

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E PATOGENICIDADE DE
Fusarium spp. EM GENÓTIPOS DE SOJA EM SISTEMA
PLANTIO DIRETO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paola Mendes Milanesi

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E PATOGENICIDADE DE
Fusarium spp. EM GENÓTIPOS DE SOJA EM SISTEMA
PLANTIO DIRETO**

por

Paola Mendes Milanese

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia.**

Orientador: Prof^a. PhD. Elena Blume

Santa Maria, RS, Brasil

2009

M637c Milanesi, Paola Mendes.
Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema de plantio direto / elaborada por Paola Mendes Milanesi ; orientadora Elena Blume. - Santa Maria, RS, 2009.
91 f. : il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

1. Agronomia 2. Soja 3. *Fusarium* 4. Podridão vermelha 5. Raiz da soja 6. Biocontrole 7. *Trichoderma* 8. Metabólitos tóxicos I. Blume, Elena . II. Título.

CDU: 633.633.34

Ficha catalográfica elaborada por
Denise Barbosa dos Santos - CRB10 / 1456

© 2009

Todos os direitos autorais reservados a Paola Mendes Milanesi. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Av. Roraima, Depto de Defesa Fitossanitária, prédio 42, sala 3225. Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900.

Fone: (0xx) 55 3220-8015 ou (0xx) 55 9935-3785 - E-mail: paola.milanesi@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E PATOGENICIDADE DE
Fusarium spp. EM GENÓTIPOS DE SOJA EM SISTEMA
PLANTIO DIRETO**

elaborada por
Paola Mendes Milanesi

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Elena Blume, PhD.
(Presidente/Orientadora) - UFSM

Marlove Fátima Brião Muniz, Dra. (UFSM)

Carolina Cardoso Deuner, Dra. (FUNDACEP)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, MOACIR e INÊS, os grandes responsáveis pela minha formação, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e incentivo incondicionais, durante toda minha vida.

Dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho, em especial:

À Deus, sinônimo de força e perseverança em minha vida.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela formação adquirida e oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

À professora Elena Blume pela oportunidade, orientação e confiança em meu trabalho.

À Fundação Centro de Experimentação e Pesquisa (FUNDACEP), local onde realizei as coletas de solo que originaram os dados que constam neste trabalho.

À Profa. Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, pela co-orientação deste trabalho.

À banca examinadora, Dra. Carolina Cardoso Deuner e Profa. Dra. Marlove Fátima Brião Muniz – também na qualidade de co-orientadora, muito obrigada.

As Dras. Luciana Zago Ethur e Josiane Pacheco Menezes pela oportunidade de trabalho junto aos seus projetos e pelos conhecimentos adquiridos enquanto aluna de iniciação científica.

À Emanuele Junges, bolsista do projeto, Simone Cristiane Brand e Miria Durigon: “meu fiel secretariado”: muito obrigada pela ajuda responsável durante a execução deste trabalho e também pelos bons momentos de aprendizado, troca de idéias e descontração que compartilhamos.

A Jardes Bragagnolo pelo companheirismo, gentileza, compreensão, incentivo e auxílio. Muito obrigada!!

À Cátia Camera, Fabiana Milanesi e Clarice Gindri Manzoni pela compreensão e também pela grande amizade que nos une.

Aos queridos amigos e funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, Maria Nevis Deconto Weber e Fernando Gnocato Sacoll por todo o incentivo, auxílio e apoio dados, um agradecimento muito especial.

À Marizete e Angelita, funcionárias do Departamento de Defesa Fitossanitária, o meu muito obrigada.

À profa. Luciane Jacobi pelo auxílio prestado durante a análise dos dados.

Ao Prof. Rogério Bellé pela colaboração no experimento realizado na casa-de-vegetação.

Aos amigos e colegas: Johnathan Rodrigues, Daniele Cardoso Pedroso, Igor Poletto, Caroline Gulart, Betânia Brum, Denise Cecconi, Diego Golle e Ana Lúcia Gomes meu sincero agradecimento.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Fitopatologia, pela agradável convivência e auxílio nos trabalhos, além das rodas de chimarrão.

Muito obrigada!!!!

“Entre razões e emoções, a saída é fazer valer a pena...”

(NX Zero)

RESUMO GERAL

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp. EM GENÓTIPOS DE SOJA EM SISTEMA PLANTIO DIRETO

AUTOR: PAOLA MENDES MILANESI

ORIENTADORA: ELENA BLUME

LOCAL DE DATA DA DEFESA: SANTA MARIA, 27 DE FEVEREIRO DE 2009.

A Podridão Vermelha da Raiz da soja (PVR), causada por espécies de *Fusarium*, é uma doença de difícil controle, não existindo técnicas de manejo e cultivares resistentes que tenham resultados positivos a longo prazo. Assim, este trabalho objetivou quantificar populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. associadas à oito genótipos de soja, cultivados em sistema plantio direto, observar se o biocontrole de *Fusarium* spp. difere entre isolados de *Trichoderma* spp., identificar isolados de *Fusarium* spp. obtidos de diferentes genótipos e verificar sua toxicidade e patogenicidade a dois genótipos de soja. Amostras de solo e raízes foram coletadas em parcelas experimentais na Fundação Centro de Experimentação e Pesquisa (FUNDACEP), obtendo-se isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. Não houve diferença na população de *Fusarium* spp. em plantas com sintomas de PVR entre os diferentes genótipos. Para *Trichoderma* spp., houve diferença entre as populações nos genótipos de plantas com e sem sintomas de PVR, tendo o genótipo CEPS 06006 RR apresentado maior população do antagonista. No teste de confronto direto, oito isolados de *Trichoderma* spp. obtiveram a melhor nota (um), em relação a *Fusarium* spp. e isolados de *Trichoderma* spp. oriundos de solo em áreas com o sintoma de PVR foram mais eficientes. Foram identificadas nove espécies de *Fusarium*: *F. avenaceum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. kyushuense*, *F. graminum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides* e *F. lateritium*. Todos os isolados de *Fusarium* spp. provocaram clorose internerval, necrose e morte de plântulas no teste de toxicidade. No teste de patogenicidade, em plantas inoculadas com o patógeno houve aumento na massa seca de parte aérea e de raízes, no número de vagens, indicando que pode haver especificidade das espécies estudadas em relação ao genótipo.

Palavras-chave: Podridão Vermelha da Raiz; *Trichoderma*; biocontrole; metabólitos tóxicos;

ABSTRACT GENERAL

Master of Science Dissertation
Graduate Program in Agronomy
Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brazil

CHARACTERIZATION, TOXICITY AND PATHOGENICITY OF *Fusarium* spp. IN SOYBEAN GENOTYPES UNDER NO TILLAGE

AUTHOR: PAOLA MENDES MILANESI

ADVISOR: ELENA BLUME

LOCATION AND DATE OF PRESENTATION: SANTA MARIA, 27 FEBRUARY 2009.

The sudden death syndrome (SDS), caused by species of *Fusarium*, is a disease difficult to control and there are no management techniques and resistant cultivars that give long-term positive results. This study aimed to assess populations of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. associated to eight soybean genotypes, cultivated under no tillage; to determine if the control of *Fusarium* varies among isolates of *Trichoderma*; to identify isolates of *Fusarium* spp. obtained from different genotypes, and to determine their toxicity and pathogenicity to two genotypes of soybean. Soil and roots were collected from experimental plots located at the Fundação Centro de Experimentação e Pesquisa (FUNDACEP), obtaining isolates of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. There were no differences in the population of *Fusarium* spp. in plants with symptoms of SDS among the different genotypes. For *Trichoderma* spp. there was a significant difference among genotypes from plants with and without symptoms of SDS and the genotype CEPS 06006 RR had the biggest population of the antagonist. In the direct confrontation test, eight isolates of *Trichoderma* spp. obtained the highest score (1) in relation to the control of *Fusarium* spp. and isolates of *Trichoderma* spp. from soil of areas with the SDS symptom were more aggressive. Nine species of *Fusarium*: *F. avenaceum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. Acuminatum*, *F. kyushuense*, *F. graminum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides* and *F. lateritium* were identified. All isolates promoted internervial chlorosis, necrosis and death of seedlings in the toxicity test. In the pathogenicity test in plants inoculated with the pathogen there was an increase in leaves and roots dry weight and in the number of pods, indicating that there may be species specificity of the species studied in relation to genotype.

Keywords: Sudden death syndrome; *Trichoderma*; biocontrol; toxic metabolites.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Coleta de solo: A – vista da área do EPIR/FUNDACEP; B – planta com sintoma reflexo ‘folha carijó’; C – amostra coletada junto ao solo adjacente. Cruz Alta, RS. 2007.....	27
FIGURA 2 Raízes de soja com sintomas de PVR: A – esporulação externa de coloração azulada característica de <i>F. solani</i> f. sp. <i>glycines</i> ; B e C – corte expondo coloração avermelhada e azulada no lenho da raiz, respectivamente; D – micélio abundante sobre os cortes de raízes de soja após 48 h de incubação. Santa Maria, RS. 2007.....	28
FIGURA 3 Teste de confronto direto. A: discos contendo micélio de <i>Fusarium</i> spp. (à esq.) e <i>Trichoderma</i> spp. (à dir.). e B: crescimento dos fungos após sete dias de incubação. Santa Maria, RS. 2008.....	31
FIGURA 4 Notas atribuídas a isolados de <i>Trichoderma</i> spp. conforme sua performance no teste de confronto direto. A: nota 1; B: nota 2; C: nota 3 e D: nota 4. Santa Maria, RS. 2008.....	31
FIGURA 5 UFCs.g ⁻¹ de solo de <i>Fusarium</i> spp. em solo aderido à raízes de diferentes genótipos de soja, sem sintomas de PVR, sob plantio direto. Santa Maria, RS. 2007.....	33
FIGURA 6 UFCs.g ⁻¹ de solo de <i>Trichoderma</i> spp. em solo adventício à raízes de diferentes genótipos de soja, sem sintomas de PVR, sob plantio direto. Santa Maria, RS. 2007.....	34
FIGURA 7 UFCs.g ⁻¹ de solo de <i>Trichoderma</i> spp. em solo adventício à raízes de diferentes genótipos de soja, com sintomas de PVR, sob plantio direto. Santa Maria, RS. 2007.....	35
FIGURA 8 Sintomas de toxidez de filtrados de cultura de <i>Fusarium</i> spp. e escala de notas para severidade de doença foliar. 1: Testemunha; 2: nota 2; 3: nota 3; 4: nota 4 e 5: nota 5. Santa Maria, RS. 2008.....	53
FIGURA 9 Escala de notas aplicadas ao aspecto do sistema radicular de plântulas de soja expostas à filtrados de cultura de isolados de <i>Fusarium</i> spp. 0: nota 0; 1: nota 1; 2: nota 2 e 3: nota 3. Santa Maria, 2008.....	54
FIGURA 10 Colônias de espécies de <i>Fusarium</i> identificadas utilizando-se critérios morfológicos. A: <i>F. acuminatum</i> ; B: <i>F. subglutinans</i> ; C: <i>F. graminum</i> ; D: <i>F. solani</i> ; E: <i>F. kyushuense</i> e F: <i>F. verticillioides</i> . Santa Maria, 2008.....	59
FIGURA 11 Estruturas encontradas em espécies de <i>Fusarium</i> utilizadas como critérios morfológicos para identificação. A: M- macroconídios; F-fiálides e E-esporodóquio; B: microconídios em cadeia; C: microconídios em falsas cabeças; D: clamidósporos; E e F: desenhos esquemáticos ilustrando as estruturas conjuntamente.....	60
FIGURA 12 Severidade de doença foliar em plântulas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR expostas a filtrados de cultura de diferentes isolados de <i>Fusarium</i> spp. após oito dias. Santa Maria, RS.....	66

FIGURA 13 Emissão de raízes em plântulas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR expostas a filtrados de cultura de diferentes isolados de <i>Fusarium</i> spp. após oito dias. Santa Maria, RS. 2008.....	66
FIGURA 14 Comprimento de raízes de plântulas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR expostas a filtrados de cultura de diferentes isolados de <i>Fusarium</i> spp. após oito dias. Santa Maria, RS. 2008.....	68
FIGURA 15 Evolução dos sintomas da doença em plântulas de soja expostas a filtrados de cultura de diferentes espécies de <i>Fusarium</i> . A : clorose internerval nos folíolos inferiores aos três dias de exposição ao filtrado; B : clorose internerval em detalhe; C : clorose internerval e necrose de bordos no primeiro trifólio; D : comparação entre uma planta imersa em solução de filtrado de cultura (exibindo clorose) e a testemunha (imersa em solução de KH_2PO_4); E : plântula aos oito dias de exposição ao filtrado de cultura, exibindo abscisão de trifólios e F : plântulas imersas em solução de filtrado, já sem os trifólios, em comparação às testemunhas. Santa Maria, RS. 2008.....	69
FIGURA 16 Sintomas observados em plantas de soja de duas cultivares inoculadas com diferentes espécies de <i>Fusarium</i> . A e B : clorose internerval; C : pontuações necróticas nos bordos e na base das nervuras dos folíolos; D : evolução do sintoma passando para uma necrose internerval; E : necrose nos bordos dos folíolos e F : folha carijó, sintoma típico da PVR. Santa Maria, RS. 2008.....	71
FIGURA 17 Número de folhas em plantas de soja inoculadas com diferentes espécies de <i>Fusarium</i> após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008	72
FIGURA 18 Número de vagens em plantas de soja da cultivar FUNDACEP 53 RR inoculadas com diferentes espécies de <i>Fusarium</i> após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.....	73
FIGURA 19 Número de vagens em plantas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR inoculadas com diferentes espécies de <i>Fusarium</i> após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.....	74
FIGURA 20 Diâmetro de colo (mm) em plantas de soja da cultivar FUNDACEP 53 RR inoculadas com diferentes espécies de <i>Fusarium</i> após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.....	75
FIGURA 21 Diâmetro de colo (mm) em plantas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR inoculadas com diferentes espécies de <i>Fusarium</i> após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.....	75
FIGURA 22 Fitomassa seca de parte aérea (g) de plantas de soja inoculadas com diferentes espécies de <i>Fusarium</i> após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.....	76
FIGURA 23 Fitomassa seca de raiz (g) de plantas de soja inoculadas com diferentes espécies de <i>Fusarium</i> após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Valores do teste de Kruskal-Wallis para Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. em genótipos de soja com ou sem sintomas de PVR. Santa Maria, RS. 2007.....	32
TABELA 2 Notas do teste de confrontação direta obtidas pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp., oriundos de solo adjacente à raízes de plantas de soja com e sem sintomas de PVR, em função de isolados de <i>Fusarium</i> spp. Santa Maria, RS. 2007.....	38
TABELA 3 Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. mais competitivos no Teste de Confrontação Direta (nota 1) frente a diversos isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos de plantas com sintomas de PVR. Santa Maria, RS. 2007.....	39
TABELA 4 Escala da severidade de doença foliar com suas respectivas correspondências em porcentagem, para plântulas de soja expostas à filtrados de cultura de <i>Fusarium</i> spp.....	53
TABELA 5 Classificações de plântulas de soja quanto à emissão de raízes quando expostas à filtrados de cultura de <i>Fusarium</i> spp.....	54
TABELA 6 Escala de avaliação da severidade dos sintomas de PVR no sistema radicular da soja.....	56
TABELA 7 Espécies de <i>Fusarium</i> associadas ao sistema radicular de genótipos de soja com sintomas de podridão vermelha da raiz. Santa Maria, RS. 2008.....	58
TABELA 8 Valores do teste de Kruskal-Wallis para severidade foliar, emissão de raízes e comprimento de raízes em plântulas da cultivar FUNDACEP 53 RR quando expostas à filtrados de cultura de isolados de <i>Fusarium</i> spp. Santa Maria, RS. 2008.....	64
TABELA 9 Valores do teste de Kruskal-Wallis para severidade de doença foliar, emissão de raízes e comprimento de raízes em plântulas da cultivar FUNDACEP 59 RR quando exposta a filtrados de cultura de isolados de <i>Fusarium</i> spp. Santa Maria, RS. 2008.....	65
TABELA 10 Análise de variância para as variáveis respostas estudadas no teste de patogenicidade de diferentes isolados de <i>Fusarium</i> spp. à soja. Santa Maria, RS. 2008..	91

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).....	86
ANEXO 2 Meio de cultura Folha de cravo – Ágar (FCA ou CLA).....	87
ANEXO 3 Meio de cultura Ágar-água (AA).....	88
ANEXO 4 Meio de cultura YPD.....	89

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 Tabela 10 – Análise de variância para as variáveis resposta estudadas no teste de patogenicidade de diferentes isolados de <i>Fusarium</i> spp. à soja. Santa Maria, RS. 2008.....	91
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
CAPÍTULO I PRESENÇA DOS GÊNEROS <i>Fusarium</i> E <i>Trichoderma</i> EM GENÓTIPOS DE SOJA SOB PLANTIO DIRETO, COM E SEM SINTOMAS DE PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ, E ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. A ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>Fusarium solani</i>.....	22
RESUMO.....	22
1.1 INTRODUÇÃO.....	23
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1.2.1 Coleta das amostras a campo e obtenção dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.....	27
1.2.2 Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com potencial antagonismo a isolados do complexo <i>Fusarium solani</i>	31
1.2.3 Procedimento estatístico.....	33
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
1.3.1 População de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. em genótipos de soja sob plantio direto.....	33
1.3.2 Seleção “ <i>in vitro</i> ” de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. para controle de <i>Fusarium</i> spp. em soja.....	38
1.4 CONCLUSÕES.....	42
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO II CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, TOXICIDADE E PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE <i>Fusarium</i> spp. ISOLADAS DE RAÍZES DE GENÓTIPOS DE SOJA COM SINTOMAS DE PVR.....	49
RESUMO.....	49
2.1 INTRODUÇÃO.....	50
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.2.1 Obtenção dos isolados de <i>Fusarium</i>	55
2.2.2 Efeitos de filtrados de cultura de <i>Fusarium</i> spp. sob plântulas de soja.....	56
2.2.3 Teste de patogenicidade.....	59
2.2.4 Procedimento estatístico.....	61
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
2.3.1 Espécies de <i>Fusarium</i> e sua caracterização morfológica.....	62

2.3.2 Toxicidade de filtrados de cultura de isolados de <i>Fusarium</i> à plântulas de soja.....	69
2.3.3 Teste de patogenicidade.....	74
2.4 CONCLUSÕES.....	82
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS.....	89
APÊNDICES.....	94

INTRODUÇÃO

A soja é a oleaginosa mais cultivada no mundo e o Brasil ocupa lugar de destaque no ranking dos maiores produtores do grão. Isso se deve ao crescimento da produção, aumento da capacidade competitiva da soja brasileira, desenvolvimento de cultivares de alto rendimento (adaptadas às diferentes condições agroclimáticas do país) e modernização das técnicas de cultivo e manejo da lavoura. No entanto, entre os principais fatores que limitam a obtenção de maiores rendimentos pela cultura estão as doenças e a importância econômica de cada uma depende das condições meteorológicas de cada safra. Estima-se que as perdas na lavoura de soja, provocadas por doenças, fiquem em torno de 15 a 20%, sendo que algumas podem ocasionar perdas de até 100%.

Como agentes causais de doenças na soja estão os fungos, as bactérias, os vírus e os nematóides. Entretanto, as doenças mais agressivas, tais como ferrugem asiática, cancro da haste, mofo branco e podridões radiculares, são causadas por fungos. Entre as podridões radiculares, uma de importância é a Podridão Vermelha da Raiz (PVR) ou Sudden Death Syndrome (SDS – Síndrome da Morte Súbita), causada por espécies do chamado complexo *Fusarium solani* que constitui um conjunto de espécies de *Fusarium* que, juntas ou isoladamente, são capazes de causar PVR.

O gênero *Fusarium* pode ser encontrado habitando o solo, nas mais diversas regiões geográficas do mundo. Especialmente em locais de climas tropicais e subtropicais, esse fungo é capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos. Pode colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios que são disseminados pelo ar ou pela água. Pela complexidade do sistema solo e pela diversidade de espécies existentes nesse ambiente, o surgimento de variabilidade genética dentro do gênero *Fusarium* é bastante amplo.

Existe também uma vasta diversificação em relação aos sintomas e patogenicidade de cada uma delas quando em contato com o hospedeiro suscetível, fato que dificulta o manejo da doença.

Os sintomas da PVR são mais claramente notados quando a planta está em final de ciclo, quando é possível observar mosqueados cloróticos, clorose internerval, necrose e, em casos mais severos, desfolhamento total e morte da planta. Neste momento, pode-se proceder o isolamento de *Fusarium solani* a partir de raízes e porções mais inferiores do caule da planta. No entanto, não é possível obter culturas do patógeno a partir de folhas.

A doença se caracteriza por manchas avermelhadas, mais visíveis na raiz principal e geralmente localizadas um a dois centímetros abaixo do nível do solo provocando significativa redução no rendimento e, particularmente, no número de vagens por planta. Maior severidade da doença é observada quando a soja é cultivada em talhões, cuja umidade do solo é mais elevada ou em lavouras irrigadas. No Brasil, a PVR foi identificada pela primeira vez associada a cultivar UFV-1, na safra 81/82 em São Gotardo – MG. A doença logo se disseminou para outras regiões produtoras, tornando-se um dos principais patossistemas para a cultura da soja. A PVR é um problema em áreas cultivadas com soja em grandes regiões produtoras em países como Estados Unidos, Canadá, Argentina, Paraguai, Bolívia e Uruguai.

A doença pode ser transmitida por sementes de soja contendo esporos e clamidósporos de *Fusarium solani*, levando à infecção através do desenvolvimento de micélio do patógeno nos tecidos do hospedeiro. A transmissibilidade do fungo através da massa de grãos pode perdurar por até um ano em sementes armazenadas e resíduos de colheita assim como partículas de solo podem, efetivamente, transferir inóculo de *F. solani* quando em contato com sementes de soja.

Por ser causada por um patógeno de solo, a PVR é considerada de difícil controle e práticas culturais que propiciem um elevado rendimento da soja também favorecem a ocorrência da doença. O sistema plantio direto, principal método de manejo para a cultura da soja, permite o acúmulo de matéria orgânica e nutrientes minerais que formam uma camada favorável ao desenvolvimento microbiano, potencializando a atividade de fungos causadores de doenças radiculares e vasculares associados ao solo.

Por isso, pode-se incluir a utilização de agentes de controle biológico dentro do manejo integrado de doenças de plantas, uma vez que esses vêm se mostrando uma medida eficaz no controle de doenças veiculadas por patógenos de solo em

várias culturas. Um dos gêneros mais empregados é *Trichoderma*, fungo saprófita de solo que apresenta antagonismo a várias espécies de patógenos, entre elas *Fusarium* spp. Em função de sua atividade como biocontrolador, o gênero tem sido intensamente estudado tanto em relação à sua variabilidade genética, quanto do ponto de vista da fisiologia do parasitismo. Porém, existem poucos estudos que relatem a existência de *Trichoderma* spp. associado ao solo aderido à raízes em plantas de soja, assim como de espécies do fungo que tenham sucesso no controle do complexo *Fusarium solani*.

Muitos isolados de *Trichoderma* spp. crescem rapidamente, produzindo esporos e antibióticos eficazes. Essas características tornam esses fungos organismos ecologicamente bem sucedidos podendo ser encontrados em solos agricultáveis, florestas, pântanos, desertos, tundras, trópicos e Antártica, restos culturais, raízes de várias espécies vegetais, sementes e ar. É um microrganismo bastante utilizado na agricultura e na indústria por ser de fácil reprodução (produz grandes quantidades de conídios) e ter uma diversidade de formulações possíveis: líquida (água ou óleo) e seca (grânulos e pós molháveis). Atualmente, muitos produtos à base de *Trichoderma* spp. são encontrados para venda em sítios da Internet, sendo que muitos são registrados em vários países e aplicados para proteger e melhorar o rendimento das plantas cultivadas.

É possível que agentes de controle biológico, quando em contato com um hospedeiro infectado por fitopatógenos, provoquem diminuição na evolução dos sintomas da doença. Nesse caso, a relação íntima entre o antagonista e a planta faz com que ocorra melhoria no vigor do vegetal e, conseqüentemente, no peso seco e rendimento de sementes. Alguns mecanismos utilizados pelos antagonistas a fim de inibir o desenvolvimento do patógeno ainda são desconhecidos, porém esses microrganismos são capazes de metabolizar substâncias como compostos antibióticos (peptídeos, lipopeptídeos e fenilpropanol) e compostos fosfolipídicos. A mistura de antagonistas tais como *Trichoderma*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e outros, com fertilizantes é capaz de potencializar o controle da doença e incrementar o rendimento da planta.

A forma como agentes de biocontrole agem se dá em função da manifestação de interações entre o patógeno, o agente de controle biológico, a comunidade microbiana que envolve a planta e o ambiente de cultivo. A utilização do controle biológico dentro de uma tática de manejo integrado de doenças veiculadas por

patógenos de solo é bastante complexa, pois o ambiente em questão é muito dinâmico em função da rizosfera, camada de solo existente ao redor do sistema radicular. A rizosfera é conhecida por ser uma região de intensa atividade microbiana, bem como por possuir maior população microbiana comparada com solo não rizosférico.

O estudo da rizosfera de diferentes espécies vegetais, assim como de plantas doentes e saudáveis, é um importante elemento para entender a eficiência ou não dos agentes de biocontrole. É possível que haja diversificação em relação a um microhabitat mais favorável ao antagonista de acordo com o material vegetal assim como a sanidade da planta em questão.

Nesse sentido, em relação ao patossistema “*Fusarium solani* – soja” e à presença de espécies de *Trichoderma* spp., os objetivos deste trabalho foram:

- buscar um melhor entendimento das relações entre *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solo adjacente às raízes de plantas de soja cultivadas em sistema plantio direto (SPD);
- quantificar as populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. presentes em solo adjacente às raízes de plantas de soja, com e sem sintomas de PVR;
- estudar o antagonismo “*in vitro*” de isolados de *Trichoderma* spp. a isolados do complexo *Fusarium solani*;
- caracterizar morfológicamente isolados de *Fusarium* spp. obtidos de raiz e colo de plantas com sintomas de PVR;
- verificar a resposta de duas cultivares de soja frente à exposição de filtrados de cultura de *Fusarium* spp. e também em relação à patogenicidade desses isolados.

CAPÍTULO I

PRESENÇA DOS GÊNEROS *Fusarium* E *Trichoderma* EM GENÓTIPOS DE SOJA EM SISTEMA PLANTIO DIRETO E ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. A ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium solani*

RESUMO

O sistema plantio direto, principal método de cultivo utilizado na soja, permite maior acúmulo de matéria orgânica e, conseqüentemente, maior proliferação de microrganismos saprófitas e patogênicos. Nessa cultura, a Podridão Vermelha da Raiz (PVR) provoca redução no rendimento e por ser veiculada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, patógeno de solo, seu controle torna-se difícil. Porém, o biocontrole, estratégia que tem mostrado eficiência no controle de podridões radiculares e murchas, pode constituir uma forma de controle dessa doença. Além disso, o estudo das populações de *Trichoderma* e *Fusarium*, associados a genótipos de soja com ou sem sintomas da doença, torna-se importante na elaboração de um programa de controle da PVR. Assim, o presente trabalho objetivou quantificar a ocorrência desses fungos em solo aderido a raízes de soja, com e sem sintomas de PVR em oito genótipos de soja, e avaliar as relações antagônicas entre isolados de *Trichoderma* e *Fusarium*, obtidos de solo e raiz, respectivamente. Em uma área experimental da Fundação Centro de Experimentação e Pesquisa (FUNDACEP) foram realizadas coletas de solo e raízes em genótipos de soja. As amostras foram processadas em laboratório, sendo feitas diluições seriadas das amostras de solo adjacente a raízes, contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs/g de solo) de ambos os fungos e isolamento de colônias de *Trichoderma* spp. Com as raízes coletadas, procedeu-se a confecção de câmaras úmidas para isolamento de *Fusarium* spp. Para verificação do antagonismo entre *Trichoderma* e *Fusarium*, foi realizado o teste de confrontação direta, atribuindo-se notas aos isolados de *Trichoderma* conforme sua capacidade de inibir o crescimento de *Fusarium*. Através da contagem de UFCs/g de solo, foi possível observar que não houve diferença significativa na população de *Fusarium* spp. em plantas com sintomas de PVR para os diferentes genótipos. Para *Trichoderma* spp., houve diferença significativa entre as populações em plantas com ou sem sintomas de PVR. Em ambos os casos, o genótipo CEPS 06006 RR apresentou a maior população do antagonista associada ao solo adjacente à raiz ($5,75 \times 10^6$ UFCs/g solo). No teste de confrontação direta, oito isolados de *Trichoderma* spp. obtiveram nota 1, melhor performance que um antagonista pode ter em relação ao controle de *Fusarium* spp. Os isolados de *Trichoderma* spp. de solo em áreas com o sintoma de PVR tiveram melhor e mais rápido estabelecimento.

Palavras-chave: *Glycine max* L. [Merril], Podridão Vermelha da Raiz, fungos de solo, população fúngica, controle biológico.

1.1 INTRODUÇÃO

A soja é a oleaginosa mais cultivada no mundo. No Brasil, a estimativa para a produção na safra 2008/2009 é de 59,8 milhões de toneladas em uma área cultivada de, aproximadamente, 21,4 milhões de hectares com um rendimento em torno de 2.794 kg/ha (IBGE, 2008). Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos na cultura estão as doenças que podem provocar perdas de 15 a 20%, entretanto algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (EMBRAPA, 2007). Nessas áreas de cultivo, o sistema de plantio mais adotado é o de plantio direto na palha, que prioriza o mínimo revolvimento do solo. Assim, o acúmulo de matéria orgânica facilmente disponível constitui um ambiente ótimo para o desenvolvimento de muitos fungos que são típicos causadores de doenças na soja.

Entre as doenças que podem estar associadas à soja estão aquelas causadas por patógenos de solo, que são de difícil controle pela complexidade do sistema solo e cuja incidência indica um desequilíbrio biológico no sistema. Uma dessas doenças é a Podridão Vermelha da Raiz (PVR), causada pelo complexo *Fusarium solani*, que pode ser encontrada nas áreas cultivadas com soja em todo o mundo e é um dos principais desafios à cultura. Sua incidência afeta grande número de lavouras no Brasil e práticas culturais que propiciem elevado rendimento da soja, também favorecem a ocorrência da doença. A disseminação do patógeno pode se dar através da água de irrigação e uso de implementos agrícolas que contenham propágulos de solo contaminado pelo fitopatógeno (DAVIS et al., 2006).

Esse gênero exibe alto grau de diversidade em relação à atributos morfológicos, fisiológicos e ecológicos e não é surpreendente que representantes desse gênero ocorram na maioria dos nichos ecológicos nas mais diversas regiões geográficas do mundo (BURGESS et al., 1997). Recentemente, propôs-se que a PVR pode ser causada por duas ou mais espécies de *Fusarium*, sendo que, na América do Norte, o principal agente causal da doença seria *F. virguliforme* e, na América do Sul, *F. tucumaniae* (AOKI et al., 2005). No entanto, essas são propostas lançadas pelos micologistas e ainda estão sendo estudadas pela comunidade científica, sendo que a terminologia *F. solani* f. sp. *glycines* continua sendo usada.

A PVR se caracteriza por manchas avermelhadas, mais visíveis na raiz principal, e geralmente localizadas a um ou dois centímetros abaixo do nível do solo. Com a evolução da infecção, é observada uma expansão da lesão, que passa a circundar a raiz, assumindo coloração castanho-avermelhado escura. A necrose situa-se no tecido cortical, enquanto o lenho da raiz adquire uma coloração castanho-clara, estendendo-se pelo tecido lenhoso desde a haste até vários centímetros acima do nível do solo e, à medida que as lesões evoluem, pode ser observada uma massa azulada formada por esporos do patógeno (FREITAS et al., 2004). Na parte aérea há a manifestação de um sintoma reflexo conhecido como folha carijó, que é caracterizado por manchas cloróticas e necróticas internervais e a região das nervuras permanece com coloração verde normal (ALMEIDA et al., 1995). Esse sintoma é mais evidente próximo à fase de florescimento e pode progredir causando completa desfolha das plantas.

Por se tratar de uma doença provocada por um patógeno de solo, muitas interações existentes nesse ambiente são desconhecidas. Existe uma comunidade complexa na qual uma grande variedade de interações é desenvolvida e, assim, os microrganismos componentes da rizosfera não se encontram na forma de culturas puras. Essa região é altamente influenciada pelas raízes das plantas e possui características bastante diferentes das do solo. Sua composição e estrutura são influenciadas durante o ciclo vegetativo e também pela composição e umidade do solo (PEREIRA, 2000). O mesmo autor ainda menciona que a rizosfera é um ambiente rico em compostos orgânicos como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e vitaminas, consumo de O₂ e liberação de CO₂ e absorção seletiva de íons nutritivos, que corroboram para o desenvolvimento da planta.

A complexa comunidade microbiana que habita a rizosfera interage com os patógenos de solo e influenciam, conseqüentemente, a infecção pelos fungos. Na rizosfera, além dos microrganismos patogênicos, também existem fungos, bactérias e actinomicetos que possuem atividade antagonística contra fitopatógenos. Eles podem afetar adversamente densidades de populações, dinâmicas temporais e espaciais e atividades metabólicas de patógenos de solo a partir da produção de metabólitos antimicrobianos secundários (antibiose), enzimas líticas, entre outros. A concentração em que esses compostos são tóxicos para agentes patogênicos

depende da substância produzida pelo antagonista e do alvo que se pretende atingir (RAAIJMAKERS et al., 2008).

Muito se tem pesquisado à respeito de formas de controle que sejam eficientes perante a PVR. No entanto, por ser causada por um patógeno veiculado pelo solo e por existir uma ampla variabilidade genética entre isolados do fungo, o controle ainda é bastante difícil. Uma estratégia recomendada é a combinação de várias medidas de controle que, conjuntamente, podem fornecer resultados positivos no controle da PVR. Entre essas medidas está o controle biológico e o gênero fúngico *Trichoderma* é um dos mais estudados e utilizados. O gênero apresenta espécies que exercem antagonismo a vários fitopatógenos através do parasitismo e/ou antibiose e têm sido utilizados com sucesso como agentes de biocontrole, promotores de crescimento e na melhoria da germinação e sanidade de sementes (ETHUR et al., 2006). De acordo com Howel (2003), espécies de *Trichoderma* são capazes de suprimir o desenvolvimento de vários fungos fitopatogênicos, e seus mecanismos antagonistas são influenciados pelo tipo de solo, condições de temperatura e umidade e também, pela microflora associada.

Trichoderma é um fungo imperfeito, pertencente à subdivisão Deuteromycotina e possui muitas espécies (BISSET, 1991). Esse fungo cresce rapidamente em meio de cultura, produzindo um micélio aéreo esparso, com pústulas conidiogênicas brancas ou verdes. O tipo de ramificação dos conidióforos e o modo de disposição das fiálides são características utilizadas para identificação morfológica de espécies do gênero. Várias espécies de *Trichoderma* spp. têm sido utilizadas em biocontrole de patógenos radiculares, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. e *Armillaria* spp. Também existem exemplos bem sucedidos de seu uso contra fungos de parte aérea, como é o caso de *Venturia* spp. e *Botrytis* spp. (MELO, 1996).

Pesquisas mostram a existência de *Trichoderma* nativo na rizosfera de algumas culturas, como citrus (GESHEVA, 2002), batata, algodoeiro (SIVAN; CHET, 1989) e tomateiro (LARKIN; FRAVEL, 1998). Sua habilidade em habitar esse ambiente é comprovada (COOK, 1993; ETHUR et al., 2008) assim como sua relação inversa com a incidência de doenças radiculares (MENEZES, 2007). No entanto, há carência de informações sobre sua caracterização em áreas de cultivo com soja.

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivos quantificar as populações de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solo adjacente às raízes de plantas sadias

e doentes e elencar isolados de *Trichoderma* spp., obtidos de solo aderido à raízes com ou sem sintomas da doença, com capacidade antagônica à espécies do complexo *Fusarium solani* em soja.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Coleta das amostras a campo e obtenção dos isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp.

Foram coletadas quatro plantas com sintomas (grupo doente) e quatro plantas sem sintomas (grupo sadio) de Podridão Vermelha da Raiz (PVR), em quatro áreas diferentes, de oito genótipos de soja em parcelas de 2 m², componentes de um Ensaio Preliminar Interno de Rendimento (EPIR), da FUNDACEP (Fundação Centro de Experimentação e Pesquisa), localizada no município de Cruz Alta, RS.

A área onde a coleta de solo e raízes foi realizada é cultivada sob sistema plantio direto (Figura 1). Os genótipos de soja coletados foram: CEPS 06006 RR; CEPS 06002 RR; FUNDACEP 53 RR; CEPS 06010 RR; CEPS 06005 RR; CEPS 06015 RR; FUNDACEP 55 RR e CEPS 06031 RR, constituindo oito tratamentos.

Para coleta das plantas, foi utilizada uma pá de corte que foi lavada com hipoclorito de sódio (2%), álcool (70%) e água destilada a cada troca de amostra. As amostras, juntamente com o solo adjacente, foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária/CCR/UFSM. O solo adjacente às raízes foi retirado com o auxílio de uma escova pequena, sendo que a cada nova amostra, a escova passou por assepsia com detergente líquido de uso doméstico, hipoclorito de sódio (2%), álcool (70%) e água destilada e esterilizada. O solo foi acondicionado em placas de Petri esterilizadas e colocado sob refrigeração a 4°C até sua análise.

Após a remoção do solo, as raízes foram envoltas em papel alumínio, identificadas e guardadas sob refrigeração a 4°C. As raízes foram previamente desinfetadas por lavagem em água corrente seguida por embebição em hipoclorito de sódio a 0,1% por 1 min, álcool 70% por 1 min e água destilada e esterilizada por 1 min. Para retirada do excesso de umidade, as raízes foram colocadas sobre papel

absorvente e, em seguida, colocadas em câmara úmida, utilizando-se caixas Gerbox, para o crescimento e desenvolvimento do patógeno.



FIGURA 1 Coleta de solo: A – vista da área do EPIR/FUNDACEP; B – planta com sintoma reflexo ‘folha carijó’; C – amostra de raiz coletada junto ao solo adjacente. Cruz Alta, RS. 2007.

As caixas Gerbox haviam sido previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2% e álcool (92°GL), contendo papel filtro esterilizado umedecido com água destilada e esterilizada. A incubação das caixas Gerbox foi feita a 23°C e fotoperíodo de 12h e, após 48h, foi realizada a remoção de estruturas de *Fusarium* através da repicagem para meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Anexo 1), para obtenção dos isolados. Foram obtidos isolados de *Fusarium* spp. a partir de

raízes saudáveis e doentes, sendo que aqueles oriundos de raízes doentes foram utilizados, posteriormente no ensaio de confronto direto (Figura 2). Para tal, receberam uma nomenclatura simbólica a fim de discriminar os isolados obtidos sendo:

F: isolado de *Fusarium* spp.;

0XX: genótipo da qual o isolado foi obtido;

d: isolado obtido de raízes de soja com sintomas da doença;

s: isolado obtido de raízes de soja sem sintomas da doença;

A ou **B:** isolados morfológicamente diferentes obtidos de um mesmo genótipo.

Os isolados de *Fusarium* spp. obtidos de plantas com sintomas de PVR também foram identificados quanto à morfologia, de acordo com a chave de classificação de Ventura (2000) e descrições feitas por Gerlach; Nirenberg (1982) e Nelson et al. (1983).



FIGURA 2 Raízes de soja com sintomas de PVR: **A:** esporulação externa de coloração azulada característica de *F. solani* f. sp. *glycines*; **B** e **C:** corte expondo coloração avermelhada e azulada no lenho da raiz, respectivamente; **D:** micélio abundante sobre os cortes de raízes de soja após 48 h de incubação. Santa Maria, RS. 2007.

A partir de amostras de solo adjacente às raízes, foram feitas diluições seriais para a quantificação de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. Para as diluições seriais foram utilizados 5g de solo de cada tratamento, diluídos em 95 mL de água destilada e esterilizada acrescida de duas gotas do emulsificante Tween 80[®]. A suspensão foi agitada por 10 min, em agitador do tipo Fisher – Flexa Mix[™] (USA) e, dessa suspensão, foram feitas diluições seriais até a diluição 10⁻⁴. De cada diluição, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL e colocada em quatro placas de Petri contendo meio BDA acrescido com 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio. Após a incubação por quatro dias (25°C, fotoperíodo de 12h), as colônias de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foram quantificadas, na diluição 10⁻³, e classificadas em nível de gênero, através de observações das placas em microscópio estereoscópico e confecção de lâminas para observação em microscópio ótico, com base na bibliografia especializada (BARNETT; HUNTER, 1999). O número de UFCs de cada gênero fúngico foi determinado pelas seguintes equações (CARTER, 1993):

$$FD = D_i \times D_s \times Q, \text{ em que:}$$

FD = Fator de Diluição

D_i = Diluição inicial

D_s = Diluição subsequente

Q = Quantidade colocada na placa

$$UFCs = \frac{1}{FD} \times n, \text{ em que:}$$

UFCs = Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo

FD = Fator de Diluição

n = Número de colônias contadas na placa

Após a contagem de UFCs, colônias de *Trichoderma* spp. morfologicamente diferentes foram repicadas para meio de cultura BDA para obtenção dos isolados que, posteriormente, foram utilizados no teste de confronto direto. Para identificação dos isolados usou-se a seguinte nomenclatura:

T: *Trichoderma* spp.;

0XX: nome do genótipo do qual o isolado foi obtido;

d: isolado obtido de solo adjacente à raízes de soja com sintomas da doença;

s: isolado obtido de solo adjacente à raízes de soja sem sintomas da doença;

A ou **B:** isolados morfológicamente diferentes obtidos de um mesmo genótipo.

1.2.2 Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial antagônico a isolados do complexo *Fusarium solani*

Nesse experimento, os tratamentos foram constituídos por 12 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de solo adjacente às raízes de plantas de soja com e sem sintomas de Podridão Vermelha da Raiz e 12 isolados de *Fusarium* spp. obtidos de raízes de plantas de soja com sintomas de PVR. Através do Teste de Confrontação Direta, a ação antagônica de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Fusarium* spp. foi testada. Um disco de meio de cultura BDA de 12 mm de diâmetro contendo micélio de *Fusarium* foi transferido para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro), também contendo meio BDA, a 0,5 cm da borda da placa. As placas foram incubadas durante 48 horas a 25°C (\pm 2°C) com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, um disco de meio de cultura BDA com 12 mm de diâmetro, contendo micélio de *Trichoderma* spp., foi transferido para a posição oposta ao disco de micélio de *Fusarium* spp. nas placas de Petri. As placas foram incubadas durante sete dias a 25°C (\pm 2°C) com fotoperíodo de 12 horas (Figura 3).

Ao término do período de incubação, as placas foram avaliadas de acordo com o critério de Bell et al. (1982) (Figura 4), atribuindo notas que variaram de 1 a 5, sendo:

1. Antagonista cresce e ocupa toda a placa.
2. Antagonista cresce e ocupa uma parte do patógeno (2/3 da placa).
3. Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa (nenhum domina o outro).
4. Patógeno cresce e ocupa uma parte do antagonista (2/3 da placa).
5. Patógeno cresce e ocupa toda a placa.

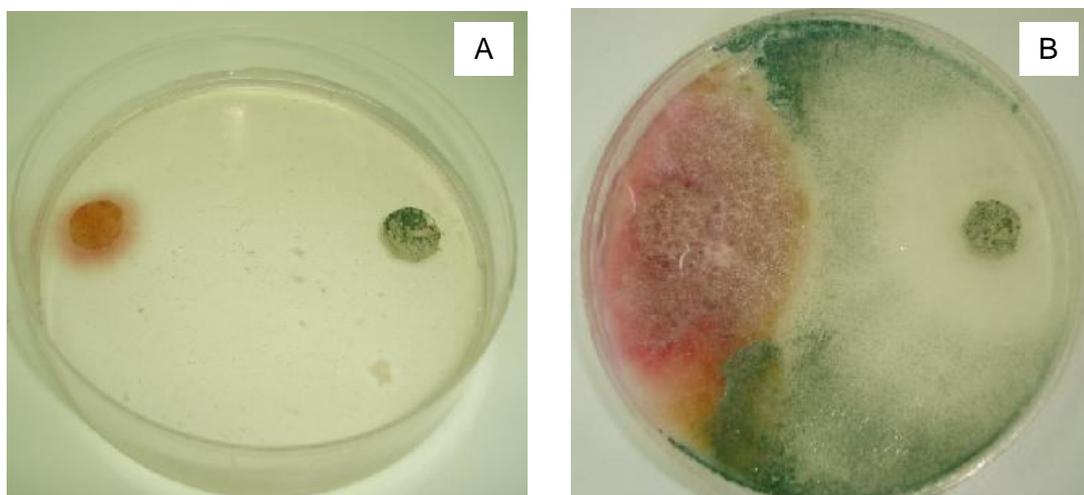


FIGURA 3 Teste de confronto direto. **A:** discos contendo micélio de *Fusarium* spp. (à esq.) e *Trichoderma* spp. (à dir.) e **B:** crescimento dos fungos após sete dias de incubação. Santa Maria, RS. 2008.

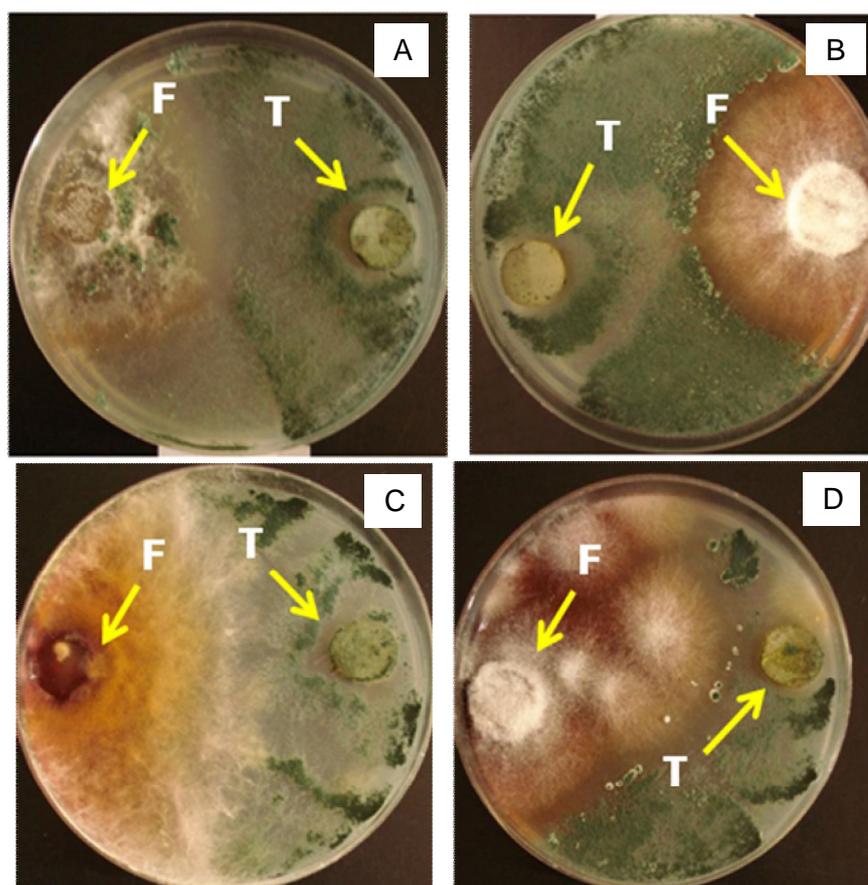


FIGURA 4 Notas atribuídas a isolados de *Trichoderma* spp. conforme sua performance no Teste de Confrontação Direta. **A:** nota 1; **B:** nota 2; **C:** nota 3 e **D:** nota 4. A letra “F” refere-se à *Fusarium* spp. e “T” à *Trichoderma* spp. Santa Maria, RS. 2008.

1.2.3 Procedimento estatístico

O delineamento experimental utilizado para os estudos acima descritos foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Como os dados não seguiram uma distribuição normal, foram empregados testes não-paramétricos. Assim, os valores estimados em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por grama de solo foram submetidos à análise da variância pelo teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL: CASTELLAN, 2006). Para o Teste de Confrontação Direta, a comparação entre as notas atribuídas a cada isolado foi feita através do Teste U de Mann-Whitney. As análises foram feitas utilizando o programa estatístico STATISTICA 6.0.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 População de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em genótipos de soja em sistema plantio direto

A análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis foi feita individualmente para as variáveis UFCs de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp., em plantas doentes e sadias, conforme mostrado na Tabela 1.

TABELA 1 Valores do teste de Kruskal-Wallis para Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em genótipos de soja com ou sem sintomas de PVR. Santa Maria, RS. 2007.

Variáveis	Valor do teste	Valor p*
<i>Fusarium</i> spp. em plantas doentes	10,10700	0,1826
<i>Fusarium</i> spp. em plantas sadias	16,26681	0,0228
<i>Trichoderma</i> spp. em plantas doentes	18,64356	0,0094
<i>Trichoderma</i> spp. em plantas sadias	21,93702	0,0026

(*p): probabilidade de erro ($p < 0,05$). Valores significativos estão em negrito.

Houve significância para UFCs de *Trichoderma* spp., em plantas com e sem sintomas de PVR, e para UFCs de *Fusarium* spp. em plantas sem sintomas da doença, mas não para UFCs de *Fusarium* spp. em plantas com sintomas.

Para as UFCs de *Fusarium* spp. em plantas sem sintomas de PVR, as maiores médias foram encontradas nos materiais FUNDACEP 53 RR, CEPS 06005 RR, CEPS 06031 RR e CEPS 06006 RR e as menores quantidades de UFCs estavam presentes no solo aderido às raízes do material CEPS 06015 RR (Figura 5).

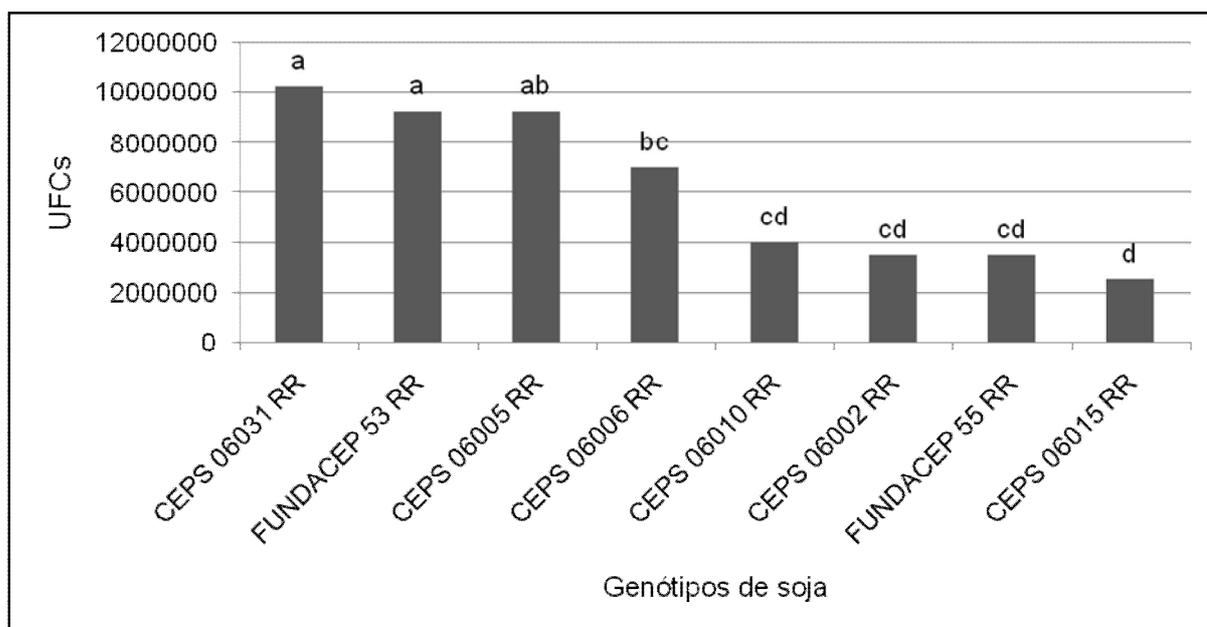


FIGURA 5 UFCs.g⁻¹ de solo de *Fusarium* spp. em solo aderido às raízes de genótipos de soja, sem sintomas de PVR, em sistema plantio direto. Santa Maria, RS. 2007.

A diferença no número de UFCs de *Fusarium* entre genótipos pode ser devida à produção de determinados exsudatos radiculares mais favoráveis a alguns isolados de *Fusarium*, patogênicos ou não, do que para outros. Além disso, também pode haver uma pressão de seleção de espécies melhor adaptadas e com maior competência para se estabelecer e colonizar a porção radicular de determinados genótipos.

A severidade de sintomas foliares para a PVR também pode ser avaliada pela densidade populacional do patógeno no solo, fatores esses que estão positivamente correlacionados (SCHERM et al., 1996). No entanto, quando a planta é atacada por *F. solani* f. sp. *glycines*, raízes de soja produzem quantidades suficientes de gliceolina, uma fitoalexina que atua em resposta à infecção pelo patógeno. Isso parece ser um fator importante no fornecimento de resistência parcial a esse fungo e varia conforme o genótipo de soja (LOZOVAYA et al., 2006).

De acordo com Poletto (2008), em relação à podridão-das-raízes da erva-mate, variações na incidência e na severidade da doença podem estar associadas aos níveis de adubação e à predisposição da planta ao patógeno. Já em relação à PVR, conforme Hershman et al. (1990), a expressão dos sintomas na planta depende de fatores como ano e época de semeadura, pois estes podem afetar a colonização das raízes pelo patógeno.

Espécies do gênero *Fusarium* sobrevivem em restos culturais no solo, através de estruturas de resistência, o que dificulta o controle do patógeno principalmente em áreas onde culturas como feijão e soja são exploradas de forma constante (CAVALCANTI et al., 2002). Além disso, características biológicas, químicas e físicas do solo podem afetar diretamente a distribuição da população de *Fusarium* spp. na lavoura.

Com relação à população de *Trichoderma* spp., os resultados mostraram que houve uma maior quantidade de UFCs no genótipo CEPS 06006 RR seguido do genótipo CEPS 06002 RR independentemente da presença ou não de sintomas de PVR nas plantas (Figuras 6 e 7).

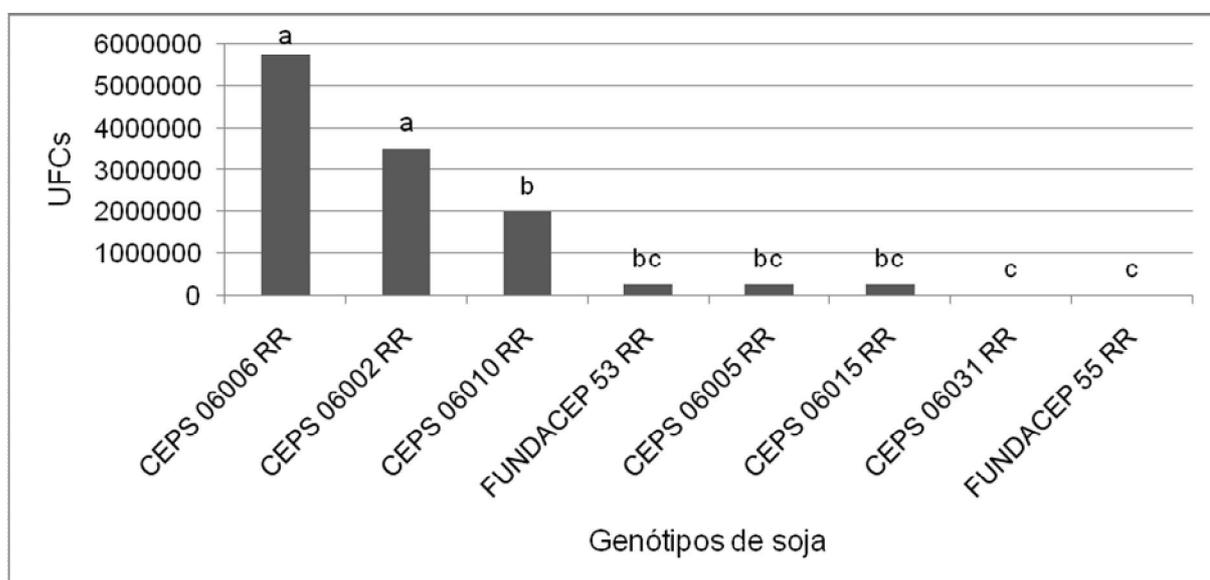


FIGURA 6 UFCs.g⁻¹ de solo de *Trichoderma* spp. em solo aderido às raízes de genótipos de soja, sem sintomas de PVR, em sistema plantio direto. Santa Maria, 2007.

O fato dos genótipos coletados serem oriundos de melhoramento genético pode atribuir-lhes quantidades diferentes de lignina e celulose em suas paredes celulares, bem como a produção de exsudatos diferenciados. Isso pode explicar a

maior incidência do gênero *Trichoderma* no solo aderido ao sistema radicular desses genótipos. Neste caso, os genótipos CEPS 06006 RR e CEPS 06002 RR, que obtiveram uma maior contagem de UFCs, podem ter menores teores de celulose em sua constituição celular e produzir determinados exsudatos que proporcionem um ambiente favorável ao antagonista.

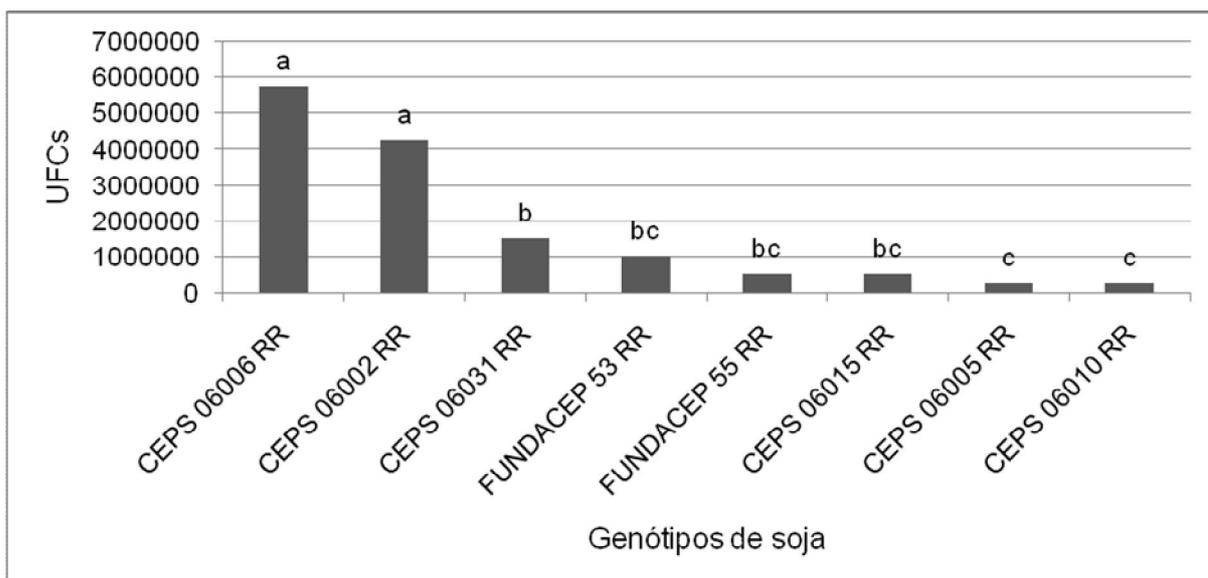


FIGURA 7 UFCs.g⁻¹ de solo de *Trichoderma* spp. em solo aderido às raízes de genótipos de soja, com sintomas de PVR, em sistema plantio direto. Santa Maria, 2007.

Dessa forma, interações antagonísticas que ocorrem na micorrizosfera melhoram o crescimento das plantas e a sanidade das mesmas e colaboram para a manutenção da qualidade do solo que são peças-chave para a sustentabilidade de ecossistemas naturais assim como de agroecossistemas (BAREA et al., 2002). Em ambiente natural, a proliferação de *Trichoderma* spp. no solo é fundamentalmente influenciada pelo grau de decomposição de matéria orgânica, uma vez que populações do antagonista não se alteram em resposta a compostos verdes (NELSON et al., 1988).

De acordo com Kowalski et al. (1984), em áreas onde houve aplicação de uréia e cloreto de potássio (KCl) foi observado um aumento nas populações do antagonista. Em contrapartida, Hubrard et al. (1983) verificaram que elevados teores de ferro (Fe) no solo prejudicam o estabelecimento e a eficiência do antagonismo de *Trichoderma* spp.

É possível que espécies do gênero *Trichoderma* spp. induzam a produção de enzimas quitinolíticas e endoglucanases em células do sistema radicular do hospedeiro. Isto foi comprovado por Dal Soglio et al. (1998) ao testar o efeito de tratamentos compostos por filtrados de cultura de *Trichoderma harzianum* isolado Th008, aplicados em sementes de soja, inoculadas com um isolado de *Rhizoctonia solani*. Os autores evidenciaram a presença de três enzimas quitinolíticas na rizosfera das plântulas de soja 15 dias após a emergência.

Diversos estudos indicam a habilidade que espécies de *Trichoderma* spp. têm em relação à permutação de sinais moleculares com a planta hospedeira. Além disso, o antagonista seria capaz de fabricar pelo menos três tipos de elicitores: produzidos a partir de enzimas ou peptídeos, proteínas *avr* e oligossacarídeos ou compostos de baixo peso molecular. O primeiro tipo de elicitador possivelmente inclui uma serina protease e uma xilanase responsáveis pela indução da biossíntese de fitoalexinas e peroxidase, defesas naturais da planta ao ataque de fitopatógenos (WOO et al., 2006).

Na área da FUNDACEP onde foram realizadas as coletas dos genótipos de soja, o esquema de rotação de culturas incluía soja/milho durante o verão e azevém ou trigo no período dos meses de inverno. Avaliando os efeitos da rotação de culturas sobre a população de actinomicetos, *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp., o impacto que sistemas de cultivo teriam sobre a incidência de doenças veiculadas pelo solo na cultura do amendoim e suas relações com populações daqueles antagonistas, Gil et al. (2008) observaram que essas variaram de acordo com o tipo de rotação empregada, soja, amendoim ou milho, sendo que o mais elevado número de UFCs foi encontrado na rotação que incluiu milho. Além disso, os autores evidenciaram que o sistema de cultivo adotado interferiu nas populações dos antagonistas mostrando que nas parcelas onde foi feita semeadura direta houve um favorecimento na incidência de actinomicetos, *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. comparado às parcelas onde se utilizou cultivo mínimo.

A atividade de biocontrole que fungos do gênero *Trichoderma* spp. possuem é devida à produção de enzimas líticas extracelulares que degradam a parede celular de outros fungos. Além disso, indivíduos desse gênero são importantes na ciclagem de nutrientes e, em alguns casos, vem sendo utilizados para a produção de celulase em escala comercial (CORABI-ADELL et al., 2002).

Cabe ressaltar que, assim como *Trichoderma* spp., espécies de *Fusarium* spp. também são dotadas de um poderoso arsenal bioquímico. Lozovaya et al. (2006) mostraram que *Fusarium solani* f. sp. *glycines* é hábil em produzir enzimas ligninolíticas como lacase e lignina peroxidase – mais importantes enzimas degradadoras de lignina que podem ser produzidas por fungos. De acordo com os pesquisadores, essas enzimas são produzidas durante a infecção das raízes o que potencializa o desenvolvimento da PVR em soja. A lignina pode fornecer uma barreira não-degradável para muitos microrganismos e seu conteúdo nas plantas é bastante importante sob o ponto de vista da pesquisa em resistência da soja à podridão vermelha da raiz. Ainda, de acordo com Kirkpatrick et al. (2006), a utilização de irrigação pode favorecer alguns patógenos de solo, tais como *Pythium* spp., *Phytophthora sojae* Kauffmann and Gerdemann, *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani* Kuhn., por causa da expansão da rizosfera da planta, na qual exsudatos atuam como quimioatrativos à estes.

1.3.2 Seleção “*in vitro*” de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Fusarium* spp. em soja

Através do teste U foi possível definir para quais isolados de *Fusarium* spp. houve diferença entre os isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de plantas doentes ou sadias (Tabela 2). Dessa forma, para os isolados de *Fusarium* spp. F010dA, F010dB, F005d e F006dA, os isolados de *Trichoderma* spp. diferiram significativamente dos isolados obtidos de plantas sadias, no teste de confronto direto. Maior frequência de notas próximas a um (melhor desempenho de isolados de *Trichoderma* spp.) foi observada entre isolados oriundos de plantas doentes. Os isolados T53d, T55d, T002dA, T002dB, T031d, T006s, T005s e T002sB obtiveram nota 1 – melhor performance do antagonista (Tabela 3). Os isolados que obtiveram as piores notas (Nota 4 – o patógeno crescendo sobre o antagonista) foram T031d, T002dB e T010d, quando confrontados com o isolado de *Fusarium* spp. F4A, e T010, contra o isolado de *Fusarium* spp. F010 (dados não mostrados).

TABELA 2 Médias das notas do teste de confrontação direta obtidas pelos isolados de *Trichoderma* spp., oriundos de solo adjacente à raízes de plantas de soja com e sem sintomas de PVR, em função de isolados de *Fusarium* spp. Santa Maria, RS. 2007.

<i>Fusarium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.		Nível de p^{**}
	Plantas doentes	Plantas saudas	
F001d	1,78	2,00	0,161602 ns
F002d	1,65	1,62	0,760889 ns
F010dA	2,06	1,08	0,000047 *
F010dB	1,50	2,75	0,000276 *
F031dA	2,93	3,12	0,677748 ns
F031dB	2,03	2,00	0,861108 ns
F031dC	2,15	2,00	0,599660 ns
F005d	2,34	1,75	0,044212 *
F006dA	1,62	2,00	0,035768 *
F006dB	1,75	1,87	0,369886 ns
F015d	1,53	1,83	0,119998 ns
F55RRd	1,94	1,50	0,104589 ns

(*) Efeito significativo e (ns) não significativo pelo Teste U de Mann-Whitney. (p^{**}) Probabilidade de erro.

Isolados provenientes de amostras de solo de plantas com sintoma de PVR mostraram-se mais eficazes no controle de *Fusarium* spp. do que isolados oriundos de amostras de solo de plantas sem sintomas da doença. Essa observação vem de encontro ao relatado por Menezes (2007) que, avaliando o potencial antagônico de 100 isolados de *Trichoderma* spp., obteve três isolados que se destacaram no teste de confrontação direta, sendo que o isolado UFSMT16, obtido de amostras de solo de parcelas com sintomas de murcha em crisântemo, foi um dos melhores.

Pelo exposto, a idéia de que há uma pressão de seleção na qual os melhores isolados do antagonista são aqueles que compõem a rizosfera de plantas afetadas pela doença é reforçada, pois controlaram três ou quatro isolados de *Fusarium* spp. (Tabela 3). Ao contrário, os isolados T006s, T005s e T002sB, oriundos de materiais do grupo sadio, foram eficazes no controle de apenas um isolado de *Fusarium* spp. cada (F010A e F005), pois o fato desses estarem habitando locais onde não houve proliferação da doença poderia torná-los menos competitivos contra agentes patogênicos.

TABELA 3 Isolados de *Trichoderma* spp. mais competitivos no Teste de Confrontação Direta (nota 1) frente a diversos isolados de *Fusarium* spp. obtidos com sintomas de PVR. Santa Maria, RS. 2007.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.*	Isolados de <i>Fusarium</i> spp.*
T53d	F010B, F006A e F015
T55d	F010B, F006A e F002
T002dA	F001A, F010B, F002 e F015
T002dB	F010B, F002, F015 e F001
T031d	F010B, F002, F015 e F001A
T006s	F010A
T005s	F005
T002sB	F010A

* isolados de *Trichoderma* spp. seguidos pela letra “d” indicam que foram obtidos de genótipos do grupo doente e seguidos pela letra “s” indicam que foram obtidos de genótipos do grupo sadio.

Os isolados de *Fusarium* spp. F010, F015, F002 e F001 foram os que tiveram um maior número de isolados de *Trichoderma* spp. capazes de controlá-los, indicando que esses isolados do patógeno poderiam ser mais suscetíveis aos antagonistas, resultado esse que reforça a idéia de que um agente de controle biológico deve ter um amplo espectro de ação sobre uma vasta gama de fitopatógenos. Assim, os isolados de *Trichoderma* spp. T53d, T55d, T002dA, T002dB e T031d, poderiam ser selecionados para um estudo de seus comportamentos no campo.

Selecionando isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em soja, Lohmann et al. (2007) observaram que os isolados do antagonista (I, II e III), oriundos de três amostras de solo coletados em diferentes áreas, apresentaram efeito controlador sobre o patógeno, provocando menor incidência de *damping off* em plântulas de soja. Além disso, a contagem de esporos dos isolados de *Trichoderma* spp. I e II mostrou maior quantidade de conídios quando comparada ao isolado III. Os autores associaram isso ao fato desses dois isolados terem sido os mais agressivos e capazes de dominar o ambiente, controlando o fitopatógeno.

É importante ressaltar que ainda há uma carência de respostas acerca das interações entre antagonistas, patógenos e o patossistema como um todo, pois a utilização do controle biológico de doenças, compondo um manejo integrado, atrai considerável interesse de produtores rurais, que já integram um nicho de mercado voltado a uma produção ecologicamente correta. Isso também tem chamado a atenção de multinacionais que vêem no controle biológico uma perspectiva para

mercados futuros em função da conscientização do consumidor por uma agricultura menos agressiva ao meio ambiente.

1.4 CONCLUSÕES

1. A população de *Fusarium* spp. não difere em quantidade entre genótipos de soja com sintomas de PVR;
2. *Trichoderma* spp. está associado ao solo adjacente às raízes de soja tanto em plantas sem sintomas de PVR quanto em plantas com sintomas da doença;
3. Maior eficiência do antagonista, em teste de confrontação direta, ocorre entre isolados oriundos de solo adjacente às raízes de soja com sintomas de PVR.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap.61, p. 642-664.

AOKI T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, v. 46, p. 162-183. 2005.

BAIRD, R. E. et al. Diversity and longevity of the soybean debris mycobiota in a no-tillage system. **Plant Disease**, v. 81, p. 530-534. 1997.

BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 343–351. 2002.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4th ed., Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382. 1982.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*: II infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 11, p. 2357-2372. 1991.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BACKHOUSE, D. et al. Biodiversity and population studies on *Fusarium*. In: LOGRIECO, A.; SEIFERT, K. A.; LESLIE, J. F. A. et al. Biodiversity of toxigenic *Fusarium* species. **Sydowia**, v. 30, p. 1-11. 1997.

CARTER, M. R. (Ed.) **Soil Sampling and Methods of Analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 631 p.

CAVALCANTI, L. S.; COELHO, R. S. B; PEREZ, J. O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação de resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, v. 32, p. 1-5, 2002.

COOK, R. J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control

of plant pathogen. **Annual Review Phytopathology**, v. 31, p. 53-80. 1993.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69 (supl.), p.158-191. 2002.

DAL SOGLIO, F. K. et al. Production of chitinolytic enzymes and endoglucanase in the soybean rhizosphere in the presence of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. **Biological Control**, v. 12, p. 111-117. 1998.

DAVIS, R. M. et al. Fusarium wilt of cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**, v. 90, p. 692-703. 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA SOJA. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acesso em: 17 mai. 2007.

ETHUR, L. Z. et al. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. **Ciência e Natura**, UFSM, v. 28, n. 2, p. 17-27. 2006.

ETHUR, L. Z. et al. Presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não-rizosférico cultivado com tomateiro e pepineiro, em horta e estufa. **Ciência Rural**. 2008.

FREITAS, T. M. Q.; MENEGHETTI, R. C.; BALARDIN R. S. Dano devido à podridão vermelha da raiz na cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.991-996. 2004.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus Fusarium** – a pictorial atlas. Berlin: Biologische Bundesanstalt für Land – und. Institut Forstwirtschaft, 496 p. 1982.

GESHEVA, V. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, p.85-88, 2002.

GIL, S. V. et al. Crop rotation and tillage systems as a proactive strategy in the control of peanut fungal soilborne diseases. **BioControl**, v. 53, p. 685–698. 2008.

HERSHMAN, D. E. et al. Influence of planting date and cultivar on soybean sudden death syndrome in Kentucky. **Plant Disease**, v. 74, p. 761-766. 1990.

HOWEL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10. 2003.

HUBRARD, J. P.; HARMAN, G. E.; HADAR, Y. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. **Phytopathology**, v. 73, n. 5, p. 655-659. 1983.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1259;id_pagina=1>. Acesso em: 24 de nov. 2008.

KIRKPATRICK, M. T.; RUPE, J. C.; ROTHROCK, C. S. Soybean response to flooded soil conditions and the association with soilborne plant pathogenic genera. **Plant Disease**, v. 90 p. 592-596. 2006.

KOWALSKI, S.; DAHM, H.; ROZYCKI, H. Effect of the mineral fertilizers on soil fungi and mycotrophism of Scots pine in Cladio-Pinetium Forest. **Acta Agricultural**, v. 23, n. 3. 1984.

LARKIN, R. P.; FRAVEL, D. R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of fusarium wilt of tomato. **Plant Disease**, v.82, p.1022-1028. 1998.

LOHMANN, T. R. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia** – Resumos do V Congresso Brasileiro de Agroecologia, v. 2, p. 1665-1668. 2007.

LOZOVAYA, V. V. et al. Lignin degradation by *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. **Plant Disease**, v. 90, p. 77-82. 2006.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295. 1996.

MENEZES, J. P. **Caracterização populacional e molecular, e seleção de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Fusarium* sp. em crisântemo.** 2007. 112 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification***. Philadelphia: Pennsylvania State University Press. 1983. 193 p.

NELSON, E. B.; HARMAN, G. E.; NASH, G. T. Enhancement of *Trichoderma* induced biological control of *Pythium* seed rot pre-emergence damping-off of peas. ***Soil Biology and Biochemistry***, v. 20, p. 145-150. 1988.

PEREIRA, J. C. **Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 15p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).

POLETTI, I. **Nutrição, níveis de sombreamento e antagonismo biológico no controle da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill)**. 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

RAAIJMAKERS, J. M. et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. ***Plant and Soil***. 2008.

SCHERM, H.; YANG, X. B.; LUNDEEN, P. Relationship of soil factors to severity of sudden death syndrome of soybean in Iowa. ***Phytopathology***, v. 86, p. 84. 1996.

SIEGEL, S.; CASTELLAN, N. J. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. 2ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2006. 448p.

SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. ***Phytopathology***, v.79, p.198-203. 1989.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte II - Chave para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. ed. Luz, W. C. v. 8, p. 303-338. 2000.

WOO, S. L. et al. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. ***Phytopathology***, v. 96, p. 181-185. 2006.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, TOXICIDADE E PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE *Fusarium* ISOLADAS DE RAÍZES DE GENÓTIPOS DE SOJA COM SINTOMAS DE PVR

RESUMO

Agentes causais de várias doenças, os fungos do gênero *Fusarium* spp. constituem uns dos mais importantes na Fitopatologia. Critérios morfológicos são o primeiro passo para identificação de espécies de *Fusarium* e métodos como os testes de toxicidade e patogenicidade permitem selecionar isolados patogênicos. O objetivo deste trabalho foi identificar isolados de *Fusarium* spp. obtidos de raízes de plantas de soja com sintomas de Podridão Vermelha da Raiz e testar sua toxicidade e patogenicidade a dois cultivares de soja (FUNDACEP 53 RR e FUNDACEP 59 RR). Procedeu-se a identificação dos isolados de *Fusarium* spp. através da observação de características culturais (cor e diâmetro de colônias, presença ou ausência de macroconídios, microconídios e clamidósporos). Utilizou-se a metodologia de filtrados de cultura de *Fusarium* spp. para identificar os isolados potencialmente toxigênicos à plântulas de soja *in vitro* e, em casa-de-vegetação, foi conduzido o teste de patogenicidade. Foram identificadas nove diferentes espécies do gênero *Fusarium* associadas a raízes doentes: *F. avenaceum* (Cordai ex Fr.) Sacc., *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. acuminatum* Ellis ; Everhart, *F. kyushuense* sp. nov., *F. graminum* Corda, *F. subglutinans* Wollenw. ; Reinking, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenb. e *F. lateritium* Nees. Após oito dias de exposição a filtrados de cultura de *Fusarium* spp., plântulas de soja cortadas na altura da coroa, manifestaram sintomas como clorose internerval, necrose e morte de plântulas. No teste de patogenicidade, em plantas inoculadas com o patógeno houve aumento na massa seca de parte aérea e de raízes e no número de vagens, indicando que pode haver especificidade das espécies de *Fusarium* estudadas em relação ao genótipo pelo fato das mesmas terem sido isoladas de genótipos de soja diferentes daqueles utilizados nesse experimento. Para diâmetro de colo e número de vagens verificou-se interação significativa entre a cultivar utilizada e o isolado de *Fusarium* spp. inoculado mostrando que as cultivares reagiram de forma diferenciada em relação à presença do patógeno.

Palavras-chave: Patógeno de solo, sistema plantio direto, morfologia, toxinas, patogênico.

2.1 INTRODUÇÃO

O fungo *Fusarium* possui ampla distribuição ao redor do mundo, podendo ser encontrado nos mais variados tipos de solo na forma saprofítica, sobre a matéria orgânica disponível, ou colonizando tecidos de plantas causando inúmeras doenças em diversas espécies vegetais. Geralmente, doenças provocadas por *Fusarium* spp. causam podridões de raízes, caules e frutos, além das murchas vasculares e, em alguns casos, podem provocar prejuízos, principalmente, quando as culturas por ele atingidas são de importância econômica.

Devido à sua característica cosmopolita, *Fusarium* spp. exibe uma alta variabilidade genética em nível de espécies, tornando necessária a aplicação de ferramentas que possibilitem a diferenciação entre isolados. Dentro desse gênero existem variações de características morfológicas, de patogenicidade e de virulência, o que resulta em uma classificação em seções, *formae specialis* e raças (OLIVEIRA; COSTA, 2002). O fungo é classificado no Reino *Eumycota*, Divisão *Ascomycota*, Classe *Euascomycetes*, Ordem *Hipocreales* e Família *Hypocreaceae* (De Hoog et al., 2000 *apud* Godoy; Colombo, 2004).

Caracterizadas por crescerem rapidamente, espécies do gênero *Fusarium* podem apresentar coloração que varia desde violeta à púrpura escuro ou de creme à laranja, com micélio aéreo ou difuso (DOMSCH et al., 1980). As duas formas de esporos de *Fusarium* são chamadas de macroconídios e microconídios. Os macroconídios são multicelulares, mas contém apenas um núcleo que é descendente mitótico de um núcleo progenitor sendo assim geneticamente idênticos. Já os microconídios são unicelulares e uninucleados (PUHALLA, 1981).

Algumas espécies de *Fusarium* podem produzir macroconídios hialinos, geralmente septados, caracterizados por possuírem as células apicais e basais distintas, que são de grande importância na taxonomia do gênero. Os microconídios também possuem diferentes formas e os clamidósporos, unidades de sobrevivência, infecção e disseminação, podem estar presentes ou ausentes. De acordo com Zhang et al. (2007), membros do complexo de espécies *F. solani*, que são morfológicamente similares, possuem mais do que 45 linhagens distintas.

Espécies de *Fusarium* esporulam em meio folha-de-cravo-ágar (FCA) (Anexo 2) entre seis a dez dias, apresentando conídios com formas uniformes e nítidas que não podem ser observados em meio de cultura BDA. Geralmente, os macroconídios

são formados em esporodóquios desenvolvidos sobre pedaços de folhas de cravo enquanto que os microconídios se formam nas hifas sobre o ágar. O modo de formação de macro e microconídios e a formação de clamidósporos constituem características importantes para diferenciação de espécies de *Fusarium* (VENTURA, 1999; NELSON et al., 1981; BOOTH, 1971).

Inúmeras são as doenças que podem ser provocadas por *Fusarium*, como a podridão de raízes da erva-mate, que pode ser causada por diferentes espécies do fungo (POLETTI et al., 2006). Em bananeira, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder ; Hansen é o agente causal do mal-do-Panamá que provoca grandes prejuízos para a cultura em regiões produtoras da fruta (CORDEIRO et al., 2005). No solo rizosférico de tomateiro e pepineiro as espécies *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. Snyder ; Hansen e *F. oxysporum* Schlecht. f. sp. *cucumerinum* J. H., respectivamente, estão associados à murchas vasculares (ETHUR, 2006). Além disso, na cultura do trigo, *Fusarium graminearum* Schwabe é o agente causal da giberela, doença que, na década de 90, provocou perdas estimadas em três bilhões de dólares na safra norte-americana (WINDELS, 2000).

Na cultura da soja, *Fusarium* spp. causa a Podridão Vermelha da Raiz ou Síndrome da Morte Súbita (RUPE, 1989). Primeiramente, existiam duas nomenclaturas adotadas para designar isolados de *F. solani* f. sp. *glycines*. Os isolados chamados “forma A” eram aqueles capazes de causar a PVR, enquanto os enquadrados na “forma B” não causavam a doença e nem outro tipo de podridão radicular (ROY, 1997). Até pouco tempo, os fitopatologistas acreditavam que *F. solani* f. sp. *glycines* fosse o único agente causal da PVR na soja. As colônias do fungo eram descritas como apresentando uma pigmentação azulada que poderia variar em uma escala de claro a escuro sendo que alguns isolados não produziam pigmentação azul (RUPE et al., 1996; ROY, 1997). Além disso, outros isolados de *F. solani* que não causavam PVR também produziam coloração azulada em meio de cultura tornando esse critério de identificação do agente causal um tanto duvidoso (NELSON; HANSEN, 1997).

Baseando-se em dados de seqüências de DNA, concluiu-se que *F. solani* f. sp. *glycines* tem uma história evolucionária bastante curta quando comparado a outros isolados de *F. solani* (Li et al., 2000). Mais tarde, através de estudos baseados em características morfológicas e marcadores moleculares, foram reveladas mais duas espécies de *Fusarium* ainda não descritas, atuando como

agentes causais de PVR: *F. tucumaniae* na América do Sul (Argentina) e *F. virguliforme* na América do Norte (EUA) (ARRUDA et al., 2005).

Um dos métodos mais tradicionais utilizados para a identificação de *Fusarium* spp. é o plaqueamento de raízes de plantas infectadas em meio Nash ; Snyder. Entretanto, esse método tem como limitações deficiências em relação à sensibilidade e especificidade, permitindo o estabelecimento de outros fitopatógenos com morfologia similar à de *F. solani* f. sp. *glycines*, também cultivado nesse meio semi-seletivo (CHO et al., 2001). A identificação baseada em aspectos morfológicos possui um limitado número de caracteres taxonômicos que variam entre diferentes espécies de *Fusarium*.

Embora isolados de *Fusarium* spp. que causam PVR tenham sido extensivamente usados em ensaios de casa-de-vegetação para identificar cultivares de soja resistentes, pouco é conhecido sobre a diversidade genotípica de isolados do fungo (ACHENBACH et al., 1996). Assim, diferentes métodos de inoculação têm sido relatados na literatura a fim de se testar a patogenicidade de isolados do complexo *F. solani* em soja e também para avaliações de resistência a tais patógenos. Por isso, o conhecimento da natureza de variação e distribuição do fungo são requisitos fundamentais para um eficiente manejo da doença, e o teste de patogenicidade permite apontar isolados de *Fusarium* spp. que possam causar a doença em soja.

Em estudo sobre a expressão de sintomas, perda de rendimento da soja e colonização radicular por *F. solani* f. sp. *glycines*, Luo et al. (2000) observaram que o rendimento da soja está diretamente atrelado à colonização radicular, fato que depende do ambiente de cultivo e do desenvolvimento do patógeno. Além disso, os autores apontam que a metodologia para avaliação de colonização radicular em casa-de-vegetação pode ser útil para estudos que envolvam resistência à PVR, pois a determinação de condições favoráveis à colonização radicular para distinguir cultivares resistentes também pode ser importante.

Avaliando a severidade da PVR em soja, em função de inoculação e irrigação, Neto et al. (2006) verificaram que sintomas típicos da PVR, tanto em raízes quanto em folhas, foram observados em parcelas experimentais conduzidas sob irrigação e com problemas de compactação do solo, em todos os anos em que o estudo foi repetido. Isso mostra a importância da irrigação durante os estádios reprodutivos e a expressão dos sintomas da doença. De acordo com os autores, a resposta à

irrigação em R4 sugere que a água é importante na translocação de toxinas das raízes para a parte aérea das plantas de soja.

A infecção de raízes de soja por fungos do gênero *Fusarium* spp. ocorre durante todo o ciclo da cultura e os sintomas foliares surgem durante os primeiros estádios reprodutivos da planta (R6). O sintoma reflexo típico da doença, folha carijó, pode ser causado por toxinas translocadas das raízes para as folhas (JIN et al., 1996). A manifestação do sintoma reflexo depende das condições ambientais existentes no solo, da data de plantio e da suscetibilidade da cultivar. Os sintomas da PVR também incluem podridão de raízes, necrose de coroa e descoloração vascular de raízes e hastes (JIN et al., 1996). A doença provoca redução no rendimento por indução de florescimento e abortamento de vagens, levando à diminuição do número de sementes (HARTMAN et al., 1995).

Uma forma de avaliar a reação de cultivares ao ataque de *Fusarium* spp. é a imersão de plântulas em filtrados de cultura do fungo (HUANG; HARTMAN, 1998). Sabe-se que isolados de *F. solani* f. sp. *glycines*, em meio de cultura, produzem um polipeptídeo fitotóxico, com peso molecular de 17 kDa, e uma fitotoxina de baixo peso molecular conhecida como monorden. Além dessa, isolados de *F. solani*, entre outras espécies do fungo, são capazes de produzir uma gama de toxinas tais como novarubina, norjavanicina, javanicina, fusarubina, marticina e isomarticina (BAKER: NEMEC, 1994).

Conforme relatado por Souza Filho e Duarte (2007), o efeito provocado pelas toxinas produzidas por *Fusarium* spp. podem ser resultado da ação isolada de uma delas ou pela interação de todas. Os autores verificaram o potencial alelopático que filtrados de cultura do patógeno apresentaram sob a germinação das sementes de malícia (*Mimosa pudica* L.) e mata-pasto (*Senna obtusifolia* (L.) Irwin ; Barneby), plantas invasoras de pastagens. Filtrados de cultura de *F. solani* f. sp. *glycines* foram relatados como tóxicos a calos, sementes em germinação, cotilédones e plantas de soja (JIN et al., 1996).

Existe uma grande variabilidade na manifestação dos sintomas de PVR em relação à resposta que calos e cotilédones de soja têm quando expostos a filtrados de cultura de isolados de *F. solani* f. sp. *glycines*. Essa variabilidade de respostas também foi observada entre cultivares de soja (LIM et al., 1990). Em outro relato, Baker e Nemeç (1994) observaram que a toxina, obtida a partir de um isolado de

Fusarium causador de PVR, foi capaz de inibir o crescimento de brotos e raízes, causando necrose em folhas e hastes de plantas de soja.

As toxinas produzidas por espécies do gênero *Fusarium* spp., durante a penetração do patógeno no hospedeiro, causam a manifestação dos sintomas da doença e, em alguns casos, podem levar a planta à morte. Os danos celulares que essas toxinas podem provocar no hospedeiro são os mais variados possíveis e incluem variações na quantidade de algumas enzimas antioxidantes, alterações no crescimento das células, na atividade mitocondrial e na permeabilidade da membrana, redução da condutância estomatal e no conteúdo de clorofila e aumento das trocas eletrolíticas o que causa modificações no potencial da membrana plasmática da planta (WU et al., 2008).

Dessa forma, pelo exposto acima e devido à importância que a soja assume no Brasil, o presente estudo objetivou identificar morfologicamente isolados de *Fusarium* spp. obtidos de raízes de plantas com sintomas de PVR e testar a toxicidade e a patogenicidade de cada um desses isolados em duas cultivares de soja através de teste *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção dos isolados de *Fusarium* spp.

A partir de amostras de raízes dos genótipos de soja, coletadas em uma área experimental da Fundação Centro de Experimentação e Pesquisa (FUNDACEP), CEPS 06002 RR, CEPS 06010 RR, CEPS 06031 RR, CEPS 06001 RR, CEPS 06005 RR, CEPS 06006 RR, CEPS 06015 RR e FUNDACEP 55 RR, que apresentavam sintomas da PVR, procedeu-se o isolamento dos fungos do gênero *Fusarium* spp. Não foi possível realizar isolamento a partir de raízes da cultivar FUNDACEP 53 RR, uma vez que não foi observada presença de *Fusarium* spp. associado às raízes da mesma. Para o crescimento e desenvolvimento do patógeno, as raízes foram previamente desinfetadas passando por lavagem em água corrente seguida por embebição em hipoclorito de sódio a 0,1% por 1 min, álcool 70% por 1 min e água destilada por 1 min. Para retirada do excesso de umidade, as raízes

foram colocadas sobre papel absorvente e, em seguida, em caixas Gerbox previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2% e álcool absoluto (96°GL), contendo papel filtro esterilizado umedecido com água destilada e esterilizada. A incubação do material foi feita a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. Após 48h, foi realizada a observação das estruturas fúngicas, com o auxílio de microscópio estereoscópico, e a remoção de estruturas de *Fusarium*. Para isso, com o auxílio de uma agulha, porções de micélio desenvolvido foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Os isolados obtidos foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, acrescido de óleo mineral esterilizado, para evitar contaminações, até o momento da realização do isolamento monospórico.

As colônias mantidas em BDA + óleo mineral foram purificadas conforme a técnica de cultura monospórica descrita por Fernandes (1993). Alíquotas de micélio de *Fusarium* spp. foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após 10 dias, pequenas porções do micélio dos fungos foram colocadas em 5 mL de água destilada e esterilizada, agitadas e plaqueadas para placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA) (Anexo 3). As placas foram deixadas inclinadas para que houvesse o escoamento do excesso de água. Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente (22°C), foi realizada a observação dos esporos germinados em meio AA, através de microscópio ótico. De acordo com a metodologia descrita por Ventura (2000), esporos que germinaram isoladamente foram repicados para três placas de Petri contendo meio de cultura BDA, com o auxílio de uma alça metálica previamente flambada. As placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas e, após 72 horas, foram realizadas medidas diametralmente opostas do crescimento micelial das colônias desenvolvidas, um dos critérios utilizados para definir a espécie na chave de classificação de Ventura (2000). Na etapa seguinte, 144 horas após a avaliação dos diâmetros, porções do meio de cultura contendo micélio de *Fusarium* spp. foram repicadas para meio de cultura Folha de Cravo-Ágar (FCA).

Segundo Ventura (1999), espécies de *Fusarium* esporulam em meio FCA em um período entre seis a dez dias, apresentando conídios com formas uniformes e nítidas enquanto o mesmo não ocorre em meio BDA. Formados em esporodóquios, os macroconídios, que podem se desenvolver sobre pedaços de folha de cravo são uma característica importante na identificação de espécies. Também ocorre a

formação de microconídios nas hifas que estão sobre o ágar. O modo de formação dos microconídios, presença de cadeias e formação de clamidósporos podem ser observados diretamente em meio FCA através de microscópio ótico.

Após 10 dias, as placas de Petri contendo meio de cultura FCA e micélio de *Fusarium* spp. já desenvolvido, foram examinadas em microscópio ótico. A identificação das espécies do fungo foi realizada de acordo com a chave de classificação de Ventura (2000) e descrições feitas por Gerlach e Nirenberg (1982) e Nelson et al. (1983).

2.2.2 Efeitos de filtrados de cultura de *Fusarium* spp. sobre plântulas de soja

Os isolados de *Fusarium* spp. identificados morfologicamente no estudo anterior, foram cultivados em frascos, com capacidade para 80 mL, contendo meio de cultura YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose) (Anexo 4) durante 14 dias a 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 12h. O meio YPD é indicado para estimular a produção de metabólitos fúngicos, sendo utilizado para o acúmulo das micotoxinas produzidas por diversos gêneros, inclusive *Fusarium*. Após esse período, a cultura foi pré-filtrada em papel filtro esterilizado em forno à 180°C e, em seguida, filtrada através de bomba de sucção à vácuo utilizando membrana Milipore™ de 0,22 µm. O filtrado resultante foi diluído a 5% em uma solução de KH₂PO₄ 1mM e o pH da mesma foi ajustado para 6,0. Uma solução de KH₂PO₄ 1mM pH 6,0 foi utilizada como controle negativo. Plântulas de soja, das cultivares FUNDACEP 53 RR e FUNDACEP 59 RR, com três semanas de idade, foram destacadas da coroa e transferidas para frascos contendo 60 mL da solução. Os frascos foram incubados à 25°C e fotoperíodo de 12h. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com duas repetições por tratamento. Após oito dias, a severidade da doença foi avaliada e classificada de acordo com a escala de Huang e Hartman (1998). Para comparar a severidade de doença foliar, a escala foi convertida para porcentagem utilizando valores médios (HUANG; HARTMAN, 1998) (Tabela 4 e Figura 8).

TABELA 4 Escala da severidade de doença foliar com suas respectivas correspondências em porcentagem, para plântulas de soja expostas a filtrados de cultura de *Fusarium* spp.

Nota	Sintoma	% Correspondente
1	Ausência de sintomas	0%
2	Sintomas leves com mosqueado e mosaico (1 a 20% da folhagem afetada)	10%
3	Sintomas moderados com clorose e necrose internerval (21 a 50% da folhagem afetada)	35%
4	Sintomas intensos com clorose e necrose internerval (51 a 80% da folhagem afetada)	65%
5	Sintomas severos com clorose e necrose internerval e/ou plantas mortas (81 a 100% da folhagem afetada)	90%

Fonte: Huang; Hartman (1998).

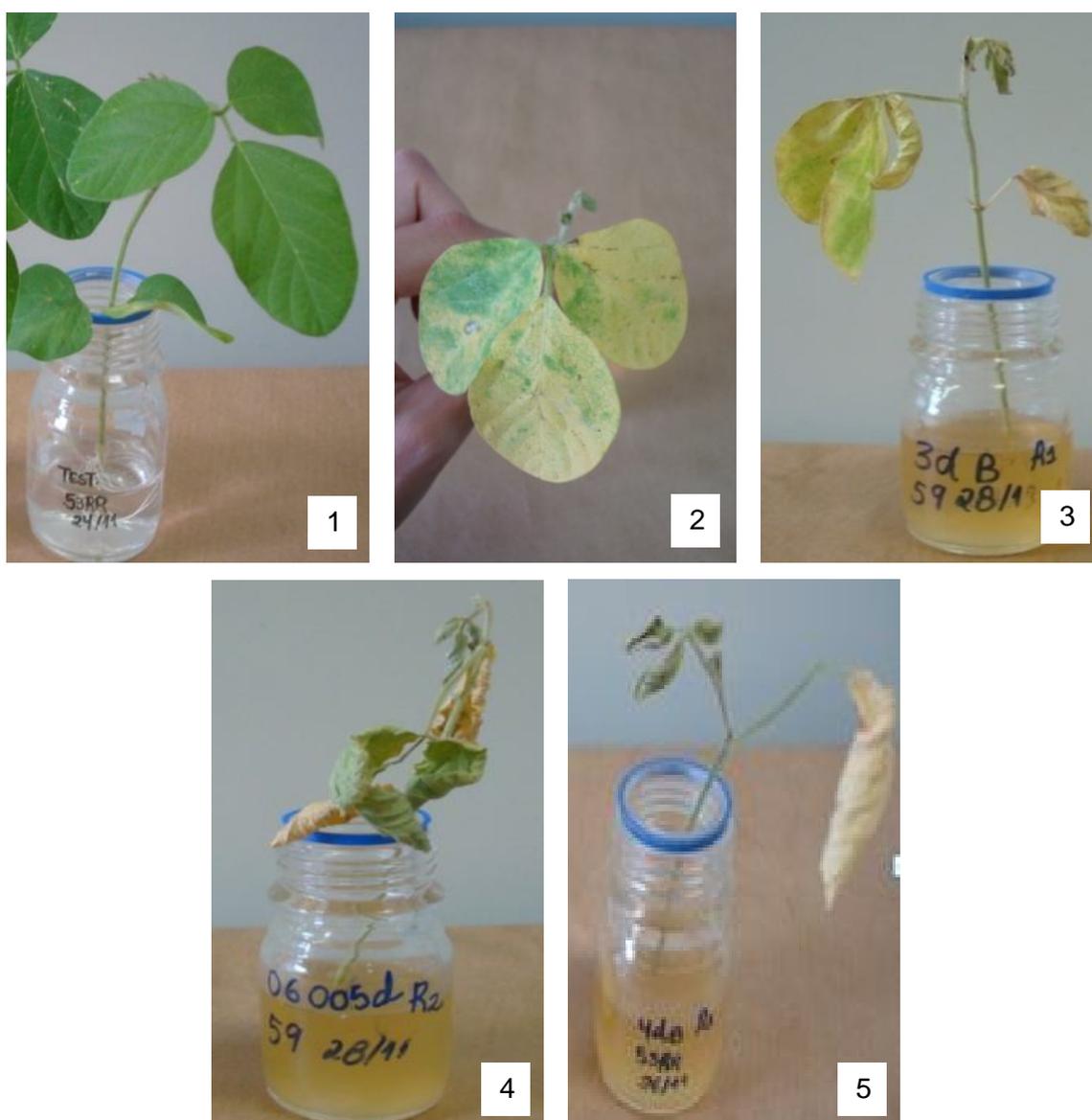


FIGURA 8 Sintomas de toxidez de filtrados de cultura de *Fusarium* spp. e escala de notas para severidade de doença foliar. 1: Testemunha; 2: nota 2; 3: nota 3; 4: nota 4 e 5: nota 5. Santa Maria, RS. 2008.

Em virtude do aparecimento de raízes nas plântulas expostas à solução, uma escala de notas foi criada para classificar o tipo de raiz que foi originada (Tabela 5 e Figura 9).

TABELA 5 Classificações de plântulas de soja quanto à emissão de raízes quando expostas à filtrados de cultura de *Fusarium* spp.

NOTA	Aspecto do sistema radicular
0	Sem emissão de raízes
1	Emissão de raízes anormais
2	Emissão de raízes adventícias
3	Emissão de raízes normais

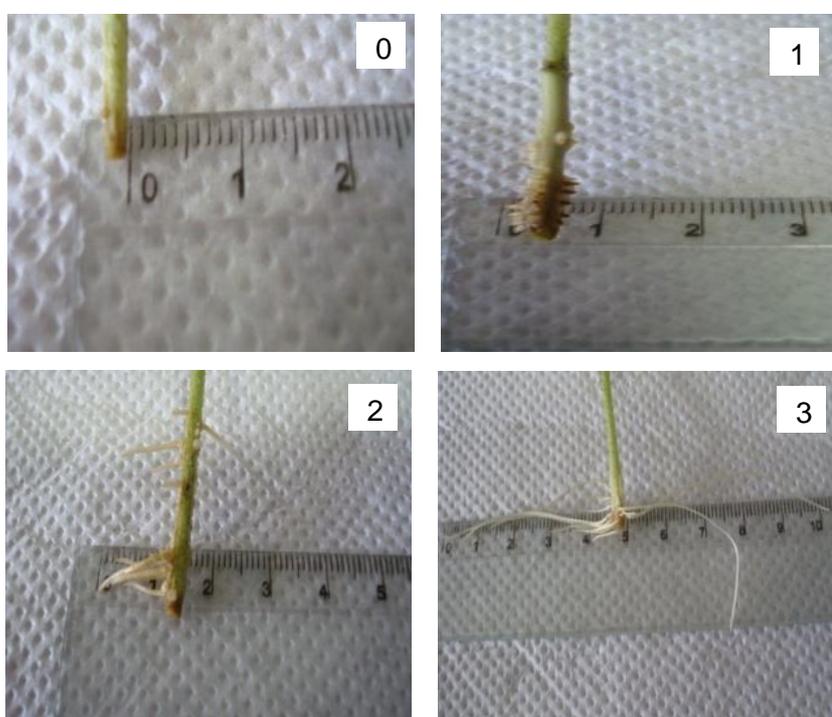


FIGURA 9 Escala de notas aplicadas ao aspecto do sistema radicular de plântulas de soja expostas aos filtrados de cultura de isolados de *Fusarium* spp. **0**: nota 0; **1**: nota 1; **2**: nota 2 e **3**: nota 3. Santa Maria, 2008.

Nesse experimento também foi avaliado o comprimento de raízes em plântulas imersas em filtrados de cultura de *Fusarium* spp. Essa variável foi medida com uma régua com precisão de 0,01 cm.

2.2.3 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado em vasos plásticos, utilizando-se duas sementes/vaso das cultivares FUNDACEP 53 RR e FUNDACEP 59 RR. Essas cultivares foram escolhidas em virtude de serem bastante utilizadas pelos produtores das regiões Central, Norte e Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. O substrato utilizado foi do tipo PLANTMAX HA[®]. Os vasos foram colocados em casa-de-vegetação sob fotoperíodo natural a $\pm 30^{\circ}\text{C}$ por 3 meses. A irrigação foi realizada manualmente, todos os dias, com água proveniente de poço artesiano.

Nesse experimento, cada tratamento foi constituído por quatro repetições (vasos) com duas plantas cada. Os 13 tratamentos (isolados de *Fusarium* spp. previamente identificados e o tratamento testemunha não inoculado) foram arrançados em um delineamento inteiramente casualizado.

O inóculo utilizado foi composto por colônias axênicas dos isolados de *Fusarium* spp. anteriormente identificados, cultivadas em meio BDA. Discos, com 12 mm de diâmetro, contendo micélio desses isolados foram repicados para frascos contendo arroz previamente umedecido e autoclavado duas vezes por 60 min a 121°C e 1 atm. Após a repicagem dos fungos, os frascos foram colocados em câmara de incubação à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas por 20 dias.

Passado o período de incubação, o conteúdo dos frascos foi colocado em recipiente com água destilada e esterilizada e agitado por 10 min. A suspensão resultante foi filtrada e se contabilizou o número de esporos de *Fusarium* spp. com o auxílio de um hemacitômetro e microscópio ótico. As suspensões resultantes tiveram sua concentração ajustada para 10^6 esporos. mL^{-1} (POLLETTO, 2007). Na segunda quinzena de outubro de 2008, foram inoculados 20 mL da suspensão de esporos por vaso sendo este volume incorporado logo abaixo da superfície do solo, enquanto o tratamento Testemunha recebeu apenas água. Após a inoculação, o solo foi umedecido com água.

Ao final do experimento, três meses após a data de inoculação, foram contabilizados o número de folhas, número de vagens, diâmetro de colo - medido através de um paquímetro digital (com precisão de 0,01 cm), severidade de sintomas foliares e radiculares, presença de *Fusarium* spp. em fragmentos de raízes de plantas através da confecção de câmaras úmidas em caixas Gerbox, fitomassa seca

de parte aérea (FMS PA) e fitomassa seca de raiz (FMS R). As raízes foram previamente desinfetadas por lavagem em água corrente seguida por embebição em hipoclorito de sódio a 0,1% por 1 min, álcool 70% por 1 min e água destilada e esterilizada por 1 min. Para retirada do excesso de umidade, as raízes foram colocadas sobre papel absorvente e, em seguida, foram colocadas em câmara úmida, utilizando-se caixas Gerbox, para o crescimento e desenvolvimento do patógeno. As caixas Gerbox haviam sido previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2% e álcool (92°GL), contendo papel filtro esterilizado umedecido com água destilada e esterilizada em autoclave. A incubação das caixas Gerbox foi feita a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h e, após 48h, foi feita a observação de estruturas de *Fusarium* spp. nas mesmas. Para determinação de FMS, a parte aérea e o sistema radicular foram separados, colocados em sacos de papel e colocados para secar em estufa a 60°C até atingir peso constante e pesados em balança analítica (precisão 0,01g).

A severidade dos sintomas foliares foi avaliada utilizando-se a mesma escala do estudo de toxicidade, proposta por Huang e Hartman (1998). Avaliou-se, também a severidade da podridão de raízes e colo. Para isso, as raízes foram lavadas em água corrente para remoção do substrato e a severidade da PVR foi avaliada utilizando-se a escala proposta por Achenbach et al. (1996) (Tabela 6). Após a avaliação de severidade, as raízes foram embaladas em sacos de papel, secas em estufa à 50°C por 24h e pesadas para determinação da fitomassa seca de raiz.

TABELA 6 Escala de avaliação da severidade dos sintomas de PVR no sistema radicular da soja.

Notas*	Graus de severidade
1	Ausência de sintomas
2	25% de raízes com necrose; coroa sem necrose
3	25% a 50% de raízes com necrose; coroa sem necrose
4	>50% de necrose em raízes e coroa
5	Raízes e coroa necróticas; plantas mortas

*Em caso de variação da nota, para mais ou para menos, optou-se pela nota maior. Fonte: Achenbach et al. (1996).

2.2.4 Procedimento estatístico

Em relação aos dados obtidos no experimento de toxicidade de filtrados de cultura de *Fusarium* spp., para as variáveis severidade foliar, emissão de raízes e comprimento de raízes foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e, quando os valores foram significativos utilizaram-se as Comparações Múltiplas de Kruskal-Wallis (SIEGEL; CASTELLAN, 2006).

Os dados referentes ao número de folhas de folhas, número de vagens, diâmetro de colo, fitomassa seca de parte aérea (FMS PA) e fitomassa seca de raiz (FMS R) foram submetidos à análise da variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Essas análises foram realizadas através do software estatístico SANEST (ZONTA et al., 1984). Para a severidade de parte aérea e raiz foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e, quando os valores foram significativos utilizaram-se as Comparações Múltiplas de Kruskal-Wallis (SIEGEL; CASTELLAN, 2006). Essa análise foi realizada através do programa STATISTICA 6.0.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Espécies de *Fusarium* e sua caracterização morfológica

Nove espécies do gênero *Fusarium* foram identificadas dos oito genótipos de soja estudados, havendo diferença entre espécies identificadas em diferentes genótipos de soja dos quais o isolado fúngico foi obtido (Tabela 7).

As espécies *Fusarium solani*, associada aos genótipos CEPS 06002 RR, CEPS 06010 RR e CEPS 06006 RR, e *Fusarium kyushuense*, encontrada em raízes dos genótipos CEPS 06010 RR e FUNDACEP 55 RR, foram as mais frequentes. O genótipo CEPS 06031 RR apresentou incidência de três diferentes espécies do fungo: *F. avenaceum*, *F. graminum* e *F. verticillioides* e no genótipo CEPS 06006 RR além da incidência de *F. solani*, também foi observada a ocorrência de *F. equiseti*. Algumas espécies que foram identificadas nesse trabalho são mostradas na figura 10.

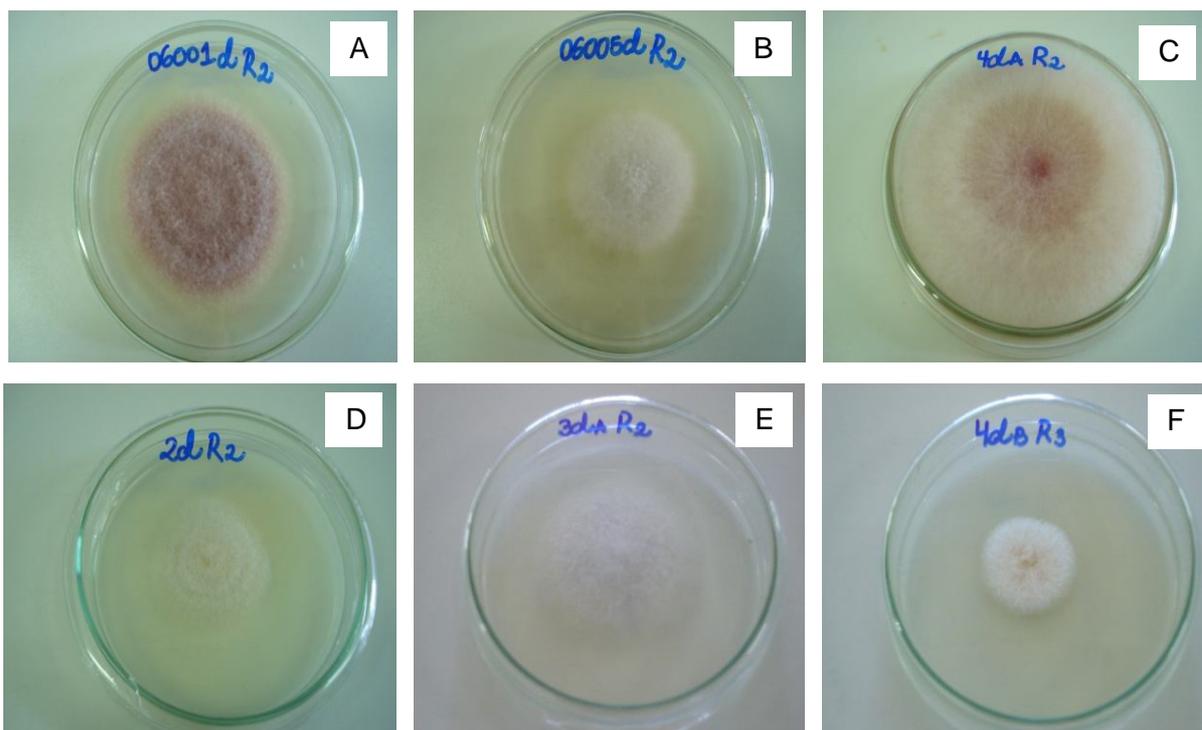


FIGURA 10 Colônias de espécies de *Fusarium* identificadas utilizando-se critérios morfológicos. **A:** *F. acuminatum*; **B:** *F. subglutinans*; **C:** *F. graminum*; **D:** *F. solani*; **E:** *F. kyushuense* e **F:** *F. verticillioides*. Santa Maria, 2008.

Características como formato de macro e microconídios, presença ou ausência de clamidósporos, conidióforos ramificados ou não e presença de mono ou polifiálides, foram levados em consideração para a identificação de espécies de *Fusarium*. Algumas dessas características são apresentadas na figura 11.

Colônias de *Fusarium solani* observadas em meio BDA apresentaram diâmetro de crescimento micelial de 2,3 cm, 72 horas após a incubação, e sua coloração variou desde creme claro até verde azulada. Seu crescimento nesse meio de cultura é bastante rápido e, geralmente, apresenta um micélio aéreo abundante. Em meio FCA, observou-se a formação de microconídios, de maneira isolada (forma oval a reniforme com uma ou duas células), em monofiálides longas ou em falsas cabeças. A presença de macroconídios foi abundante, com células apicais em formato de agulha ou arredondadas e as células basais arredondadas ou pediceladas. Os clamidósporos, abundantes nessa espécie, encontravam-se arranjados de maneira simples ou aos pares. De acordo com Nelson et al. (1983), os conidióforos podem ser ramificados ou não e as monofiálides, responsáveis por suportar os microconídios, são bastante longas. *Fusarium solani* é cosmopolita e tem sido relatado como toxigênico.

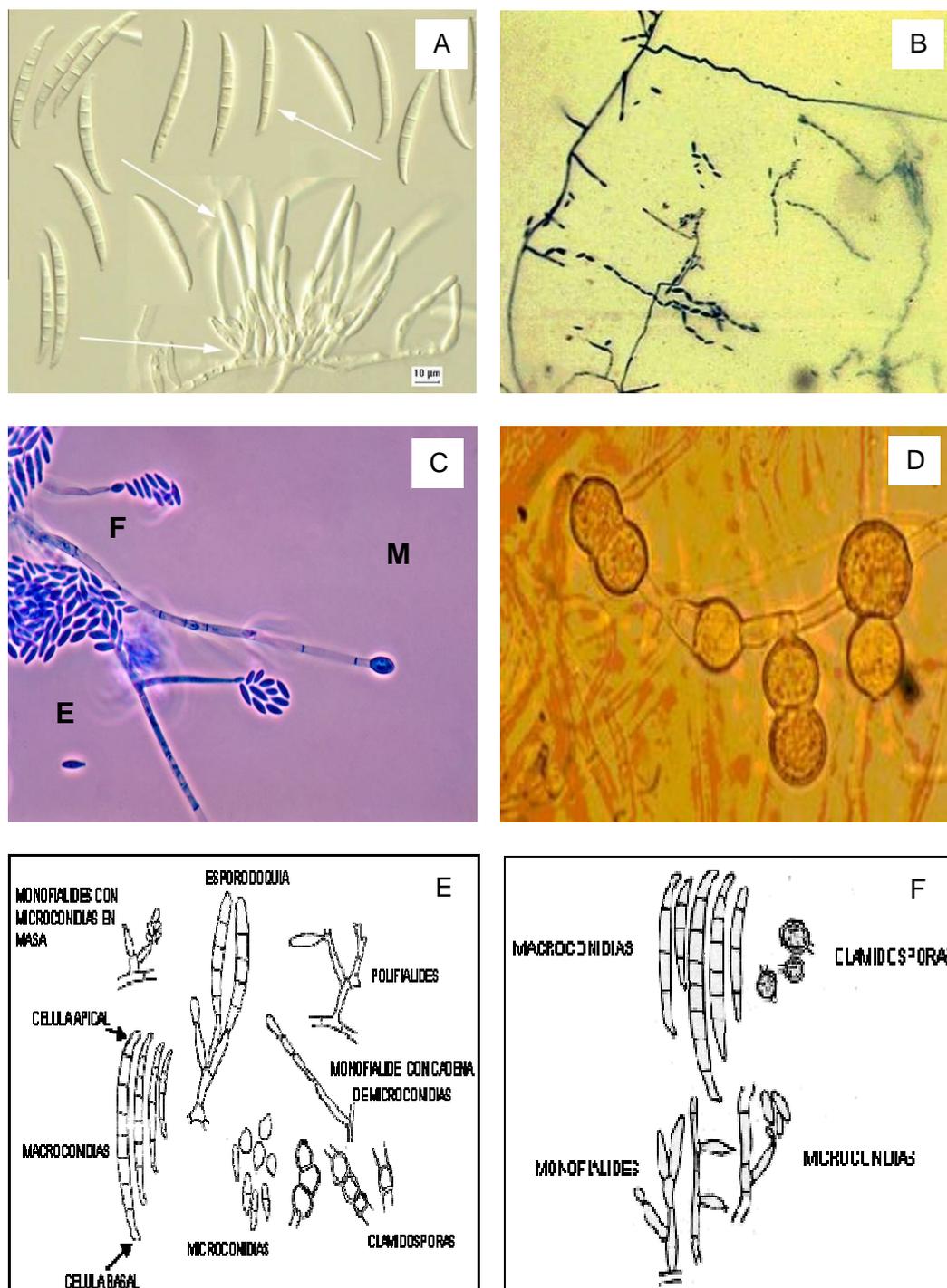


FIGURA 11 Estruturas encontradas em espécies de *Fusarium* utilizadas como critérios morfológicos para identificação. **A:** M- macroconídios; F-fiálides e E-esporodóquio; **B:** microconídios em cadeia; **C:** microconídios em falsas cabeças; **D:** clamidósporas; **E** e **F:** desenhos esquemáticos ilustrando as estruturas conjuntamente. Fonte: Google Images.

Fusarium avenaceum e suas *formae speciales* podem estar associadas a doenças em leguminosas de importância econômica e está entre as espécies de *Fusarium* que, de acordo com Summerell et al. (2003), podem ser classificadas apenas por caracteres morfológicos. Os microconídios são raros nessa espécie e os

macroconídios são bastante longos e delgados com a célula apical curvada. As células basais são pediceladas ou chanfradas e os conidióforos podem ser ramificados ou não em monofiálides. Em alguns casos há ausência de clamidósporos. Com uma distribuição geográfica cosmopolita, *F. avenaceum* também tem sido relatado como produtor de toxinas (NELSON et al., 1983). Conforme observado durante a identificação desse isolado, os macroconídios produzidos em FCA eram longos, delgados e, geralmente, possuíam 3 septos. Em meio de cultura BDA, a colônia cresceu rapidamente e apresentou 2,9 cm de diâmetro de crescimento micelial, às 72 h de incubação, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. O micélio do fungo apresentava um aspecto denso e esbranquiçado variando sua coloração desde um tom bronzeado até castanho-avermelhado. A superfície inferior da cultura possuía uma coloração em tom bronzeado até vermelho carmim ou marrom escuro.

Entre as espécies de *Fusarium* já catalogadas, *Fusarium equiseti* é um notável colonizador saprofítico que pode ser, regularmente, invasor secundário de tecidos doentes (SUMMEREILL et al., 2003). Conforme relatado por Nelson et al. (1983), os microconídios podem estar presentes no micélio aéreo e possuem forma oval ou de vírgula. Os macroconídios são fortemente septados, espessos e em formato de foice com uma distinta curvatura, o lado ventral é suavemente arqueado e o dorsal possui uma curvatura abrupta. As células apicais são mais ou menos alongadas e acentuam a curvatura do esporo e as células basais são distintamente pediceladas. Os conidióforos apresentam-se em monofiálides ramificadas ou não e há abundância de clamidósporos com paredes rugosas produzidos em grupos ou cadeias. Para identificação do isolado, em BDA, a medida do diâmetro do crescimento micelial da cultura foi 2,8 cm. O micélio, denso e aéreo, apresentou coloração esbranquiçada que evoluiu para um tom bronzeado a marrom conforme a cultura envelhecia. Também foi observada a presença de esporodóquios alaranjados. A superfície inferior teve pigmentação bronzeada a marrom, podendo chegar a vermelho carmim. Broders et al. (2007) constataram elevada patogenicidade de *F. equiseti* em sementes de milho e soja. A espécie possui semelhança com *F. semitectum* e também é relatada como toxigênica.

Fusarium acuminatum pode ser encontrado associado a raízes e hastes de plantas sob a forma saprofítica e a espécie possui sinonímia com *F. scirpi*, *F. equiseti* e *F. roseum* (SUMMEREILL et al., 2003). Isolados de *F. acuminatum*,

associados a sementes, provocaram lesões em raízes de plântulas de soja (BRODERS et al., 2007). Conforme Nelson et al. (1983), os microconídios geralmente são esparsos e os macroconídios são delgados e fortemente curvados, assumindo um formato de foice. A célula apical é alongada assim como em *F. equiseti*, enfatizando a curvatura do esporo e a célula basal é distintamente pedicelada. Os conidióforos apresentam-se em monofiálides que podem ser ramificadas ou não e os clamidósporos são formados de maneira isolada ou em cadeias. Em meio BDA, observou-se que as colônias de *F. acuminatum* cresceram rapidamente (2,67 cm de diâmetro, em 72 h de incubação a 25°C), formando um denso micélio aéreo e, conforme o envelhecimento da cultura, pôde-se observar a formação de esporodóquios cor-de-laranja. A superfície inferior da cultura apresentou coloração vermelho carmim que variou desde um tom bronzeado até o marrom.

Analisando quatro importantes isolados produtores de tricotecenos obtidos de plantas de trigo doentes, Aoki e O'Donnell (1998) descreveram uma nova espécie de *Fusarium*. Através de estudos moleculares sistemáticos, foi evidenciado que os quatro isolados representavam espécies filogeneticamente distintas que foram, então, descritas como *Fusarium kyushuense* devido ao fato de terem sido encontradas na ilha de Kyushu, Japão. Os conídios, septados ou não, são produzidos em conidióforos aéreos densamente ramificados, evidenciando células conidiógenas. Os esporodóquios estão arranjados em monofiálides com microconídios esparsos e macroconídios assumindo um formato elipsóide a clavato com ausência de clamidósporos. O isolado do fungo identificado por esse estudo apresentou um aspecto flocoso com pigmentação avermelhada em meio BDA, cuja medida de crescimento micelial foi de 2,41 cm, às 72 h de incubação. A superfície inferior em meio de cultura apresentou coloração vermelho vivo, que variou do vinho até um tom em degradê de branco a avermelhado.

Em meio BDA, *Fusarium gramineum* mediu 2,61 cm de diâmetro de crescimento micelial. O micélio era denso e aéreo com pigmentação que variou desde branco até pink. Esporodóquios cor-de-laranja se desenvolveram conforme a cultura envelhecia, com ausência de microconídios e clamidósporos. De acordo com observações feitas por Nelson et al. (1983), os macroconídios possuem formato de foice e são muito delicados e delgados. A célula basal tem um formato pedicelado e

o conídio pode ter entre 3 a 5 septos. Os conidióforos podem ser ramificados ou não em monofiálides.

Fusarium subglutinans está associado a plantas de milho causando podridão do colmo (SUMMERELL et al., 2003). Nessa espécie, os microconídios são abundantes e ovais (1-3 septos) e produzidos somente em falsas cabeças. Macroconídios possuem formato de foice com uma curvatura pouco acentuada. As superfícies basal e apical dos conídios são quase paralelas e a célula basal possui um formato pedicelado. Os conidióforos podem ser ramificados ou não com monofiálides ou polifiálides. *F. subglutinans* não forma clamidósporos e em BDA a colônia é parecida com *Fusarium oxysporum*. Esporodóquios podem estar ou não presentes e, quando presentes, apresentam uma discreta coloração alaranjada (NELSON et al., 1983). No isolado estudado, esse micélio aéreo cresceu rapidamente, atingindo 1,83 cm de diâmetro em 72 h de incubação a 25°C e apresentou coloração púrpura.

Fusarium verticillioides (= *F. moniliforme*) é o agente causal da podridão de colmo e espigas na cultura do milho e também é relatada como produtora de fumonisina (SUMMERELL et al., 2003). A incidência da doença é mais acentuada quando a semeadura ocorre sob condições de estresse como alta umidade e baixa temperatura, muito comuns na região Sul do país nos primeiros plantios de agosto a setembro (LUCCA FILHO, 1987; CASA et al., 1995; PEREIRA, 1997). A espécie apresenta abundância de microconídios que possuem um formato oval a clavado, com base plana, formados em longas cadeias e em falsas cabeças. Macroconídios estão presentes mesmo que algumas vezes sejam raros e sua aparência varia desde um leve formato de foice até quase totalmente reto com as superfícies dorsal e ventral quase paralelas. A célula basal do macroconídio possui formato pedicelado e os conidióforos podem ser ramificados ou não, com monofiálides, e não há presença de clamidósporos (NELSON et al., 1983). Em BDA, a cultura mediu 1,26 cm de diâmetro de crescimento micelial e apresentou um micélio aéreo que cresceu rapidamente. Os esporodóquios possuíam um discreto tom laranja o que fez com que a cultura assumisse essa coloração.

Fusarium lateritium possui microconídios esparsos ou ausentes em muitos isolados, mas abundantes em alguns. Eles possuem um formato elipsóide ou clavato com até três septos. Macroconídios são abundantes e geralmente cilíndricos, com a superfície ventral e dorsal paralelas, mas em alguns casos os macroconídios podem

ser curvados. A célula apical possui um formato de bico ou gancho, é pedicelada e os conidióforos podem ser ou não ramificados, em monofiálides. Os clamidósporos são formados isoladamente ou em cadeias, podendo ser raros em alguns isolados (NELSON et al., 1983). Em BDA, a colônia mediu 2,00 cm de crescimento micelial, após 72 h de incubação, com esparso micélio aéreo. Os esporodóquios eram abundantes e possuíam coloração laranja. As culturas tinham coloração vermelho carmim em ambas as superfícies, variando desde branco até pink na superfície superior e laranja claro a bronzeado na superfície inferior.

A presença de diferentes espécies, coexistindo com raízes de plantas de soja com sintomas de PVR, pode ser explicada pelo fato da área onde as coletas foram realizadas possuir um esquema de rotação de culturas que incluía soja durante o verão e azevém ou trigo no período dos meses de inverno. Assim, é possível que patógenos tipicamente causadores de doenças nessas culturas, como *F. kyushuense* que provoca podridão na cultura do trigo, possam estar associados ao sistema radicular da soja colaborando para a incidência da PVR.

Esses patógenos podem não necessariamente causar sintomas típicos da PVR, mas podem atuar definhando a planta aos poucos e favorecendo a colonização de *F. solani*.

2.3.2 Toxicidade de filtrados de cultura de isolados de *Fusarium* spp. à plântulas de soja

A tabela 8 traz os valores obtidos no teste de Kruskal-Wallis para as variáveis severidade de doença foliar, emissão de raízes e comprimento de raízes na cultivar FUNDACEP 53 RR. Não houve efeito significativo para nenhuma das variáveis analisadas.

TABELA 8 Valores do teste de Kruskal-Wallis para severidade foliar, emissão de raízes e comprimento de raízes em plântulas da cultivar FUNDACEP 53 RR quando expostas a filtrados de cultura de isolados de *Fusarium* spp. Santa Maria, RS. 2008.

Variáveis	Valor do teste	Valor p
Severidade de doença foliar	17,80	0,1216
Emissão de raízes	20,78	0,053
Comprimento de raízes	20,69	0,551

(p) probabilidade de erro ($p < 0,05$).

Mesmo assim, é importante ressaltar que houve diferenças entre as espécies de *Fusarium* comparadas entre si perante a emissão de raízes pelas plântulas de soja imersas na solução de filtrados de cultura das diferentes espécies do patógeno. Isso pode ser devido à determinados metabólitos produzidos pelo fungo que, conjunta ou isoladamente, favorecem ou prejudicam o estabelecimento de raízes e também, em função da possibilidade da cultivar FUNDACEP 53 RR ser menos suscetível as micotoxinas presentes nos filtrados de cultura.

O gênero *Fusarium* é o mais importante gênero toxicogênico conhecido entre os fungos filamentosos que, além de produzirem toxinas como tricotecenos e fumonisinas, também são capazes de produzir metabólitos secundários tais como a giberelina que é um dos hormônios de crescimento de plantas (O'DONNELL, 1997).

Comportamento diferente foi observado para as mesmas variáveis em plântulas da cultivar FUNDACEP 59 RR imersas em filtrados de cultura dos mesmos isolados de *Fusarium* spp. (Tabela 9).

TABELA 9 Valores do teste de Kruskal-Wallis para severidade de doença foliar, emissão de raízes e comprimento de raízes em plântulas da cultivar FUNDACEP 59 RR quando expostas a filtrados de cultura de isolados de *Fusarium* spp. Santa Maria, RS. 2008.

Variáveis	Valor do teste	Valor p
Severidade de doença foliar	21,43	0,044
Emissão de raízes	22,85	0,029
Comprimento de raízes	22,23	0,035

(p) probabilidade de erro ($p < 0,05$).

Em relação à severidade de doença foliar para a cultivar FUNDACEP 59 RR, os isolados *F. subglutinans*, *F. kyushuense* "A" e *F. graminum* foram os mais agressivos, obtendo as maiores porcentagens de severidade (Figura 12). Porém, nas plantas expostas aos filtrados de *F. acuminatum*, *F. solani* "A" e *F. verticillioides*, o percentual de severidade foi baixo e, por isso, esses isolados não diferiram da Testemunha. Entre os demais tratamentos houve pouca diferença, porém, todos os isolados foram capazes de provocar sintomas da doença.

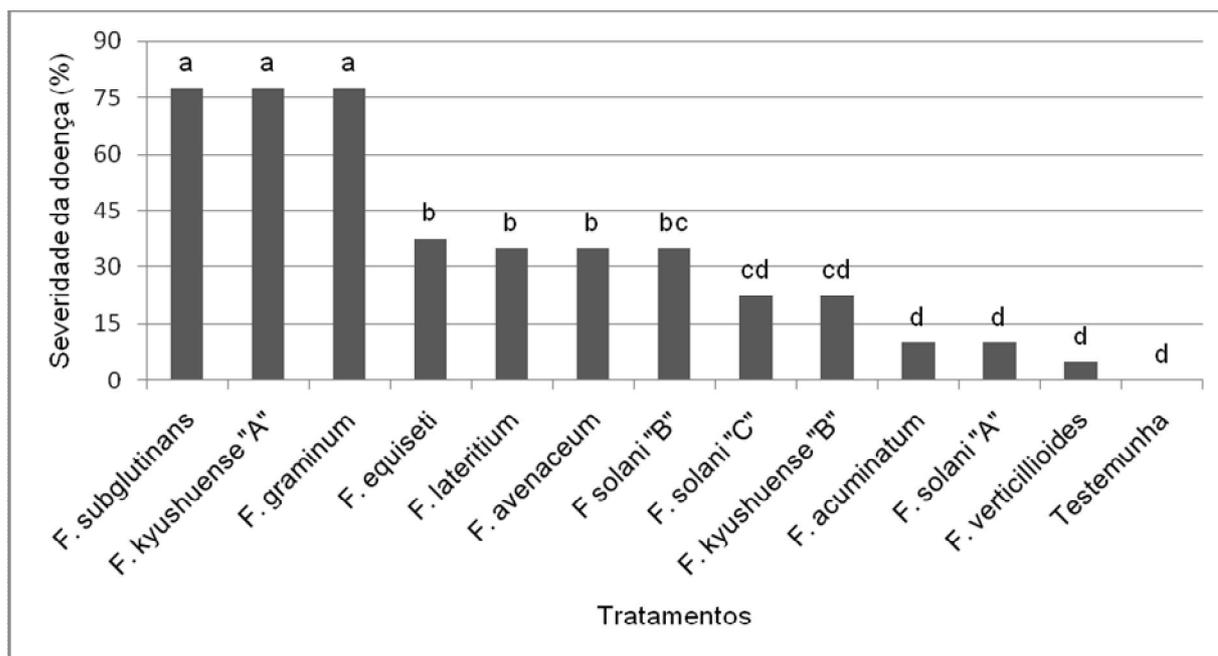


FIGURA 12 Severidade de doença foliar em plântulas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR expostas a filtrados de cultura de diferentes isolados de *Fusarium* spp. após oito dias. Santa Maria, RS. 2008.

Para a variável emissão de raízes, na cultivar FUNDACEP 59 RR, os tratamentos que incluíam a imersão das plântulas em filtrados de cultura de *Fusarium* spp. diferiram da testemunha. Esse resultado reforça a idéia de que os metabólitos presentes nos filtrados utilizados possuem alguma substância inibitória sobre a diferenciação, divisão e expansão celular das plântulas (Figura 13).

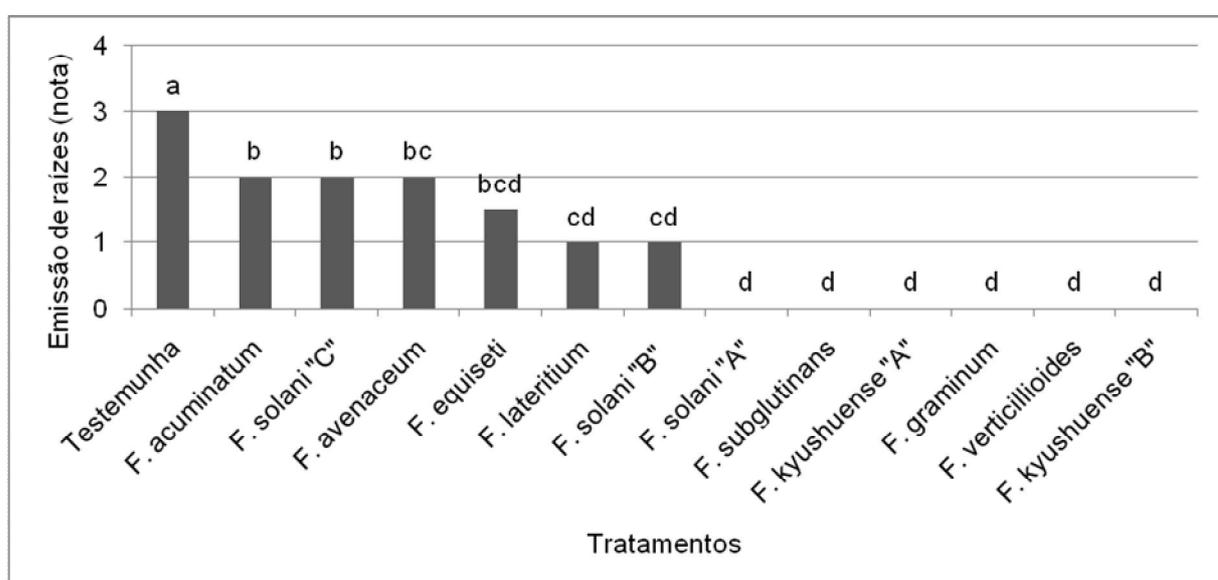


FIGURA 13 Emissão de raízes em plântulas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR expostas a filtrados de cultura de diferentes isolados de *Fusarium* spp. após oito dias. Santa Maria, RS. 2008.

A Testemunha obteve nota máxima (três) em relação à emissão de raízes (raízes normais) enquanto as plântulas imersas nos filtrados de cultura de *F. solani* "A", *F. subglutinans*, *F. kyushuense* "A" e "B", *F. graminum* e *F. verticillioides* não emitiram raízes (nota zero). Certamente esses foram os tratamentos que provocaram maior desordem metabólica, principalmente do ponto de vista hormonal, uma vez que prejudicaram a emissão de raízes.

Avaliando a evolução de sintomas da PVR em plântulas de soja expostas à filtrados de cultura de *F. solani* f. sp. *glycines*, Freitas (2003) verificou que no quinto dia de exposição ao filtrado de cultura as plântulas imersas não emitiram raízes, cessando assim a absorção da solução. Em contrapartida, as testemunhas imersas em solução de KH_2PO_4 , pH 6,0, apresentaram emissão de raízes.

Os Tratamentos testemunha e isolado *F. avenaceum* obtiveram os maiores comprimentos de raízes e os tratamentos *F. solani* "A", *F. subglutinans*, *F. kyushuense* "A", *F. graminum*, *F. verticillioides* e *F. kyushuense* "B" foram os que mais afetaram a variável analisada. Além disso, é possível que a cultivar FUNDACEP 59 RR tenha maior sensibilidade à ação de metabólitos fúngicos (Figura 14).

Quando o patógeno entra em contato com o hospedeiro suscetível ocorrem uma série de reações em cascata que visam proteger o metabolismo vegetal contra o ataque do fitopatógeno. Em contrapartida, na guerra biológica que se inicia, o patógeno secretará uma gama de compostos tóxicos que irão protegê-lo contra o ataque das substâncias de defesa produzidas pelo vegetal. Nisso, há produção de fatores "*mating types*" e de virulência, proteção contra compostos de defesa e secreção de toxinas no interior da célula atacada (STERGIOPOULOS et al., 2002). Esse arsenal bioquímico produzido tanto pela planta quanto pelo patógeno prejudicam o desenvolvimento normal do vegetal, podendo atrofiar seu sistema radicular.

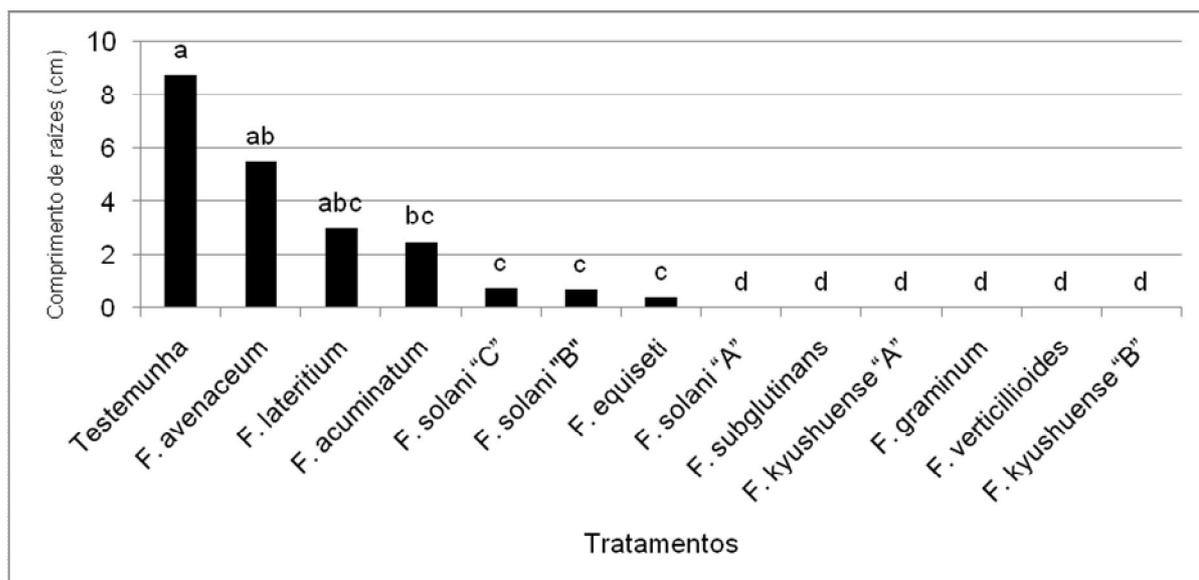


FIGURA 14 Comprimento de raízes de plântulas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR expostas a filtrados de cultura de diferentes isolados de *Fusarium* spp. após oito dias. Santa Maria, RS. 2008.

Resultados de pesquisa obtidos por Kang ; Buchenauer (2002) mostraram que a colonização intra e intercelular da lema, pálea, ovário e ráquis de espigas de trigo por hifas de *F. culmorum* causam alterações pronunciadas nas paredes celulares e lamela média e também resultam em modificações nos componentes da parede celular do hospedeiro como celulose, polímeros de xilose (xilana) e pectina.

Os resultados observados nesse estudo vêm de encontro aos obtidos por Freitas (2003). As cultivares aqui relatadas não demonstraram ter resistência ao patógeno, porém houve uma variabilidade no grau de expressão dos sintomas, tanto que para FUNDACEP 53 RR, não houve efeito significativo para a severidade da doença como aconteceu na cultivar FUNDACEP 59 RR. Conforme aumentava o tempo de exposição aos filtrados de cultura notava-se a reação das plantas e, em alguns casos, a severidade foi tão intensa que, ao terceiro dia de imersão na solução de filtrado, as plântulas já exibiam sinais de colapso celular total, o que era verificado por sintomas como murcha generalizada, lesões necróticas em folíolos e abscisão de folíolos (Figura 15).

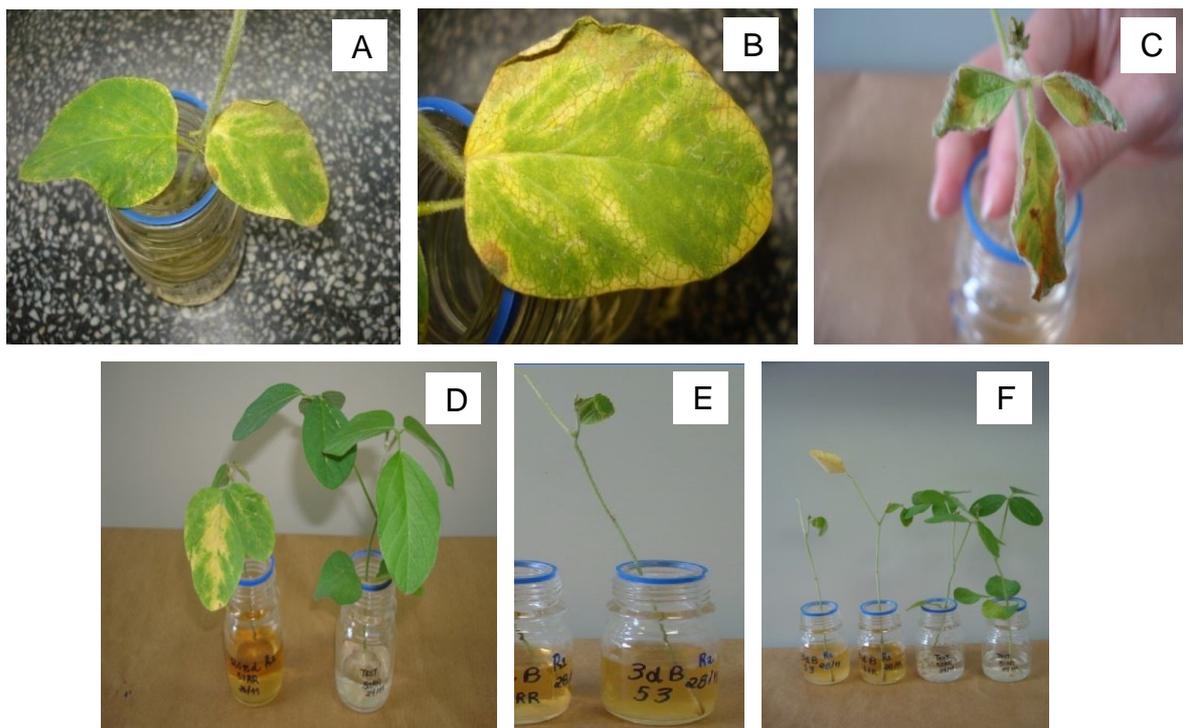


FIGURA 15 Evolução dos sintomas da doença em plântulas de soja expostas a filtrados de cultura de diferentes espécies de *Fusarium*. **A:** clorose internerval nos folíolos inferiores aos três dias de exposição ao filtrado; **B:** clorose internerval em detalhe; **C:** clorose internerval e necrose de bordos no primeiro trifólio; **D:** comparação entre uma planta imersa em solução de filtrado de cultura (exibindo clorose) e a testemunha (imersa em solução de KH_2PO_4); **E:** plântula aos oito dias de exposição ao filtrado de cultura, exibindo abscisão de trifólios e **F:** plântulas imersas em solução de filtrado, já sem os trifólios, em comparação às testemunhas. Santa Maria, RS. 2008.

A ação conjunta das micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. ainda é alvo de muitas especulações. Sabe-se que tais micotoxinas contribuem diretamente para a habilidade que *Fusarium* spp. possuem ao causar doenças em plantas (PROCTOR et al., 2002). Os autores citam, por exemplo, a produção de tricotecenos deoxivalenol (DON) e DON acetilado por *F. graminearum* e *F. verticillioides* como produtor de fumonisinas.

Além dos distúrbios metabólicos que as toxinas produzidas por *Fusarium* spp. provocam, existe uma preocupação perante o acúmulo dessas toxinas em grãos, principalmente milho, trigo e soja. Em um trabalho que avaliou a capacidade de contaminação por toxinas produzidas por *Fusarium proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg, isolado ITEM 1752 em grãos de milho, Pascale et al. (1999), observaram, nos experimentos que envolveram inoculação de toxinas, diferentes graus de manifestação da doença em nove híbridos de milho testados. Esse resultado, *in vivo*, corrobora com os aqui relatados, reforçando a idéia de que há diferença na patogenicidade de espécies de *Fusarium*.

A variabilidade observada na severidade de doença foliar e na emissão de raízes em plântulas tratadas com filtrado de cultura corrobora com os resultados obtidos por Burke (2007), que cita que as respostas fisiológicas da planta ao estresse, geralmente, variam com a severidade e a duração da exposição da mesma a esse estresse. Embora a planta produza metabólitos para sua defesa contra as micotoxinas, alguns componentes desse sistema seriam inativados e até mesmo destruídos devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Isso sobrecarregaria o limite de tolerância que os compostos produzidos pela planta teriam resultando em uma injúria micotóxica (WU et al., 2008).

2.3.3 Teste de patogenicidade

Em função da desuniformidade da ocorrência de sintomas da doença na parte aérea e no sistema radicular, não foi possível adotar o critério de notas para avaliação de severidade. Isso pode ter acontecido em função da ausência de condições ambientais favoráveis ao estabelecimento do patógeno e desenvolvimento da doença ou, em função dos isolados testados nesse ensaio possuírem especificidade quanto ao hospedeiro. Alguns sintomas como clorose internerval e necrose em bordos dos folíolos, puderam ser observados entre as repetições que compunham os tratamentos em que foi feita inoculação (Figura 16). A análise de variância feita para as variáveis resposta desse experimento encontra-se na tabela 10 (Apêndice 1).

De acordo com Fronza (2003), a reação de genótipos de soja à podridão vermelha da raiz, avaliada por meio de sintomas foliares, é influenciada pelo ambiente, especialmente época, tipo e homogeneidade de sementeira, temperatura e teor de umidade do solo, temperatura do ar e quantidade de inóculo.

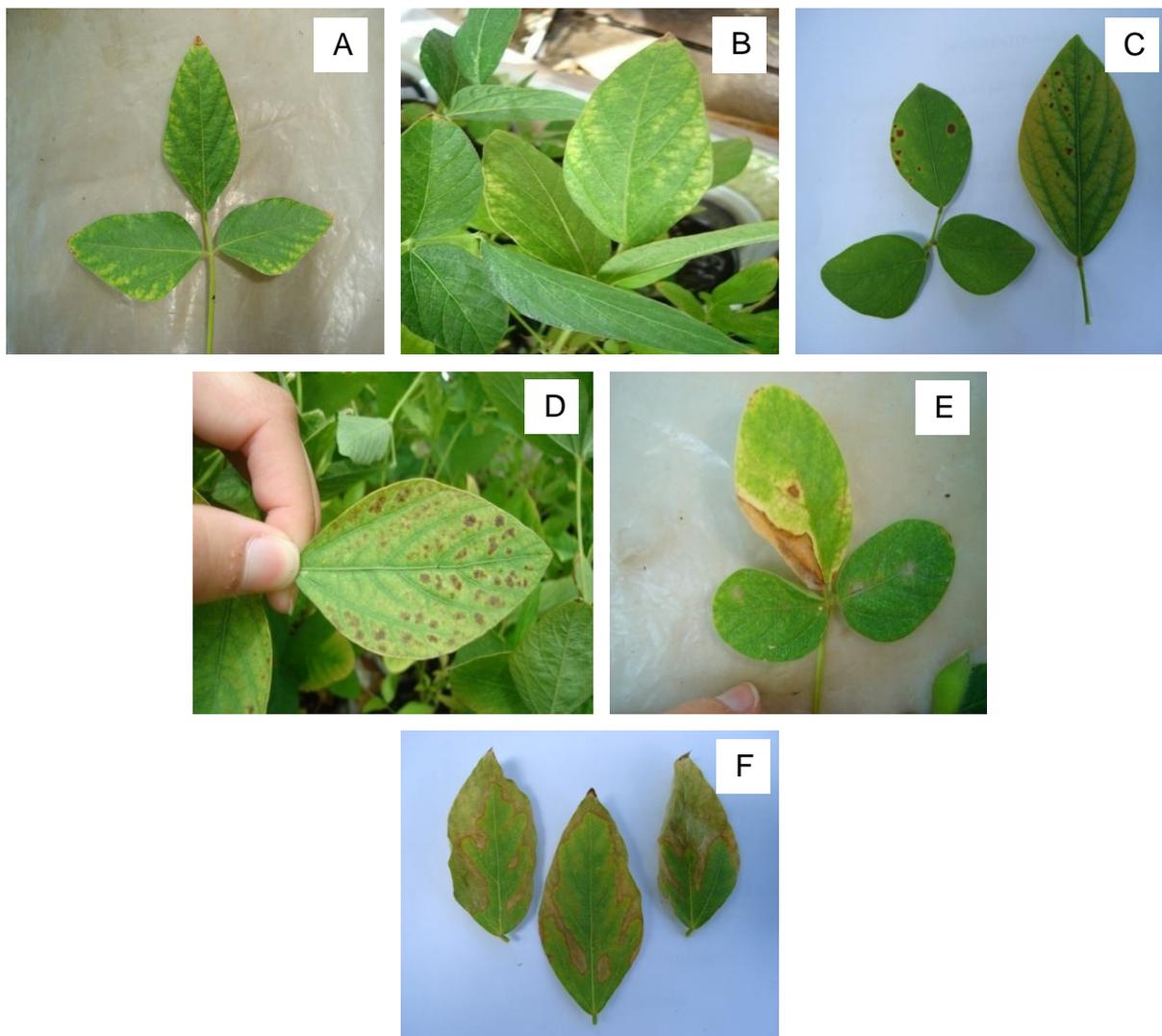


FIGURA 16 Sintomas observados em plantas de soja de duas cultivares inoculadas com diferentes espécies de *Fusarium*. **A e B**: clorose internerval; **C**: pontuações necróticas nos bordos e na base das nervuras dos folíolos; **D**: evolução do sintoma passando para uma necrose internerval; **E**: necrose nos bordos dos folíolos e **F**: folha carijó, sintoma típico da PVR. Santa Maria, RS. 2008.

No entanto, foi possível observar presença de *Fusarium* spp. nos fragmentos de raiz colocados sob condições de câmara úmida, em praticamente todas as repetições, em todas as plantas inoculadas com o patógeno. Embora doenças de plantas sejam usualmente caracterizadas por partes da planta afetadas (manchas foliares, podridões de raízes, murchas, etc...), pouco é conhecido sobre os fatores que condicionam a habilidade dos patógenos ao colonizar diferentes tecidos da planta (Dufresne; Osbourn, 2001). Patógenos de solo, entretanto, são muito hábeis para competir efetivamente com a comunidade microbiana existente na rizosfera e para combater metabólitos antimicrobianos que são produzidos pelas raízes das plantas (CARTER et al., 1999).

Com relação à variável número de folhas, houve efeito significativo para os isolados testados, e as maiores médias foram obtidas por *F. kyushuense* "A" seguido por *F. solani* "A", *F. subglutinans* e *F. avenaceum* (Figura 17). Os demais tratamentos assumiram o mesmo comportamento que o tratamento testemunha em relação à essa variável, sendo que os tratamentos *F. verticillioides*, *F. graminum*, *F. solani* "B" e *F. acuminatum* apresentaram menor número de folhas.

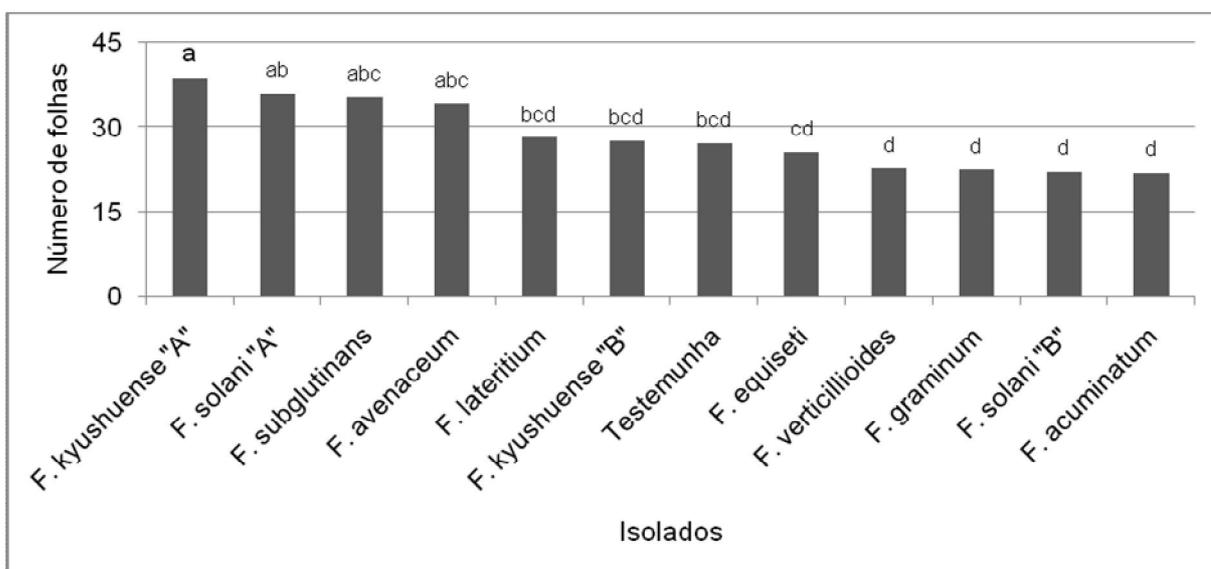


FIGURA 17 Número de folhas em plantas de soja inoculadas com diferentes espécies de *Fusarium* após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.

Para a variável número de vagens na cultivar FUNDACEP 53 RR (Figura 18), as maiores médias foram observadas em plantas inoculadas com *F. solani* "A" mas, mesmo assim, não houve diferença entre os demais tratamentos e o tratamento testemunha, exceto em plantas inoculadas com *F. kyushuense* "A" nas quais, o número de vagens foi reduzido. Vale ressaltar que isolados dessa espécie são típicos produtores de tricotecenos em trigo, toxinas estas que colaboram para o desenvolvimento da doença e, conseqüentemente, comprometem o rendimento em plantas por ele infectadas (AOKI; O'DONNELL, 1998).

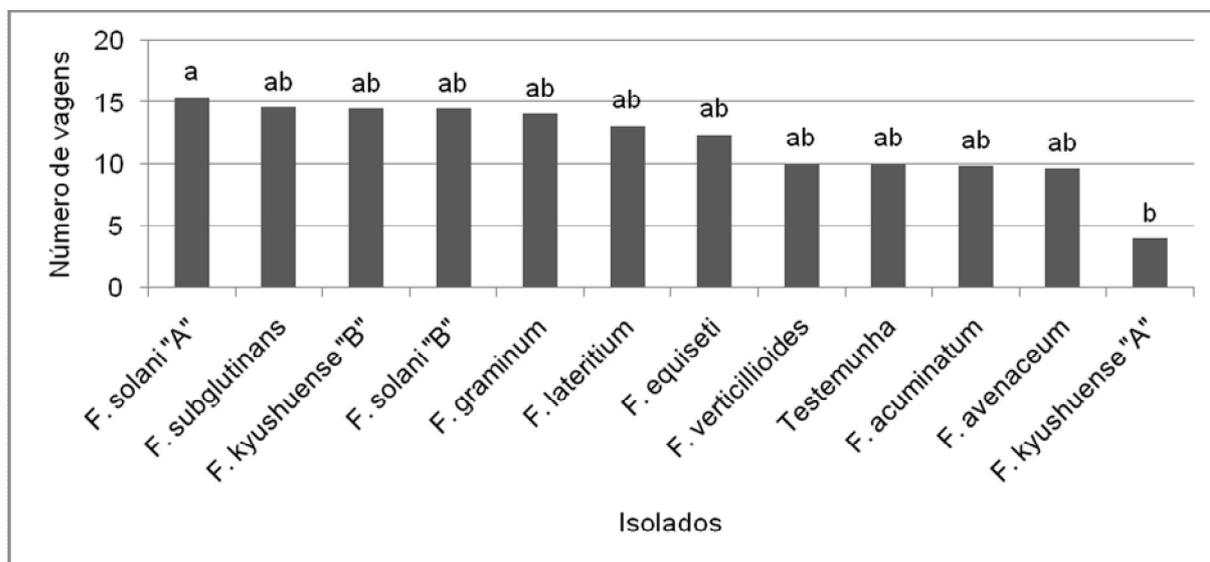


FIGURA 18 Número de vagens em plantas de soja da cultivar FUNDACEP 53 RR inoculadas com diferentes espécies de *Fusarium* após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.

Em contrapartida, na cultivar FUNDACEP 59 RR houve uma inversão na ordem de isolados que promoveram ou inibiram a formação de vagens e isso pode ser em função da especificidade do patógeno à cultivar de onde o mesmo foi isolado. Assim, por ter sido inoculado em uma cultivar diferente daquela que foi obtido, *F. kyushuense* "A" foi a espécie que obteve as maiores médias para a variável em questão, diferindo apenas do isolado *F. subglutinans*. O tratamento testemunha não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 19).

Mesmo que não tenha ocorrido diferença estatística entre os tratamentos e o tratamento testemunha na cultivar FUNDACEP 59 RR, é possível observar que as espécies *F. avenaceum* e *F. subglutinans* prejudicaram o desenvolvimento de vagens em plantas de soja. Durante a infecção e colonização do patógeno nos tecidos da planta, ocorrem muitas reações em cadeia que irão ter interferências diretas em alguns metabolismos e, entre eles, o hormonal. Uma hipótese que pode auxiliar na compreensão desses resultados é a super produção ou inibição de alguns hormônios responsáveis pela diferenciação de gemas e floração.

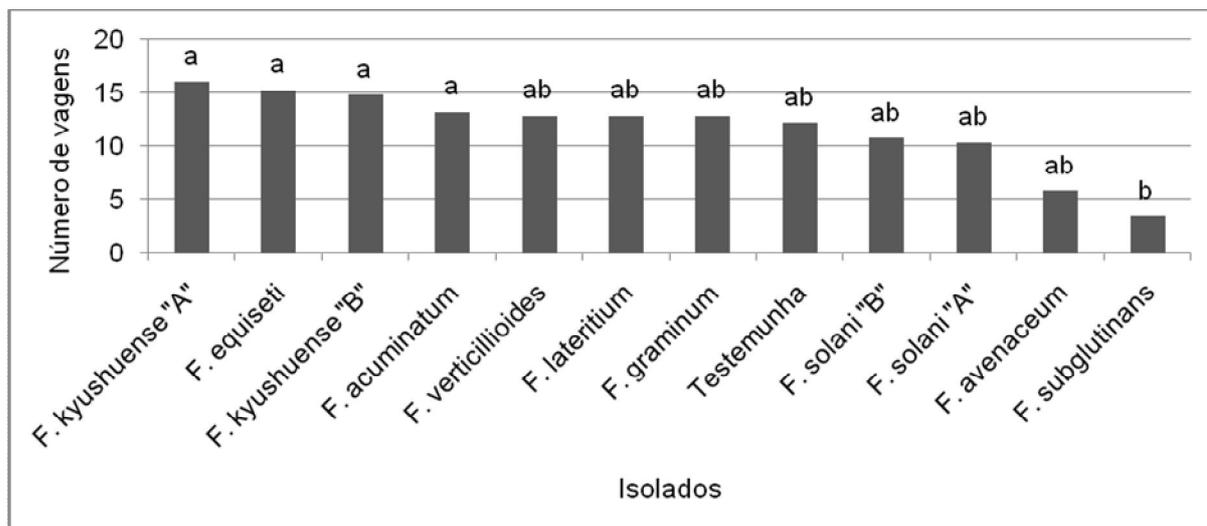


FIGURA 19 Número de vagens em plantas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR inoculadas com diferentes espécies de *Fusarium* após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.

De acordo com Hershman et al. (1990), o número de vagens em plantas com sintomas de PVR só é afetado quando a severidade da doença atinge níveis moderados a severos, o que não aconteceu neste trabalho. Além disso, maior severidade da doença durante o florescimento e a produção de vagens pode resultar no aborto de flores e vagens (ROY et al., 1997).

Para a variável diâmetro de colo, a análise estatística mostrou que houve interação significativa entre as cultivares de soja e as espécies de *Fusarium* inoculadas. Na cultivar FUNDACEP 53 RR, o tratamento *F. avenaceum* obteve a maior média para a variável em questão e os demais tratamentos não diferiram do tratamento testemunha (Figura 20).

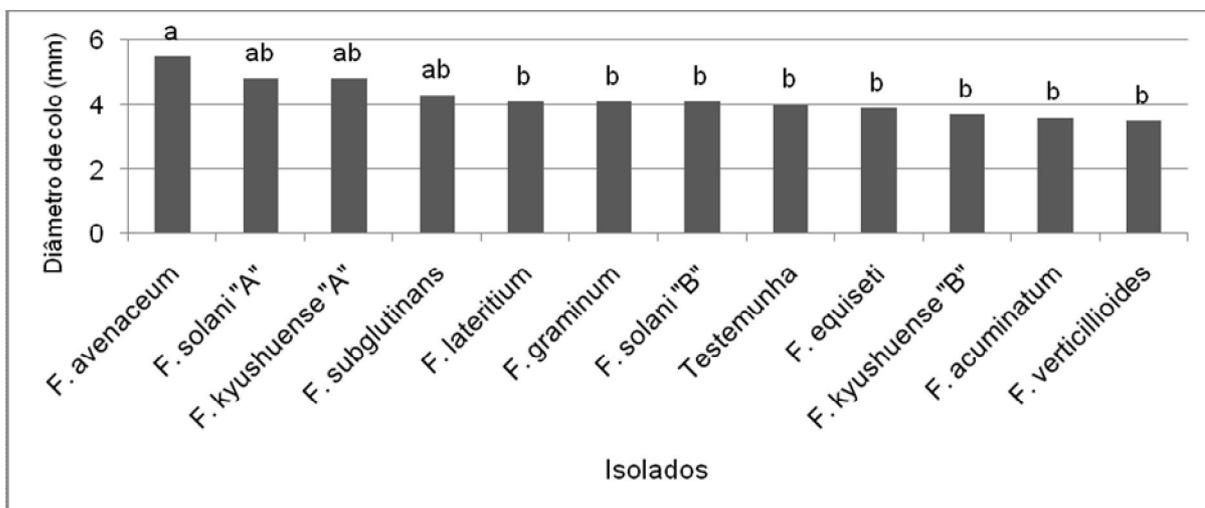


FIGURA 20 Diâmetro de colo (mm) em plantas de soja da cultivar FUNDACEP 53 RR inoculadas com diferentes espécies de *Fusarium* após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.

Comportamento similar foi observado na cultivar FUNDACEP 59 RR, embora tenha sido observada pouca diferença entre os tratamentos. A espécie *F. subglutinans* foi a que promoveu maior diâmetro de colo e os demais tratamentos não diferiram do tratamento testemunha (Figura 21).

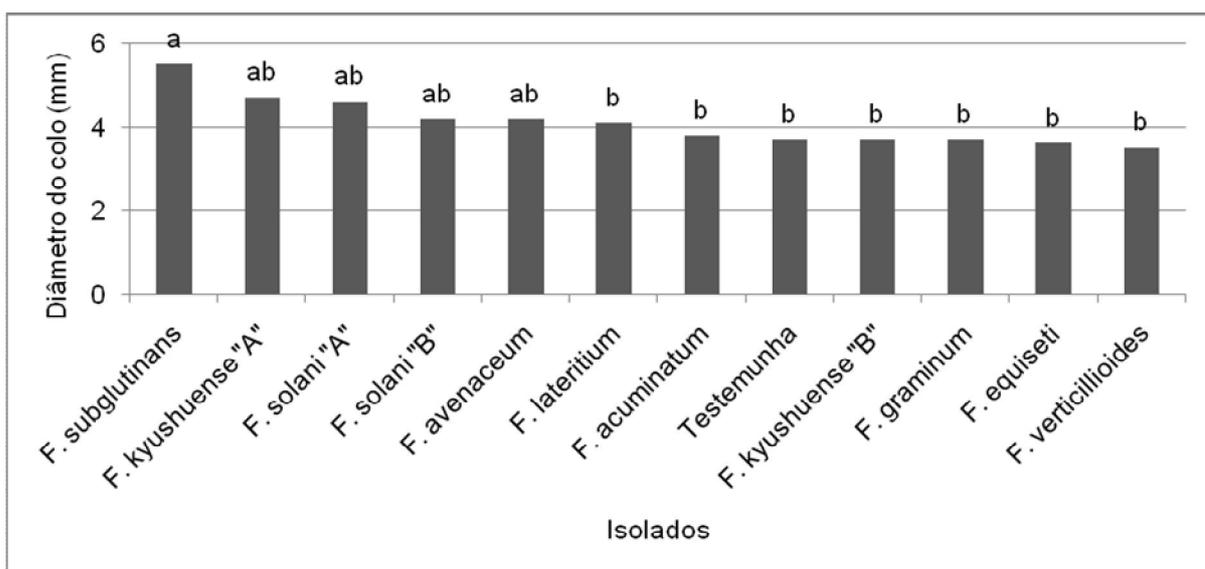


FIGURA 21 Diâmetro de colo (mm) em plantas de soja da cultivar FUNDACEP 59 RR inoculadas com diferentes espécies de *Fusarium* após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.

Embora poucas diferenças tenham sido observadas entre os tratamentos para as variáveis número de folhas, número de vagens e diâmetro de colo, é importante ressaltar que houve efeito significativo para isolados, o que permite inferir que esses, mesmo não provocando o surgimento de alguns sintomas típicos da PVR, foram capazes de afetar o metabolismo da planta, fato que pode ser observado por alterações em número de folhas e vagens. Assim, pode ter havido influência negativa do ambiente para o surgimento de sintomas reflexos da doença na parte aérea das plantas inoculadas com o patógeno.

Em relação à fitomassa seca (FMS) de parte aérea, houve efeito significativo apenas para isolados quando, nas plantas inoculadas com isolados de *Fusarium* spp., foi verificada maior FMS de parte aérea para alguns isolados (Figura 22). Em contrapartida, Oliveira (2007), ao avaliar o peso seco de parte aérea e raízes de cártamo (*Carthamus tinctorius*) cultivado em presença ou ausência de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary., verificou que a presença do patógeno no substrato de cultivo reduziu o crescimento das plantas, o que foi comprovado pelo peso seco de parte aérea e raízes. O autor enfatizou que, mesmo sem produzir sintomas na planta, *S. sclerotiorum* prejudicou o desenvolvimento vegetal.

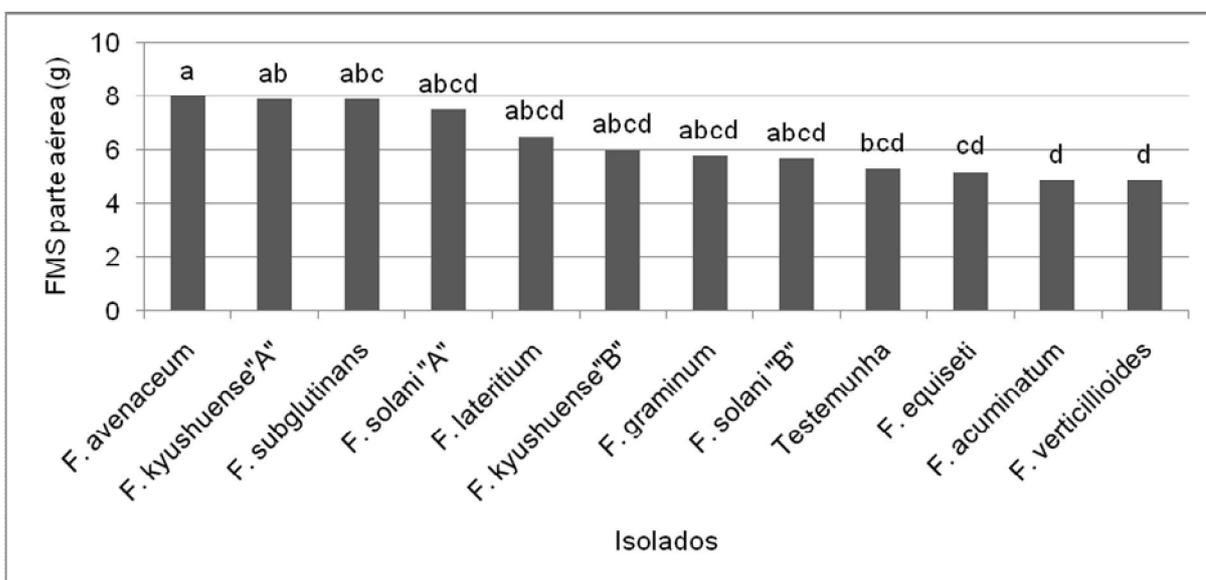


FIGURA 22 Fitomassa seca de parte aérea (g) de plantas de soja inoculadas com diferentes espécies de *Fusarium* após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, RS. 2008.

A figura 22 aponta que os isolados de *F. acuminatum* e *F. verticillioides* foram os que mais prejudicaram a FMS de parte aérea, fator que indica que a planta sofreu

uma redução nos níveis fotossintéticos. Em contrapartida, repetindo o que já havia sido observado para a variável diâmetro de colo, as plantas que foram inoculadas com o isolado de *F. avenaceum* tiveram as maiores médias de FMS de parte aérea.

A variável FMS de raiz também se comportou da mesma forma que FMS de parte aérea, sendo o fator isolados de *Fusarium* spp. o único com efeito significativo (Figura 23). Alguns isolados diferiram entre si, mas não diferiram do tratamento testemunha, sendo que esses dados reforçam a hipótese de que pode ter havido uma especificidade do isolado de *Fusarium* spp. em relação ao genótipo de soja, fazendo com que esses isolados estimulassem o crescimento da planta quando inoculados em diferentes genótipos.

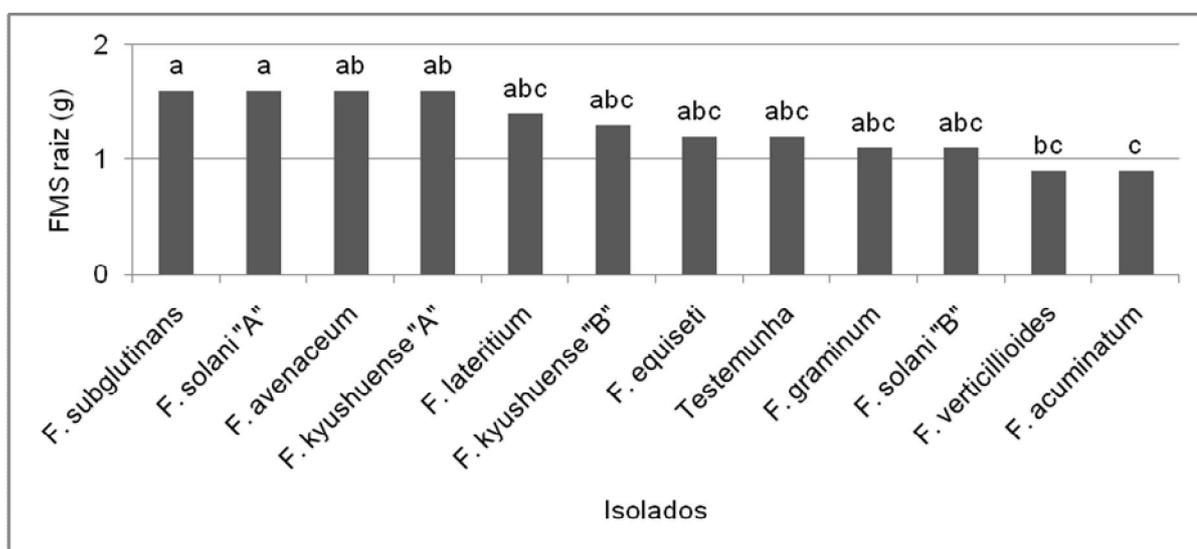


FIGURA 23 Fitomassa seca de raiz (g) de plantas de soja inoculadas com diferentes espécies de *Fusarium* após três meses de contato com os isolados do patógeno. Santa Maria, 2008.

Em contrapartida, Poletto (2008), avaliando nutrição e níveis de sombreamento em plantas inoculadas e não inoculadas com isolados de *F. oxysporum*, *F. solani* e também com os dois patógenos combinados, observou que as variáveis biomassa radicular, aérea e total foram bastante comprometidas pela presença dos fitopatógenos. O autor ainda menciona que *Fusarium* spp. foi capaz de diminuir o sistema radicular, possivelmente em função de impedimento no crescimento ou necrose, provocando diminuição da biomassa aérea e, conseqüentemente, menor absorção de nutrientes e/ou obstrução dos vasos condutores de seiva.

A expressão de sintomas foliares da PVR em soja, assim como a classificação de resistência das cultivares, pode diferir de acordo com o ano e a época de semeadura, afetando a colonização da raiz pelo patógeno (HERSHMAN et al.,1990). Quando o objetivo é selecionar alelos que possam conferir resistência a essa doença, o ideal é conduzir o ensaio em locais cujas condições ambientais sejam as mais controladas possíveis, tais como casas-de-vegetação ou câmaras de crescimento (MELGAR; ROY, 1994). Conforme relatado por Njiti et al. (2001), ensaios realizados em casa-de-vegetação reduzem custos experimentais oriundos de dados perdidos devido à variabilidade de campo e facilitam a seleção e o isolamento de alelos de resistência à PVR.

2.4 CONCLUSÕES

1. Diferentes espécies de *Fusarium* estão associadas ao sistema radicular de plantas de soja com sintomas de PVR.
2. Genótipos de soja variam com relação às espécies de *Fusarium* associadas às suas raízes.
3. Espécies de *Fusarium* possuem agressividade diferenciada em relação à manifestação dos sintomas em soja que é dependente do genótipo de soja.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, L. A.; PATRICK, J.; GRAY, L. Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. **Plant Disease**, v. 80, p. 1228-1232. 1996.

AOKI, T.; O'DONNELL, K. *Fusarium kyushuense* sp. nov. from Japan. **Mycoscience**, v. 39, p. 1-6. 1998.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. in: NELSON, P. E.; TOUSSOUM, T. A.; COOK, R. J. **Fusarium: diseases, biology and taxonomy**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, p. 391-399. 1981.

ARRUDA, G. M. T. et al. Morphological and molecular characterization of the sudden death syndrome pathogen of soybean in Brazil. **Plant Pathology**, v. 54, p. 53-65. 2005.

BAKER, R. A.; NEMEC, S. Soybean sudden death syndrome: isolation and identification of a new phytotoxin from cultures of the agent causal, *Fusarium solani*. **Phytopathology**, v. 84, p. 1144. 1994.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). in: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 376-399. 1997.

BOOTH, C. **The Genus Fusarium**. Oxford: Commonwealth Mycological Institute, 237 p. 1971.

BRODERS, K. D. et al. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. **Plant Disease**, v. 91, p. 1155-1160. 2007.

BURKE, J. J. Evaluation of source leaf responses to water deficit stresses in cotton using a novel stress bioassay. **Plant Physiology**, v. 143, p.108–121. 2007.

CARTER, J. P. et al. Isolation, characterization, and avenacin sensitivity of a diverse collection of cereal-root colonizing fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3364-3372. 1999.

CASA, R. T. et al. Efeito do tratamento de sementes de milho com fungicidas, na proteção de fungos do solo, no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 633-637. 1995.

CHO, J. H. et al. Isolation and identification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* from soil on modified Nash and Snyder's medium. **Plant Disease**, v. 85, p. 256–60. 2001.

CORDEIRO, Z. J. M; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). in: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**, v. 2, 4 ed., São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 99-117. 2005.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**. New York: Academic Press, 859 p. 1980.

DUFRESNE, M.; OSBOURN, A. E. Definition of tissue-specific and general requirements for plant infection in a phytopathogenic fungus. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 14, p. 300–307. 2001.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006, 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT. 1993. 128 p.

FREITAS, T. M. Q. **Dano, dinâmica populacional e fontes de resistência genética a *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2003, 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

FRONZA, V. **Genética e reação de soja à *Fusarium solani* f.sp. *glycines***. 2003, 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade de São Paulo-ESALQ, Piracicaba, 2003.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium* – a pictorial atlas**. Berlin: Biologische Bundesanstalt für Land – und. Forstwirtschaft. 1982, 496 p.

GODOY, P.; COLOMBO, A. L. Biologia e relevância clínica das espécies do gênero *Fusarium* spp. **Prática Hospitalar**, v. 11, p. 136-140. 2004.

HARTMAN, G. L.; NOEL, G. R.; GRAY, L. E. Occurrence of soybean sudden death syndrome in east-central Illinois and associated yield losses. **Plant Disease**, v. 79, p. 314-318. 1995.

HERSHMAN, D. E. et al. Influence of planting date and cultivar on soybean sudden death syndrome in Kentucky. **Plant Disease**, v. 74, p. 761-766. 1990.

HUANG, Y. H.; HARTMAN, G. L. Reaction of selected soybean genotypes to isolates of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and their culture filtrates. **Plant Disease**, v. 82, p. 999-1002. 1998.

JIN, H. et al. Characterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. **Phytopathology**, v. 86, p. 277-281. 1996.

KANG, Z.; BUCHENAUER, H. Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 653-660. 2002.

LI, S.; TAM, Y. K.; HARTMAN, G. L. Molecular differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* from other *F. solani* based on mitochondrial small subunit rDNA sequences. **Phytopathology**, v. 90, p. 491-497. 2000.

LIM, S. M.; SONG, H. S.; GRAY, L. E. Phytotoxicity of culture filtrate from *Fusarium solani* isolated from Soybean. (Abstr.). **Phytopathology**, v. 80, p. 1044. 1990.

LOZOVAYA, V. V. et al. Biochemical response of soybean roots to *Fusarium solani* f. sp. *glycines* infection. **Crop Science**, v. 44, p. 819-826. 2004.

LUCA FILHO, O. A. Testes de sanidade de sementes de milho. in: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. (Eds.) **Patologia de sementes**. Campinas. Fundação Cargill, p. 430-440. 1987.

LUO, Y. et al. Soybean yield loss to sudden death syndrome in relation to symptom expression and root colonization by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Plant Disease**, v. 84, p. 914-920. 2000.

MELGAR, J.; ROY, K. W. Soybean sudden death syndrome: cultivar reactions to inoculation in a controlled environment and host range and virulence of causal agent. **Plant Disease**, v. 78, p. 265-268. 1994.

NELSON, B. D.; HANSEN, J. M. Reaction of soybean cultivars to isolates of *Fusarium solani* from the Red River Valley. **Plant Disease**, v. 81, p. 664-668. 1997.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* Species: an Illustrated Manual for Identification**. Philadelphia: Pennsylvania State University Press. 1983. 193 p.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J. **Fusarium: diseases, biology and taxonomy**. Pennsylvania State University Press, University Park, p. 391-399. 1981.

NETO, A. L. F. et al. Irrigation and inoculation treatments that increase the severity of soybean sudden death syndrome in the Field. **Crop Science**, v. 46, p. 2547-2554. 2006.

NJITI, V. N. et al. Inoculum rate influences selection for field resistance to soybean sudden death syndrome in the greenhouse. **Crop Science**, v. 41, p. 1726-1731. 2001.

O'DONNELL, K. Phylogenetic evidence indicates the important mycotoxigenic strains Fn-2, Fn-3, Fn-2B and Fn-M represent a new species of *Fusarium*. **Mycotoxins**, v. 45, p.1-10. 1997.

OLIVEIRA, G. G. ***Trichoderma* spp. no crescimento vegetal e no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* e de patógenos em sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius*)**. 2007, 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

OLIVEIRA, V. C; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* de *F. solani* f.sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p. 631-634. 2002.

PASCALE, M. et al. Mycotoxin contamination of maize hybrids after infection with *Fusarium proliferatum*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 2094-2098. 1999.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: KIMATI, H. et al. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo. Editora Agronômica Ceres, p. 538-555. 1997.

POLETTI, I. **Nutrição, níveis de sombreamento e antagonismo biológico no controle da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill)**. 2007, 118 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

PROCTOR, R. H. et al. Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 691–698. 2002.

PUHALLA, J. E. Genetic considerations of the Genus *Fusarium*. In: NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J. (Ed) **Fusarium: diseases, biology and taxonomy**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, v. 27, p. 291-305. 1981.

ROY, K. W. et al. Sudden death syndrome of soybean. **Plant Disease**, v. 81, p. 1100-1111. 1997.

ROY, K. W. *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. **Plant Disease**, v. 81, p. 259–66. 1997.

RUPE J. C. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. **Plant Disease**, v. 73, p. 581–584. 1989.

RUPE, J. C. et al. Isolation, identification and evaluation of fungi for the control of sudden death syndrome of soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 18, p. 1–6. 1996.

SCHERM, H.; YANG, X. B.; LUNDEEN, P. Relationship of soil factors to severity of sudden death syndrome of soybean in Iowa. **Phytopathology**, v. 86, p. 84. 1996.

SIEGEL, S.; CASTELLAN, N. J. **Estatística Não-Paramétrica para as Ciências do Comportamento**. 2^o ed. 2006.

SOUZA FILHO, A.P.S.; DUARTE, M.L.R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 227-230. 2007.

STERGIOPOULOS, I.; ZWIERS, L. H.; WAARD, M. A. Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 719–734. 2002.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, v. 87, n. 2, p. 117-128. 2003.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte II – Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 303-338. 2000.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I – História, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, p. 271-297. 1999.

WINDELS, C. E. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the northern Great Plains. **Phytopathology**, v. 90, p. 17–21. 2000.

WU, H. S. et al. Effect of fungal fusaric acid on the root and leaf physiology of watermelon (*Citrullus lanatus*) seedlings. **Plant Soil**, v. 308, p. 255–266. 2008.

ZHANG, N.; GEISER, D. M.; SMART, C. D. Macroarray detection of solanaceous plant pathogens in the *Fusarium solani* species complex. **Plant Disease**, v. 91, p. 1612-1620. 2007.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. D.; SILVEIRA JUNIOR, P. **Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores: SANEST**. Pelotas: UFPEL, 1984. (Registro SEI n. 06606-0 categoria AO).

ANEXOS

ANEXO 1

Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

- 200 g de batatas descascadas e fatiadas;
- 20 g de dextrose;
- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio de cultura.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

ANEXO 2

Meio de cultura Folha de Cravo – Agar (FCA ou CLA)

- 15 g de agar;
- 1 L de água destilada;
- folhas de cravo (distribuídas na placa de Petri antes de verter o meio).

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification***. Philadelphia: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

ANEXO 3

Meio de cultura Ágar-água (AA)

- 17 g de Agar-ágar;
- 1 L de água destilada.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

ANEXO 4

Meio de cultura YPD (Yeast, Pepton, Dextrose – Extrato de levedura, Peptona e Dextrose)

- 20 g de peptona;
- 10 g de extrato de levedura;
- 20 g de dextrose;
- 1 L de água destilada.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

TABELA 10 Análise de variância para as variáveis respostas estudadas no teste de patogenicidade de diferentes isolados de *Fusarium* spp. à soja. Santa Maria, RS. 2008.

Variável resposta	Causas de variação	Prob.>F
Número de folhas	Cultivar	0,00001*
	Isolado	0,00001*
	Cultivar*Isolado	0,17683ns
	CV (%)	20,30
Número de vagens	Cultivar	0,87750ns
	Isolado	0,08868ns
	Cultivar*Isolado	0,00147*
	CV (%)	38,0
Diâmetro de colo	Cultivar	0,57150ns
	Isolado	0,00001*
	Cultivar*Isolado	0,02826*
	CV (%)	13,5
Fitomassa seca de parte aérea	Cultivar	0,23719ns
	Isolado	0,00007*
	Cultivar*Isolado	0,44535ns
	CV (%)	25,1
Fitomassa seca de raiz	Cultivar	0,04837*
	Isolado	0,000368*
	Cultivar*Isolado	0,50741ns
	CV (%)	30,1

(*) Efeito significativo e (ns) não significativo a 5% de probabilidade de erro.