de biocontrole, estes podem garantir uma maior eficiência a campo.

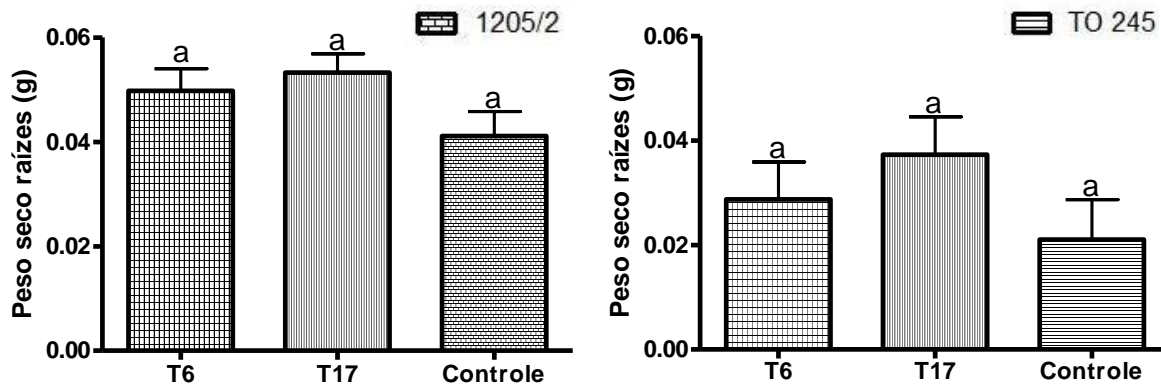


Figura 32. Peso seco das raízes de plantas de tomateiro em teste de controle biológico tratadas com os isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp., em relação ao tratamento controle contendo somente os isolados de Fol 1205/2 e TO 245.

A aplicação de isolados de *Trichoderma* sp. em Manejo Integrado é uma das possibilidades a serem consideradas no biocontrole de doenças, sendo uma alternativa viável para redução da utilização de fungicidas e reguladores de crescimento, o que além de diminuir o impacto ambiental decorrente desta forma de controle ainda podem vir a diminuir os custos de produção.

4.5 Grupos de Compatibilidade Vegetativa

A geração e seleção de mutantes capazes de utilizar clorato e não utilizadores de nitrato mostrou geração de setores de crescimento mais rápido para todos os isolados de Fol.

Na Figura 33 pode ser observado o desenvolvimento da linhagem *Fusarium* 23 com os setores em meio BDC.

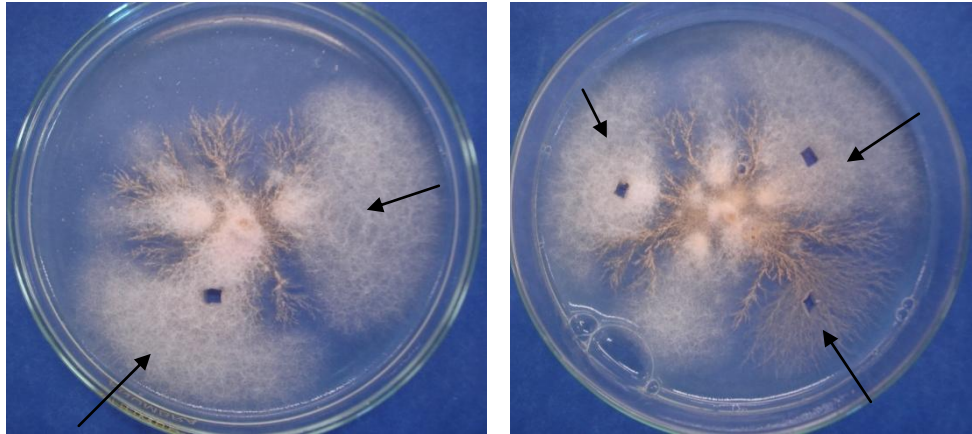


Figura 33. Colônias do isolado *Fusarium* 23 crescidas em meio BDC. Em destaque, setores de crescimento rápido.

Dentre os setores repicados em meio mínimo contendo nitrato como única fonte de nitrogênio muitas colônias apresentavam crescimento semelhante ao parental, indicando uma possível reversão ocorrida em um dos genes responsáveis pelos fenótipos mutantes. A Figura 34 apresenta os mutantes com o micélio extremamente ralo em comparação ao parental de crescimento regular com micélio denso.

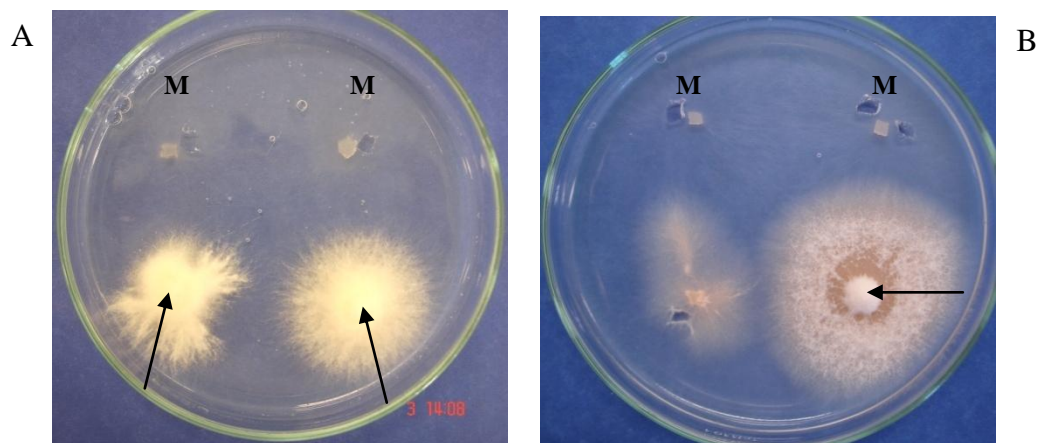


Figura 34. Colônias dos isolados TO 11 (A) e 34970 (B) crescidas em meio MM. Em destaque, setores de crescimento similar ao parental. Marcados com a letra M, colônias mutantes.

Após, as colônias que apresentaram crescimento com micélio ralo, oriundas do mesmo parental, foram consideradas mutantes sendo repicadas em meio MM para verificação de heterocariose entre estas (Figura 35).



Figura 35. Heterocário de mutantes da linhagem 26380.

Após a geração e seleção de mutantes nit1 e NitM em meio contendo nitrito e hipoxantina, estes foram pareados em todas as combinações possíveis com mutantes referentes às linhagens padrão de cada um dos 4 GCVs de Fol.

Os resultados de formação de heterocário com as linhagens padrão foram positivos em relação aos mutantes pertencentes à linhagem padrão 34970 correspondente ao GCV 0030, para os mutantes referentes aos isolados Fusarium 23 e 27, TO 11 e 245 e 1205/2 (Tabela 8).

Tabela 8. Raça e grupo de compatibilidade vegetativa dos isolados de Fol.

Isolado	Raça	VCG
1205/2	2	0030
Fusarium 23 ^o	2	0030
Fusarium 27 ^o	1	0030
TO 11 ^{oo}	2	0030
TO 245 ^{oo}	2	0030

^o Cedidos pelo Dr. Ailton Reis da Embrapa Hortaliças. ^{oo} Cedidos pelo Dr. Rômulo Kobori da Empresa Sakata Seeds através do Dr. Wagner Bettiol da Embrapa Meio Ambiente.

Uma das possibilidades de ligação existentes para Fol é a de que isolados pertencentes ao GCV 0030 estão associados ao tomateiro por um período de tempo bastante longo. Uma das evidências da relação entre este grupo e seu hospedeiro se deve ao fato de que todas as raças estão presentes no mesmo, um indicativo de adaptação da população fúngica às mudanças no espectro de resistência do hospedeiro (Gale *et al.* 2003).

A obtenção de isolados de diferentes localidades em um mesmo GCV indica que esta população geneticamente homogênea está dispersa entre regiões geograficamente diferentes. Este tipo de resultado pode indicar uma similaridade genética entre isolados e uma provável origem a partir de um ancestral em comum. Alguns estudos indicam que isolados pertencentes ao mesmo GCV comumente possuem haplotipos multilocus idênticos e pertencem à mesma linhagem clonal (Kistler *et al.* 1998). A ocorrência de um GCV em mais de uma região pode ser explicada por uma distribuição inicial ampla a partir de uma origem geográfica comum através de sementes, mudas, aparelhos contaminados e atividades humanas (Ahn *et al.* 1998).

Uma hipótese comumente aceita que explica a presença de isolados pertencentes a raças diferentes em um mesmo GCV em *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, como observado para os isolados Fusarium 23 e 27 de raças 2 e 1 respectivamente, se baseia na derivação da raça 2 pela raça 1, e da raça 3 pela raça 2, explicando a presença das 3 raças no GCV 0030 por exemplo (Kawabe *et al.* 2005). A diversidade de raças dentro de um mesmo GCV, como observado no presente trabalho implica que novas raças podem surgir independentemente em diferentes localidades assim como em um centro de origem, seguido de dispersão a longas distâncias. Essa hipótese, porém, permanece especulativa, pois existe ainda pouco conhecimento a respeito da estabilidade dos loci *vic* e de virulência nas formas patogênicas de *F. oxysporum* (Elias & Schneider, 1991).

O limitado número de isolados utilizados neste trabalho impede uma conclusão definitiva com relação à importância da formação de heterocariose na influência da diversidade genética e do fluxo gênico em *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* no Brasil. Existe, portanto, uma necessidade de estudos adicionais incluindo isolados de raça 3 e de diferentes partes do país para uma maior abrangência do estudo.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Os isolados 589, 859, 921, 921/2 e 1205/1 de *Fusarium* sp. não se mostraram patogênicos a nenhuma das cultivares diferenciadoras de tomateiro utilizadas.
- Nenhum dos isolados testados de *Fusarium* sp. apresentou patogenicidade em cultivar resistente as raças 1 e 2, e raça 3.
- Nos testes de confronto direto, os menores valores obtidos na avaliação de acordo com a escala de Bell *et al.* foram obtidos com os isolados T3, T8 e T17 de *Trichoderma* sp., com sobreposição da colônia de pelo menos seis dos nove isolados de *Fol* confrontados.
- A linhagem 34970 de *Fol* foi pouco inibida pelos isolados de *Trichoderma* spp., e o isolado TO 11 foi o que teve o crescimento mais inibido. Os isolados T1 e T3 de *Trichoderma* sp. apresentaram as maiores médias gerais em relação à capacidade de inibição.
- Três dos isolados de *Fol* foram inibidos pelos metabólitos voláteis produzidos pelos isolados T3, T8 e T17 de *Trichoderma* sp.
- Os resultados de controle biológico com os isolados T6 e T17 de *Trichoderma* sp. em plantas de tomateiro crescidas em substrato infestado com os isolados TO 245 e 1205/2 de *Fol* apresentaram menor severidade de doença em ambos os casos.
- Foi observada diferença estatística para em relação ao peso seco da parte aérea quando tratado com a suspensão do isolado T17 de *Trichoderma* sp., sem observação de diferença estatística nos demais tratamentos e testes.
- Todos os isolados de *Fol* foram agrupados no VCG 0030, indicando uma possível similaridade genética entre estes.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas em relação aos dados obtidos neste trabalho sugerem-se as seguintes:

1. Sequenciar a região ITS de rDNA dos isolados de *Fol*, com o fim de estabelecer relações de similaridade entre os isolados e complementar os resultados obtidos nos testes de compatibilidade vegetativa.
2. Identificar até o nível de espécie os isolados de *Trichoderma* sp., por meio de técnicas de biologia molecular.
3. Realizar testes em campo para observação dos efeitos protetores do isolado T17 de *Trichoderma* sp., em cultura de tomateiro.
4. Estabelecer o possível foco de origem ou surgimento da raça 3 no país, por meio da análise dos grupos de compatibilidade vegetativa de isolados pertencentes.
5. Estabelecer os grupos de compatibilidade vegetativa de outras *formae speciales* de *F. oxysporum* pertencentes à coleção do Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas da Universidade de Caxias do Sul.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdell-Fattah, G.M.; Shabana, Y.M.; Ismail, A.E.; Rashad, Y.M. (2007) *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. **Mycopathologia** 164: 81-89.
- Abdullah, M.T.; Ali, .Y.; Suleman, P. (2008) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Prot** 27: 1354-1359.
- Ahn, I. P.; Chung, H. S.; Lee, Y-H. (1998). Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Plant Dis** 82: 244-246.
- Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. (2007) Métodos em Fitopatologia. Editora UFV 382p
- Andrade, E. R.; Schuck, E.; Dal Bó, M. A. (1993) Avaliação da resistência de *Vitis* spp. a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* em condições controladas. **Pesq Agropec Bras** 28: 1287-1290.
- Armstrong, G. M. & Armstrong, J. K. (1981). *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Nelson, PE. Tousson, T.A. & Cook, R.J. (Eds) **Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy**. Pennsylvania State University Press, University Park. 1981. pp 391-399.
- Avendaño, C.; Arbeláez, G.; Rondón, G. (2006) Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em fríjol *Phaseolus vulgaris* L., mediante la acción combinada de *Entrophora colombiana*, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens*. **Agron Colomb** 24: 62-67.
- Belabid, L.; Fortas, Z. (2002) Virulence and vegetative compatibility of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. **Phytopathol Mediterr** 41: 179-187
- Bélanger, R. R.; Dufour, N.; Caron, J.; Benhamou, N. (1995) Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. **Bioc Sci Tech** 5: 41-53.
- Bell, D. K.; Wells, H. D.; Markham, C. R. (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. **Phytopathology** 72: 370-382.
- Benítez, T.; Rincón, A. M.; Limón, M. C.; Codón, A. C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **Int Microbiol** 7: 249-260.

- Carvalho, A. O.; Neto, J. J.; do Carmo, M. G. F. (2005) Colonização de raízes de tomateiro por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva com três fontes de nitrogênio. **Fito Bras** 30: 26-32.
- Cai, G.; Gale, L. R.; Schneider, R. W.; Kistler, H. C.; Davis, R. M.; Elias, K. S.; Miyao, E. M. (2003) Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *lycopersici* at a single site in California. **Phytopathology**. 93: 1014-1022.
- Correl, J. C.; Klittich, C. J. R.; Leslie, J. F. (1987) Nitrate non utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology** 77: 1640-1646.
- Cove, D. J. (1976) Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*; Studies of mutants altered in nitrate assimilation. **Mol Gen Genet** 146: 147-159.
- Dal Bello, G. M.; Mónaco, C. I.; Cháves, A. R. (1997) Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. **Rev Iberoam de Micol** 14: 131-134.
- De Cal, A.; Garcia-Lepe, R.; Melgarejo, P. (2000). Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: histological studies of infected and induced tomato stems. **Phytopathology** 90: 260-268.
- Dennis, C.; Webster, J. (1971a). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. **Trans Br Mycol Soc** 57: 25-39.
- Dennis, C.; Webster, J. (1971b). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. **Trans Br Mycol Soc** 57: 41-48.
- De Oliveira, V. C. & Da Costa, J. L. S. (2003) Compatibilidade vegetativa de nit-mutantes de *Fusarium solani* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro e à soja. **Fito Bras** 28: 89-92.
- Elias, K.S.; Schneider, R.W. (1991) Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Phytopathology** 81: 159-162.
- Embrapa, Hortaliças. (2008). Sistemas de Produção. **Disponível (online)** http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/doencas_fungo.htm (31 de outubro).
- Ethur, L.Z.; Blume, E.; Muniz, F.B.; Camargo, R.F.; Flores, M.G.V.; Cruz, J.L.G.; Menezes, J.P. (2008) *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro. **Ciência e Natura** UFSM 30: 57-69.

- Fernandez, D.; Assigbetse, K.; Dubois, M.-P.; Geiger, J.-P. (1994) Molecular characterization of races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Appl Environ Microbiol** 60: 4039-4046.
- Fischer, I. H.; Almeida, A. M.; Garcia, M. J. D. M. (2006) Efeito de fungicidas no crescimento micelial de *Fusarium subglutinans* *in vitro*. In: 19° Reunião anual do Instituto Biológico. **Resumo Expandido**. Pp. 68: 1-4.
- Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. **Annu Rev Phytopathol.** 9: 275-296.
- Forsyth, L. M.; Smith, L. J.; Aitken, E. A. B. (2006) Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing *Fusarium* wilt severity. **Mycol Res** 110:929-935.
- Gale, L. R.; Katan, T.; Kistler, H. C. (2003) The probable center of origin of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* VCG 0030. **Plant Dis** 87: 1433-1438.
- Galli, F. (1980) Manual de Fitopatologia. Doenças de Plantas Cultivadas. Agronômica Ceres. Vol. 2. 587p.
- Ghisalberti, E. L. & Sivasithamparam, K. (1991) Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil Biol Bioch** 23: 1011-1022.
- Gómez, I.; Chet, I.; Herrera-Estrella, A. (1997) Genetic diversity and vegetative compatibility groups among *Trichoderma* isolates. **Mol Gen Genet** 256: 127-135.
- González, R.; Montealegre, J.; Herrera, R. (2004) Control Biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. **Cien e Inv Agr** 31:21-28.
- Graph Pad Software, Inc. USA. Fevereiro 2009. CD-ROM.
- Grattidge, R.; O' Brien, R. G. (1982) Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. **Plant Dis** 66: 165-166.
- Harman, G. E. (2000) Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in the perceptions derived from the research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Dis** 84:377-393.
- Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature** 2: 43-56.
- Harman, G. E. (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology** 96:190- 194.

- Hibar, K.; Daami-Remadi, M.; Khiareddine, H.; El Mahjoub, M. (2005) Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Biotechnol Agron Soc Environ.** 9: 163-171.
- Howell, C. R. (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Dis** 87:4-10.
- Howell, C. R. (2006) Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. **Phytopathology** 96: 178- 180.
- Jacobson, D. J. & Gordon, T. R. (1988) Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Phytopathology** 78: 668-672.
- Katan, T.; Zamir, D.; Sarfatti, M.; Katan, J. (1991) Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Phytopathology** 81:255-262.
- Katan, T & Di Primo, P. (1999) Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*: Supplement. **Phytoparasitica** 27:1-7.
- Kawabe, M.; Kobayashi, Y.; Okada, G.; Yamaguchi, I.; Teraoka, T.; Arie. (2005) Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT1, and pg1, are each composed of isolates of a single or closely related vegetative compatibility group. **J Gen Plant Pathol** 71: 263-272.
- Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. (2005) Manual de Fitopatologia Volume 2 Doenças das plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres 663p.
- Kistler, H. C. (1997) Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology** 87: 474-479.
- Kistler, H. C.; Alaubovette, C.; Baayen, R. P.; Bentley, S.; Brayford, D.; Coddington, A.; Correll, J.; Daboussi, M.-J.; Elias, K.; Gordon, T. R.; Katan, T.; Kim, H. G.; Leslie, J. F.; Martyn, R. D.; Migheli, Q.; Moore, N. Y.; O' Donnell, K.; Ploetz, R. C.; Rutherford, M. A.; Summerell, B.; Waalwijk, C.; Woo, S. (1998) Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology** 88:30- 32.
- Klittich, C. J. R.; Leslie, J. F. (1988) Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Giberella fujikuroi*). **Genetics** 118: 417-423.

- Kopacki, M. & Wagner, A. (2006) Effect of some fungicides on mycelium growth of *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. pathogenic to chrysanthemum (*Dedranthemma grandiflora* Tzvelev) **Agron Res** 4: 237-240.
- Küçük, C. & Kivanç, M. (2003) Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. **Turk J of Biol** 27: 247- 253.
- Küçük, C. & Kivanç, M. (2004) In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. **Turk J of Biol** 28-111-115.
- Larkin, R. P. & Fravel, D. R. (1998) Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. **Plant Dis** 82: 1022-1028.
- Leslie, J. F. (1996) Fungal Vegetative Compatibility- Promises and Prospects. **Phytoparasitica** 24: 3-6.
- Leslie, J. F. & Zeller, K.A. (1996) Heterocaryon compatibility in fungi – more than just another way to die. **J Genet** 3: 415-424.
- Louzada, G. A.; Lobo Junior, M.; Marchão, R. L.; Balbino L. C. (2004) Efeito da rotação de culturas sobre *Fusarium* spp. e atividade microbiológica em uma área de integração lavoura-pecuária. **Disponível (online)** <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/embrapaintegracaolavourapecuaria>.
- Luongo, L.; Galli, M.; Corazza, L.; Meekes, E.; de Haas, L.; Plas, C.L.V.D.; Kohl, J. (2005) Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. **Biocontrol Sci Techn** 3: 229-242.
- McCallum, B. D.; Tekauz, A.; Gilbert, J. (2001) Vegetative compatibility among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zea*) isolates from barley spikes in southern Manitoba. **Can J of Plant Pathol** 23: 83-87.
- Melo, L. S.; & Valarini, P. J. (1995) Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Sci Agricola** 52: 326-330.
- Mes, J. J.; Van Doorn, J.; Roebroek, E. J. A.; Van Egmond, E.; Van Aartrijk, J.; Boonekamp, P. M. (1994) Restriction fragment length polymorphisms, races and vegetative compatibility groups within a worldwide collection of *Fusarium* f. sp. *gladioli*. **Plant Path** 43: 362-370.
- Mes, J. J.; Westeijn, E. A.; Herlaar, F.; Lambalk, J. J. M.; Wijbrandi, J.; Haring, M. A.; Cornelissen, B. J. C. (1999). Biological and molecular characterization of *Fusarium*

- oxysporum* f. sp. *lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. **Phytopathology** 89: 156-160.
- Monte, E. (2001) Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **Int Microbiol** 4: 1-4.
- Nechet, K. L.; Halfeld-Vieira, B. A.; Pereira, P. R. V. S. (2004) Diagnóstico de doenças de bananeira no estado de Roraima. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento: Embrapa Roraima** Novembro.
- Ogiso, H.; Fujinaga, M.; Saito, H.; Takehara, T.; Yamanaka, S. (2002) Physiological races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* isolated from crisphead lettuce in Japan. **J Gen Plant Pathol** 68: 292-299.
- Paradela, A. L. (2002) Comportamento “in vitro” de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, contra isolados de *Trichoderma* sp. **Relatório técnico de Trichoderma. Natural Rural**: 1-5.
- Puhalla, J. E. (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. **Can J Botany** 62: 540-545.
- Reis, A.; Boiteux, L. S.; Giordano, L. B.; Costa, H.; Lopes, C. A. (2004) Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 3 em tomate no Brasil e seleção de novas fontes de resistência ao patógeno. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa Hortaliças**.
- Reis, A.; Costa, H.; Boiteux, L. S.; Lopes, C. A. (2005) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fito Bras** 30: 426-428.
- Reis, A.; Boiteux, L. S.; Urban, A. F.; Costa, H. (2006) Estabelecimento e caracterização a nível de raça de uma coleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 19** – Embrapa Hortaliças.
- Reis, A & Boiteux, L. S. (2007). Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro state, Brazil. **Hortic Bras** 25: 451-454.
- Sánchez, V.; Rebolledo, O.; Picaso, R.M.; Cárdenas, E.; Córdova, J.; González, O.; Samuels, G.J. (2007) In vitro antagonismo of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia** 163: 49-58.
- Santos, M. M. dos & Noronha, J. F. (2001) Diagnóstico da cultura do tomate de mesa no município de Goianópolis, estado de Goiás, Brasil. **Pesq Agropec Trop** 31: 29-34.

- Santos, B. A.; Zambolim, L.; Ventura J. A.; Vale, F. X. R. (2002). Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl, em abacaxizeiro. **Fito Bras** 27: 101- 103.
- Segarra, G.; Casanova, E.; Avilés, M.; Trillas, I. (2009) *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plant in soilless culture trough competition for iron. **Microb Ecol** disponível online <http://www.springerlink.com/content/d5581727x37h2202>
- Shaw, I. M. & Taylor, A. (1986) The chemistry of peptides related to metabolites of *Trichoderma* spp. 2. An improved method of characterization of peptides of 2-methylalanine. **Can J Chem** 64: 164-173.
- Silva, J. C. & Bettioli, W. (2005) Potential of non pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of *Fusarium* wilt of tomato. **Fito Bras** 30: 409-412.
- Simão, R. & Rodríguez, T. D. M. (2008) Evolução da Produção de tomate de mesa no estado de Rondônia. **Anais XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**.
- Song, W.; Zhou, L.; Yang, C.; Cao, X.; Zhang, L.; Liu, X. (2004) Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. **Crop Prot** 23: 243-247.
- Stadnik, M. J. & Talamini, V. (2004) Manejo ecológico de doenças de plantas. Ed. Florianópolis, SC: CCA/ UFSC. 293p.
- Swift, C. E.; Wickliffe, E. R.; Schwartz, H. F.; (2002) Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in Colorado. **Plant Dis** 86: 606-610.
- Vakalounakis, D. J & Fragdiaskis, G. A. (1999) Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD fingerprinting. **Phytopathology** 89: 161-168.
- Vakalounakis, D. J.; Wang, Z.; Fragkiadakis, G. A.; Skaracis, G. N.; Li, D.-B. (2004) Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG and RAPD. **Plant Dis** 88: 645-649.
- Valenzuela-Ureta, J. G.; Lawn, D. A.; Heisey, R. F.; Zamudio-Guzman, V. 1996. First report of *Fusarium* wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, of tomato in Mexico. **Plant Dis** 80: 105.
- Vinale, F.; Ghisalberti, E. L.; Sivasithamparam, K.; Marra, R.; Scala, F.; Lorito, M. Secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. and their role interaction of this fungus with plants

and other microorganisms. In: XLIX Italian Society of agricultural genetics annual congress. **Abstracts**. Pp. 12-15. Potenza, Italy. 2005.

- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L.; Marra, R.; Woo, S. L.; Lorito, M. (2008) *Trichoderma* –plant- pathogen interactions. **Soil Biol Biochem** 40: 1-10.
- Woo, S.L.; Scala, F.; Ruocco, M.; Lorito, M. (2006) The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology** 96: 181- 185.
- Zhihao, X.; Kaimay, H.; Weiling, S.; Sengjiu, Z.; Guojing, L.; Liping, C.; Zhihui, X.; Hongxia, W.; Xiuchu, X.; Guangliang, X.; Baishen, J. (2000) The determination of physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in Zhejiang, China. **Acta Phys Plant** 22: 356- 358.