

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS PARA O MANEJO DE
FUSARIOSE EM DIFERENTES PATOSSISTEMAS**

CASSIANO FORNER

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

Janeiro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS PARA O MANEJO DE
FUSARIOSE EM DIFERENTES PATOSSISTEMAS**

CASSIANO FORNER

Orientador: Dr. Wagner Bettiol

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

Janeiro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F727a Forner, Cassiano, 1985-
Avaliação de resíduos orgânicos para o manejo de fusariose em diferentes patossistemas / Cassiano Forner. - Botucatu : [s.n.], 2016
x, 94 f. : fots. color.; grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Wagner Bettiol
Inclui bibliografia

1. Alface - Fitopatologia. 2. Tomate - Fitopatologia. 3. Matéria orgânica. 4. *Fusarium oxysporum* - Controle. I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS PARA O MANEJO DE FUSARIOSE EM DIFERENTES PATOSSISTEMAS"

AUTOR: CASSIANO FORNER

ORIENTADOR: Prof. Dr. WAGNER BETTIOL

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER BETTIOL
Meio Ambiente / Embrapa

Prof. Dr. MARCELO AUGUSTO BOECHAT MORANDI
Embrapa Meio Ambiente

Prof. Dr. EUGENIO ALFREDO SANFUENTES VON STOWASSER
Centro de de Biotecnología - Unoversidad de Concepción - Chile

Prof. Dr. MIGUEL ANGEL DITA RODRIGUEZ
Embrapa Meio Ambiente

Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO
Depto Proteção Vegetal - FCA Unesp

Data da realização: 21 de janeiro de 2016.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento. Porque é melhor a sua mercadoria do que artigos de prata, e maior o seu lucro que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que os rubis, e tudo o que mais possas desejar não se pode comparar a ela.”

Provérbios 3:13-15

DEDICO

Aos meus pais Luiz Forner e Marisa Pavan Forner, minha irmã Talita Forner, que apesar da distância, participaram ativamente na minha formação, ajudando e incentivando a suportar os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força de todos os dias em atingir essa conquista.

À minha namorada Gabriela De Cia Moraes, pela paciência, ajuda, carinho e atenção em todas as horas. À sua família, Angélica De Cia, André Moraes e Marcelo De Cia Moraes, por me adotarem como um filho.

Ao Dr. Wagner Bettiol, por ser meu segundo pai, pela orientação, paciência, ensinamentos e risos que proporcionou.

Ao orientador de graduação Dr. Idalmir dos Santos, por introduzir a pesquisa a um estudante de agronomia perdido e abrir os seus olhos a um novo mundo.

Aos amigos Alex Marcelo Menegazzo, Max William Pellegrini, Daniel Silveira, pelos conselhos, força e momentos de descontração.

Agradeço aos meus avós: Armindo, Miraci, Catarina, Raimundo (*in memoriam*), tios: Nilza, Guido (*in memoriam*), Nelvi, Amarildo, Rosane, Teresinha, Maximino, Alécio, Aclécio, Renata, Carlos, Nani, Benildo, Soeli, Jurema, Moacir, Marcílio, Luiza, Claudete, Nilton, Loidir, Nair, Junice (*in memoriam*), Domingos, Décia, Alcides; Primos: Max, Lucas, Daniel, Bruna, Eduardo, Igor, Rodrigo, Amanda, Gabriela, Gustavo, Maristela, Roni, Talise Mírian, Leuri, Patrícia, Fernando, Sandro, Samuel, Adriane, Renan, Tiago, Alesane, Camila, Nicholas, Erick, Anthony, Henrique, Gabriela, Nathalia, Alan, Derli, Marisa, André e Ana Alice, pelo apoio em seguir em frente.

À UNESP/FCA, por permitir a realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos de doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos de doutorado sanduíche.

À Universidade de Guelph, pela oportunidade de realizar trabalhos.

À Embrapa Meio Ambiente, por disponibilizar a infraestrutura na condução dos experimentos.

Ao Dr. Paul Goodwin, da Universidade de Guelph, por me aceitar como aluno no doutorado sanduíche.

Ao Dr. Eugenio Sanfuentes Von Stowasser, da Universidade de Concepción, pelos trabalhos realizados em conjunto.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas: Antonio Carlos Maringoni, Edson Luis Furtado, Silvia Renata Siciliano Wilcken, Carlos Gilberto Raetano, Renate Krause Sakate, Marcelo Agenor Pavan, Carlos Frederico Wilcken, Adriana Zanin Kronka, Raquel Ghini e Wagner Bettiol, pelo aprendizado e estímulo.

Aos amigos de convívio, em especial, Dalton Dorighello, Mariana Monadez, Renato Boreli Silva, André Carvalho, Michelli de Souza Santos, Mauricio Martins, Regiane Iost, Guilherme Navarro, Rosilene Iost Navarro, Alba Iost Navarro, Larissa Rezende, Daniel Winter Heck, José Abrahão Haddad Galvão, Wilson Antonioli, Fábio Sérgio, Mateus Santos, Gustavo Venturini, Pamela Palmeira, Thiago Cedran, Rebeca Ramos, Tainá Oliveira, Daniella Gregório, Raissa Sylvestrin Stancatte, Francini Rodrigues, Marcos Madeira, Danilo Tosta, Ana Paula Andrade Braga, Zayame Vegette Pinto, Alexandre Visconti, Rodrigo Estevam de Oliveira Mac Leod, Carlos Eduardo Oliveira da Silva, Juliano César Silva, Muricy Moraes, Leonardo José da Silva, Daniel Hinz, Fernanda Ribeiro de Andrade Oliveira, Vanessa Nessner Kavamura, Leandro Tomio, Luana Piermann, Luiz Alexandre Sereda, Suikinai Nobre Santos, Lúcio Bertoldo Costa, Fábio Luiz Soares Júnior, Rodrigo e Natália Taketani, Rafael Eduardo Silva, Wallace Rafael de Souza, Andressa Brida, Patrícia Leite, Marcelo Soman, Lucivane Gonçalves, Paula Leite

dos Santos, Luiz Eduardo da Rocha Pannuti, Tatiane Mituti, Felipe Renzi, Bernardo Tomchinsky, Raphael Travaglini, a todos os colegas de graduação em Agronomia da UTFPR, em especial Benhur Azzolini, Maicon Lucini, Lucas Cieslik, Anderson Signorini, Giovanni Dinon, Josemar Nesi, Rafael Talheimer, Luis Carlos Plucinski Filho, Renan Mosquen, Felipe Grisa, Emerson Trogello, Tacyani Cristina, Eduardo Pagliosa e Laurês Cieslik, amigos de Marmeleiro, Francisco Beltrão, Pato Branco e Jaguariúna que não mencionei, mas foram importantes direta ou indiretamente.

Aos amigos canadenses: Doug Tonner e Mary Tonner (*in memoriam*), seus filhos e netos, por me adotarem neste período de um ano. Aos colegas da Universidade de Guelph: Amanda, Jie, Alma, Weihong, Jamison, Sarah, Ana Lucia, Judith, Megan e Molly, pelo convívio. Aos amigos de Guelph, em especial aos colegas de Jiu Jitsu da Sisu, pelos momentos de alegria.

Aos amigos chilenos da Universidade de Concepción: Daniela Alejandra e família, Erwin Guzmán Riffo, Adrián Garrido, Angélica, Diego Musiet Soto, Felipe Balocchi, Graciela Suárez, Javier Rodolfo Estrada Arias, Fernando Contreras Ruiz, Jocelyn Esquivel San Martin, Karina Vargas, José Leonardo García, Marco Sabag, Paulina Geraldine, Sebastián Nicolás Fajardo Acuña e Myriam Solís García. Aos colegas de convívio: Benner Giacomozzi Sepúlvera, Santiago Mafla Andrade, Pablo Fernández Vásquez, Camila Pinto, Constanza Ramírez Alegría, Felipe Andres Cruz Meza, Gabi Lilu Narváez, Leticia Poblete Cepeda, Jan Schwimmer, Valentina Arriaza, Alicia Ferrada e Juan Carlos Arriaza Torres. Aos colegas de Jiu Jitsu Nova União (Chile): Reinaldo Duguet, Daniel Vieira, Adrián Parada Vidal, Claudio Lagos Lagos, Cristian Cordova, Christopher Cifuentes Ambiado, Dennin Ucas, Fabian Salazar Galleguillos, Felipe Albornoz Lagos, Hans Lemp, Juan Pablo, Luciano Quiero Acevedo, Manuel Alejandro, Mauricio Barros, Pablo Arias Garcés, Rafael Molina e Diego.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental: João Luiz da Silva, Rosely dos Santos Nascimento, Elke Dias Simone Vilela, Márcia Maria Parma, Anamaria Ferreira Mayer Dentzien e Tatiana Alvez Rigamonte Fernandes, pela ajuda.

Aos pesquisadores e funcionários da Embrapa Meio Ambiente, pela ajuda.

Aos companheiros de treino de Muay thai, capoeira e da Equipe Conexão Jiu-Jitsu: Alex Marcelo Menegazzo, Mestre Cristiano Cecon, Renato Machado, Luciano Domingues, Fernando Salla, Leandro Fonseca, Marclei Neves, Fernão Zanon, Adriano Sisti, Alexandro Ruiz, Alexandre Giardiello, Andre Troitino, Raul Ramos, Emerson Vieira, Pedro Dell Vecchio, Tiago Ribeiro, Vitor Rol, Eduardo Azevedo, Gustavo Siviero, Jair Gomes da Rosa, Deividly Gardel, Volnei Felipeto, Tiago Leopoldo, Arthur Menegazzo e a todos os outros que ajudaram a superar os problemas e apoiaram em toda a caminhada do curso.

SUMÁRIO

1 RESUMO	1
2 SUMMARY	2
3 INTRODUÇÃO	3
4 REVISÃO DE LITERATURA	5
4.1 Agentes de controle biológico	8
4.1.1 <i>Trichoderma</i> sp.	8
4.1.2 <i>Bacillus</i> sp.	9
4.2 Patossistemas	10
4.2.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	10
4.2.2 <i>Fusarium circinatum</i> x <i>Pinus radiata</i>	12
4.2.3 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> x tomateiro	13

CAPÍTULO 1

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE MATERIAIS ORGÂNICOS SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>.....	16
Resumo.....	17
Abstract	18
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
AGRADECIMENTOS.....	28
REFERÊNCIAS	28

CAPÍTULO 2

EFEITO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS E <i>Trichoderma harzianum</i> NO CONTROLE DE <i>Fusarium circinatum</i> EM <i>Pinus radiata</i>	39
RESUMO	40
ABSTRACT	40
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	42
Multiplificação do patógeno e antagonista	42

Materiais orgânicos.....	43
Efeito dos resíduos orgânicos incorporados ao solo sobre a germinação de microconídios.	43
Experimento em casa de vegetação	44
Análise estatística	44
RESULTADOS	45
Efeito dos resíduos orgânicos incorporados ao solo sobre a germinação de microconídios	45
Experimento em casa de vegetação	45
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÃO.....	47
AGRADECIMENTOS.....	47
LITERATURA CITADA.....	47

CAPÍTULO 3

HIDROLISADO DE PEIXE ASSOCIADO A *Trichoderma harzianum* e *Bacillus* spp. NO CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM EM TOMATEIRO58

Resumo.....	59
Abstract	60
INTRODUÇÃO.....	60
MATERIAL E MÉTODOS.....	63
Infestação do solo, incorporação do hidrolisado de peixe e tratamento de produtos biológicos	64
Análise estatística	66
RESULTADOS	66
Severidade da doença.....	66
pH e condutividade elétrica	67
Desprendimento de CO ₂	67
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS82

5 CONCLUSÕES83

6 REFERÊNCIAS84

AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS PARA O MANEJO DE FUSARIOSE EM DIFERENTES PATOSSISTEMAS. Botucatu, 2016. 94f.

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Autor: CASSIANO FORNER

Orientador: Dr. Wagner Bettiol

1 RESUMO

Os resíduos orgânicos e agentes de biocontrole podem constituir em alternativas no controle dos fitopatógenos habitantes do solo. O trabalho teve por objetivo estudar o controle de *Fusarium* spp. com resíduos orgânicos e agentes de biocontrole. Inicialmente foi avaliado o efeito de hidrolisado e emulsão de peixe, nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50% do volume de água para atingir a capacidade de campo do solo; e de alga, casca de camarão, concha de marisco e caroço de abacate moídos, nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% v/v, na germinação de microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, em casa de vegetação. Enquanto a emulsão e o hidrolisado de peixe reduziram a germinação de microconídios do patógeno, os demais resíduos não apresentaram efeito. Também foi avaliado o efeito de resíduos de alga, concha de marisco, casca de caranguejo e repolho triturado fresco, nas concentrações de 0, 1, 2 e 4% v/v, sobre a germinação de microconídios de *Fusarium circinatum* em condições controladas, e associado ou não, a *Trichoderma harzianum*, no controle da fusariose (*F. circinatum*) em plantas de *Pinus radiata* mantidas em casa de vegetação. Nenhum resíduo reduziu a germinação de microconídios de *F. circinatum* ou a doença em casa de vegetação. No terceiro estudo foi avaliado o efeito de hidrolisado de peixe nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20% do volume de água necessário para atingir a capacidade de campo, a partir do solo seco, associados ou não a *T. harzianum* (IbIf 006) e *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* no controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (raça 3) em tomateiro, em casa de vegetação. O hidrolisado de peixe e os agentes de biocontrole não controlaram a doença.

Palavras-chave: Alface, *Fusarium*, matéria orgânica, *Pinus*, supressividade, tomateiro.

EVALUATION OF ORGANIC RESIDUES TO MANAGEMENT OF FUSARIUM IN DIFFERENT PATHOSYSTEMS. Botucatu, 2016. 94f.

Thesis (Doctor in Agronomy/Plant Protection) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Author: CASSIANO FORNER

Adviser: Dr. Wagner Bettiol

2 SUMMARY

The organic residues and biocontrol agent might be alternative in the control of soilborne plant pathogens. This work aimed to study the control of *Fusarium* species with organic residues and biocontrol agents. First, the effect of fish hydrolyzed and fish emulsion was evaluated, at concentrations of 0, 10, 20, 30, 40 and 50% of volume of water required to reach the water retention capacity of the soil; and the seaweed, shrimp shells, clamshell and grounded avocado seeds at concentration of 0, 1, 2, 3, 4 and 5% v/v in the microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in greenhouse. Fish emulsion and fish hydrolyzed reduced the microconidia germination and none of the other residues presented effect. Also, it was evaluated the effect of seaweed, clamshell, crab shell and fresh triturated cabbage, at concentrations of 0, 1, 2 and 4% v/v, in the germination of *Fusarium circinatum* microconidia under controlled conditions and associated or not with *Trichoderma harzianum* in *Pinus radiata* to control the disease caused by *F. circinatum* in greenhouse. Neither residue reduced the *F. circinatum* microconidia germination or the disease in greenhouse. In the third study the effect of fish hydrolyzed was evaluated at concentration of 0, 5, 10, 15 and 20% of volume of water to required to reach the water retention capacity of the soil, from dry soil, associated or not with *T. harzianum* (Iblf 006) and *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* in the control of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (race 3) in tomato plants in the greenhouse. Neither residue or biocontrol agents controlled the disease.

Keywords: Lettuce, *Fusarium*, organic matter, *Pinus*, suppressiveness, tomato.

3 INTRODUÇÃO

Os fitopatógenos são responsáveis por grandes perdas na agricultura. O gênero *Fusarium* está entre os mais importantes, pois é de difícil manejo e destaca-se pela agressividade e sobrevivência por longos períodos nas áreas infestadas.

Diversos métodos alternativos de controle de fitopatógenos são empregados na agricultura a fim de reduzir ou racionalizar o uso de agrotóxicos e garantir o manejo de doenças de plantas com menor impacto na saúde humana e ambiental. Dentre estes métodos, destacam-se o uso de resíduos orgânicos com potencial de induzir a supressividade do solo aos patógenos habitantes do solo e agentes de biocontrole.

Resíduos orgânicos são utilizados na agricultura desde épocas remotas para aumentar a fertilidade dos solos, mas também colaboram como destino final de resíduo da agropecuária, da indústria e urbanos. Estes resíduos podem alterar as características físicas, químicas e biológicas dos solos, fornecendo nutrientes e estimulando a vida do solo, com consequente geração de compostos que podem controlar fitopatógenos.

Os agentes de biocontrole estão presentes em muitos solos, exercendo um controle biológico natural nesse ambiente. Entretanto, diversos deles são explorados comercialmente como *Trichoderma* e *Bacillus*. Estes agentes de biocontrole podem agir por parasitismo, competição, predação, antibiose, indução de resistência e promoção de crescimento das plantas.

Considerando as diversas possibilidades de controle de fitopatógenos e a necessidade de desenvolver práticas de controle alternativas, o estudo objetivou: 1) avaliar o efeito de hidrolisado de peixe, emulsão de peixe, concha de marisco, casca de camarão, alga e caroço de abacate moídos na inibição da germinação de

microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* no solo; 2) avaliar o efeito de alga, concha de marisco, casca de caranguejo e repolho fresco triturado sobre a inibição da germinação de microconídios de *Fusarium circinatum*, além da associação ou não com *Trichoderma harzianum*, no controle da doença causada por *F. circinatum* em mudas de pinus; e 3) avaliar o potencial de hidrolisado de peixe, associado ou não a *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*, no controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (raça 3) em tomateiro.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Vários resíduos orgânicos incorporados ao solo apresentam capacidade de suprimirem fitopatógenos, aumentando a funcionalidade destes resíduos na agricultura. A aplicação de emulsão de peixe ao solo controlou *R. solani* e *Pythium aphanidermatum* em rabanete e pepino, sendo esse efeito relacionado com o estímulo da atividade microbiana no substrato e solo (ABBASI, CONN e LAZAROVITS, 2004). Nas concentrações de 0,5 e 1% p/p, a emulsão de peixe também reduziu a murcha de *Verticillium* em berinjela e a sarna da batata, em alguns dos solos testados (ABBASI, CONN e LAZAROVITS, 2006).

Abbasi, Lazarovits e Jabaji-Hare (2009) atribuíram a supressão de microescleródios de *V. dahliae* aos ácidos graxos voláteis presentes na emulsão de peixe, como ácidos glicólico, acético, fórmico, *n*-butírico e propiônico. A ação foi maior em solo com pH mais ácido. A ação tóxica da emulsão de peixe depende do solo ou substrato, pois foi maior em solos orgânicos e franco-arenosos, mas não em turfa (ABBASI, LAZAROVITS e JABAJI-HARE, 2009). É importante salientar que a emulsão de peixe não exerceu efeito residual (de um ano de cultivo para o outro) no controle de sarna da batata (ABBASI, CONN e LAZAROVITS, 2006).

Outro produto obtido da fermentação de resíduos de peixe, o hidrolisado de peixe também apresenta potencial para induzir a supressividade a fitopatógenos, conforme demonstrado para *Cylindrocladium spathiphylli* e *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* (PINTO, BETTIOL e MORANDI, 2010; VISCONTI, BETTIOL e MORANDI, 2010).

Dentre os resíduos orgânicos de origem sólida, a casca de camarão na concentração de 4% suprimiu a doença causada por *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* através das alterações químicas e biológicas no substrato (PINTO, BETTIOL e MORANDI, 2010). Este resíduo também reduziu a doença causada por *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi* em gengibre, possivelmente devido ao estímulo de actinobactérias, por ação da quitina presente na casca de camarão (GHINI, DOMINGUES e BETTIOL, 2006). *B. subtilis* (NPU 001), isolado do solo, quando cultivado em meio contendo casca de camarão e caranguejo, libera quitinase que antagoniza *F. oxysporum* (CHANG, CHEN e WANG, 2010). A quitina extraída de casca de camarão/caranguejo não reduziu a severidade da doença causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* em pepino, mas houve maior crescimento de planta na ausência do patógeno (ROSE, PARKER e PUNJA, 2003). Porém, a casca de camarão pode ocasionar fitotoxicidade em plantas, dependendo da concentração incorporada ao solo. A concentração de 5% de casca de camarão ao solo causou a morte das plantas de crisântemo, relacionado a alta concentração de nitrato no substrato (PINTO, BETTIOL e MORANDI, 2010). Em gengibre, a concentração de 20% v/v reduziu o desenvolvimento da planta comparado à concentração de 15% (GHINI, DOMINGUES e BETTIOL, 2006).

Outros resíduos orgânicos sólidos podem ser utilizados na agricultura para o controle de doenças de plantas. Benchimol, Sutton e Dias-Filho (2006) verificaram que a mortalidade de mudas de pimenteira-do-reino por *F. solani* f. sp. *piperis* foi reduzida em 20% com a adição de 1% de casca de caranguejo ao solo. Visconti (2011) verificou que com 6% de pó de concha de marisco, incorporada ao substrato ocorreu redução da doença causada por *R. solanacearum* em tomateiro, possivelmente associada ao nitrogênio presente no resíduo e a elevação do pH do substrato.

No caso de algas, alguns autores não demonstraram efeitos diretos sobre a germinação do patógeno. Paulert et al. (2009) e Gonçalves e Stadnik (2012), estudando o efeito de extratos solúveis e insolúveis em metanol e solução aquosa de ulvana (*Ulva fasciata*) na germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, não verificaram efeito direto desses extratos.

A adição ao solo de pó de algas *Stokeyia variabile*, *Spatoglossum variabile* e *Melanothamnus afaqhusainii*, duas semanas antes da semeadura de berinjela ou melancia, apresentaram resultados inconsistentes no controle de *R. solani*, *F. solani* e *F. oxysporum* (BALOCH et al., 2013). Resultados similares foram obtidos com a adição de

M. afaqhusainii, *S. variabile* e *Halimeda tuna* sobre *Macrophomina phaseolina*, *R. solani*, *F. solani* e *Meloidogyne javanica* em tomateiro e girassol (SULTANA et al., 2011). No entanto, *S. variabile* e *M. afaqhusainii* reduziram o ataque de *M. phaseolina* e nematoides de galha (BALOCH et al., 2013). O tratamento por irrigação das raízes, pulverização foliar ou ambos, em pepinos com extrato comercial da alga (*Ascophyllum nodosum*) nas concentrações de 0,5 e 1%, induziu resistência contra *Alternaria cucumerinum*, *Didymella applanata*, *Botrytis cinerea* e *F. oxysporum*, através do aumento da atividade das enzimas quitinase, glucanase, peroxidase, polifenol oxidase, fenilalanina amônia liase e lipoxigenase nas folhas (JAYARAMAN, NORRIE e PUNJA, 2011).

As brássicas podem ser eficientes no controle de fitopatógenos, pois isotiocianatos produzidos durante a sua decomposição, apresentam ação fungistática ao crescimento micelial de *F. oxysporum* patogênicos de coníferas. A ação pode estar relacionada com a concentração aplicada e o isolado do patógeno (SMOLINSKA et al., 2003). Diversas brássicas reduziram o crescimento micelial de *R. solani*, *Phytophthora erythroseptica*, *P. ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sambucinum* e *F. oxysporum*. Em especial a *Brassica juncea* reduziu em grandes proporções os patógenos do gênero *Fusarium* (LARKIN e GRIFFIN, 2007).

A formação de conídios de *F. oxysporum* não foi afetada por isotiocianatos, porém a germinação de conídios e clamidósporos foi suscetível, principalmente a propenil, etílico, benzílico e feniletil que inibiram totalmente a germinação (SMOLINSKA et al., 2003). A incorporação de *B. juncea* no solo e cobertura com filme plástico, reduziu a Murcha de Fusarium em espinafre (*F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*), sendo o controle relacionado com o acúmulo de ácido graxos voláteis e a mudança da comunidade microbiana (MOWLICK et al., 2013). Em casa de vegetação, as brássicas (nabo, mostarda indiana, colza, canola, rabanete e mostarda amarela) reduziram o inóculo de *R. solani*, e rabanete, colza e mostarda indiana reduziram a severidade e a incidência da doença em mudas de batata (LARKIN e GRIFFIN, 2007). No campo, diferentes brássicas, em rotação seguida da incorporação, proporcionaram controle de doenças em tubérculos de batatas. A mostarda indiana reduziu a incidência e a severidade da sarna pulverulenta (*Spongospora subterranea*), enquanto que canola, colza e mostarda amarela reduziram a presença de escleródios de *R. solani* em tubérculos de batata (LARKIN e GRIFFIN, 2007).

4.1 Agentes de controle biológico

4.1.1 *Trichoderma* sp.

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos de vida livre do solo, que podem ser simbiotes oportunistas de plantas. Algumas espécies podem induzir de resistência e promover o crescimento em plantas, ou antagonizar patógenos por parasitismo e antibiose (HARMAN et al., 2004). Comercialmente, no Brasil, até o momento, existem seis produtos biológicos à base de *Trichoderma* spp. registrados para utilização na agricultura, sendo dois de *Trichoderma asperellum*, três de *Trichoderma harzianum* e um de *Trichoderma stromaticum* (BRASIL, 2016).

Diversos exemplos são encontrados na literatura mostrando o sucesso de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. Os isolados de *T. harzianum* (CEN287 e CEN316), utilizados em ensaios no campo, reduziram o número de apotécios de *S. sclerotiorum* na área e a severidade de mofo branco em feijoeiro (CARVALHO et al., 2015b). Também em feijoeiro no campo, os mesmos isolados reduziram a incidência e a severidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (CARVALHO et al., 2015a). Por sua vez, o *T. harzianum* (T22) reduziu a severidade da doença causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em alface, em substrato sob condição úmida (-0,03 MPa) e seca (-0,5 MPa) (INNOCENTI, ROBERTI E PIATTONI, 2015). Dezenove isolados de *Trichoderma* spp. induziram resistência em pepino contra *C. lagenarium* (SILVA et al., 2011). O *T. asperellum*, por meio do tratamento de sementes, protegeu plântulas de tomate contra o tombamento de pré e pós emergência causado por *P. aphanidermatum* (KIPNGENO et al., 2015).

Algumas espécies de *Trichoderma* podem ser endofíticos, como *Trichoderma atroviride* (77) ou *Trichoderma koningiopsis* (26 e 36), isolados de diferentes plantas do bioma da Caatinga, os quais reduziram a severidade de *Fusarium guttiforme* em plântulas de abacaxi, em ensaios a campo (SOUZA, TROCOLI e MONTEIRO, 2016).

Outro mecanismo de ação de espécies de *Trichoderma* é a produção de enzimas degradadoras da parede celular de fitopatógenos, como verificado para o isolado CCTCC-RW0014 de *T. asperellum*, na redução de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* em pepino. O CCTCC-RW0014 tem grande atividade de quitinase, protease, celulase e β -(1-3) glucanase, além de produzir compostos que podem diminuir a expressão

da proteína Snt2 de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, responsável pelo crescimento e patogenicidade (SARAVANAKUMAR et al., 2016). Similarmente, *T. harzianum* (Tr9) produz as enzimas exoquitinase e β -(1-3) glucanase. Este isolado reduziu a mortalidade de plantas de *Amorphophallus paeonifolius* causada por *Sclerotium rolfsii* (JOHN et al., 2015).

Além de controlar patógenos, espécies de *Trichoderma* podem promover o crescimento de plantas (SILVA et al., 2011; INNOCENTI, ROBERTI E PIATTONI, 2015; SARAVANAKUMAR et al., 2016). Li et al. (2015) demonstraram que o *T. harzianum* (SQR-T037) solubiliza fitato, Fe₂O₃, CuO e Zn *in vitro*, aumentando a absorção de nutrientes e a biomassa em tomateiro. No entanto, em condições de deficiência de fósforo (fitato), o SQR-T037, compete com o tomateiro e reduz o crescimento da planta.

4.1.2 *Bacillus* sp.

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias não patogênicas e formadoras de endósporos que apresentam diversos mecanismos de ação no controle de doenças de plantas, tal como antibiose, competição e a indução de resistência de plantas (CAWOY et al., 2011). No Brasil, há dois produtos à base de *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* para o controle de doenças de plantas (BRASIL, 2016).

O tratamento de sementes com *B. subtilis* (BS 01) protegeu plântulas de tomate contra o tombamento de pré e pós emergência causado por *P. aphanidermatum* (KIPNGENO et al., 2015). *Bacillus amyloliquefaciens* (W2) reduziu a incidência e a severidade de *F. oxysporum* em açafrão (GUPTA e VAKHLU, 2015). A aplicação de *B. subtilis* (RC 218), associado ou não a *Brevibacillus* sp. (RC263), no estágio de antese do trigo, reduziu em um ano de cultivo a incidência e em dois anos a severidade da doença causada por *Fusarium graminearum*. Os agentes de biocontrole também reduziram o acúmulo da microtoxina desoxinivalenol no trigo (PALAZZINI et al., 2016).

Baysal, Çaliskan e Yesilova (2008) e Grover et al. (2010) demonstraram que diversos isolados de *B. subtilis* produzem iturina, fengicina, surfactina e bacilomicina os quais possuem ação contra diversos fitopatógenos. De forma similar, a iturina A (iturina) e plipastatina A (fengicina) produzidas por *B. amyloliquefaciens* (S76-3) inibem a germinação de conídios e o crescimento de hifas de *F. graminearum* (GONG et al., 2015). Já o *B. subtilis* subsp. *subtilis* apresentou especificidade na antibiose contra

Setophoma terrestris in vitro. A produção de compostos antifúngicos é estimulada pela presença do patógeno, já que a suspensão livre de células do antagonista crescida com ausência do patógeno, não inibiu *S. terrestris* (ORIO, BRÜCHER e DUCASSE, 2016).

O isolado de *Bacillus* sp. (DFs1414) reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro, sob condições de casa de vegetação. Os compostos voláteis produzidos pelo antagonista reduziram o crescimento micelial do patógeno *in vitro*, porém não foi descartada a indução de resistência no tomateiro como o mecanismo de ação (ROCHA E MOURA, 2013). A indução de resistência é frequentemente observada por agentes microbianos do gênero *Bacillus*. Akram, Anjum e Ali (2015) observaram que o éster metílico, do ácido ftálico, produzido e liberado por *B. subtilis* (IAGS174), induz resistência de tomateiro a *F. oxysporum* s. sp. *lycopersici*.

Bacillus sp. também promovem o crescimento de plantas (SWAIN e RAY, 2009; YU et al., 2010; KIPNGENO et al., 2015).

4.2 Patossistemas

4.2.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*

A murcha de Fusarium da alface, causada por *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, ocorre tanto em viveiros de mudas como em campo (KOBORI, BRUNELLI E GIORIA, 2011). O patógeno foi separado em grupos, pelos diferentes cultivares de alface que atacam. O grupo 1, ataca severamente cultivares de alface crespa e roxa, enquanto ataca levemente lisa e “Green leaf”. O grupo 2 ataca severamente cultivares do tipo lisa, mas levemente os tipos crespa e “leaf”. Por sua vez, o grupo 3 causam sintomas leve a moderados na maioria das cultivares (YAMAUCHI, HORIUCHI E SATOU, 2001). Fujinaga et al. (2003) afirmaram que as raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* correspondem aos grupos 3, 1 e 2, respectivamente.

A murcha de Fusarium foi relatada em vários países: Itália, Irã, Japão, Taiwan, Portugal, Estados Unidos da América e Brasil (SCOTT et al., 2012). As três raças foram identificadas no Japão, enquanto nos Estados Unidos da América e na Itália, apenas a raça 1 foi identificada (FUJINAGA et al., 2005). No Brasil, a murcha de Fusarium foi relatada no ano de 2000 (VENTURA e COSTA, 2008) em vários estados

brasileiros (LOPES, QUEZADO-DUVAL e REIS, 2010). Brunelli et al. (2010) identificaram apenas a raça 1 do patógeno na região sul e sudeste, com diferentes níveis de agressividade, podendo ser a única raça presente no país, ou pelo menos, a prevalecente.

A doença causa redução no crescimento da planta, escurecimento dos vasos do xilema e amarelecimento e murcha foliar (LOPES, QUEZADO-DUVAL e REIS, 2010). Quando a planta morre, o patógeno produz clamidósporos dentro do tecido doente, que incorporados ao solo permanecem viáveis por mais de um ano (SCOTT et al., 2012).

A época de sementeira, relacionada com a temperatura do solo, e o estágio de desenvolvimento da cultura são importantes na ocorrência da murcha de *Fusarium* (MATHERON et al., 2005). Temperaturas altas favorecem o desenvolvimento da doença em cultivares de alfaces altamente suscetíveis ao patógeno, porém, não em cultivares resistentes (SCOTT et al., 2010). Assim, as perdas por murcha de *Fusarium* podem ser reduzidas evitando o cultivo de cultivares suscetíveis em períodos quentes do ano (SCOTT et al., 2012).

A disseminação de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* ocorre via sementes, provavelmente como um contaminante externo. A desinfestação das sementes com hipoclorito de sódio reduz sua disseminação (GARIBALDI, GILARDI e GULLINO, 2004). O tratamento de sementes, artificialmente inoculadas, com dichlofluanid, mancozeb, prochloraz, carbendazim e azoxystrobin reduziu a porcentagem de plantas de alface doentes (GILARDI et al., 2005).

Algumas variedades de alface apresentam resistência contra *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, como Costa Rica No. 4, River Green, Salinas e Salinas 88 (MCCREIGHT et al., 2005). No Brasil, todas as cultivares apresentaram sintomas da doença causada por *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1, mas algumas destacaram-se, como a Roxa 01, pela baixa severidade a vários isolados do patógeno (CABRAL E REIS, 2013).

Em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, mantido em pousio por 6 e 12 meses, a densidade do inóculo reduziu em 71% e 86%, respectivamente. Após 34 meses, foi recuperado apenas 0,5% das unidades formadoras de colônias da população inicial. Isso indica que aproximadamente um ano sem o cultivo de culturas suscetíveis, há uma significativa redução do inóculo (SCOTT et al., 2012).

4.2.2 *Fusarium circinatum* x *Pinus radiata*

O cancro resinoso do pinus, causado por *Fusarium circinatum*, foi relatado pela primeira vez nos Estados Unidos da América em 1945 (HEPTING e ROTH, 1946). Atualmente, a doença é encontrada em várias partes do mundo (GORDON, 2006). Especificamente na América do Sul, *F. circinatum* foi identificado no Chile em *Pinus radiata* (WINGFIELD et al., 2002), ainda que a ocorrência seja restrita a viveiros (JACOBS et al., 2007), sintomas da doença são encontrados em *Pinus* spp. em cultivos comerciais, porém a doença não está estabelecida. Estas ocorrências provavelmente são originárias de plantas infectadas provenientes de viveiros. No entanto, o risco do estabelecimento é intensificado pela predominância do cultivo de *P. radiata*, altamente suscetível ao patógeno (WINGFIELD et al., 2008).

O patógeno também foi encontrado em viveiros de mudas de *Pinus taeda* no Uruguai (ALONSO e BETTUCCI, 2009). Na Colômbia o patógeno foi isolado tanto de viveiro de mudas, como em árvores em plantações de até 11 anos de idade (STEENKAMP et al., 2012). Recentemente, foi relatado no Brasil, ocasionando doença em viveiro com plantas de *Pinus patula*, no estado de Santa Catarina (PFENNING et al., 2014).

Especula-se que a ausência de insetos vetores específicos associados ao patógeno e fatores ambientais desfavoráveis ao estabelecimento da doença são responsáveis pelo patógeno não se estabelecer em cultivos comerciais no Chile (WINGFIELD et al., 2008). Na África do Sul, *F. circinatum* permaneceu restrito em viveiros por aproximadamente 15 anos, até causar doença em plantações de *P. radiata*. A ocorrência está associada às condições climáticas favoráveis, a associação do patógeno com a infestação do gorgulho *Pissodes nemorensis*, além da prática de poda causar ferimentos e favorecer o desenvolvimento da doença (COUTINHO et al., 2007).

Os sintomas causados por *F. circinatum* em viveiros são a podridão radicular, do colo e da parte aérea, podridão da ponteira e morte da planta (FOURIE et al., 2014). Em plantas adultas, os sintomas caracterizam-se principalmente pela clorose das acículas próximo ao sítio de infecção e consequente morte de ramos (anelamento do ramo). Podem ocorrer repetidas infecções que causam extensos danos à copa do hospedeiro. Grandes infecções ocupam uma parte do ramo ou tronco, acarretando em intensa produção

de resina. Lesões próximas ao nível do solo podem anelar o tronco e causar clorose em todas as acículas em plantas jovens (GORDON, STORER E WOOD, 2001).

Plântulas de *P. radiata* inoculadas com *F. circinatum* aumentam a quantidade de resina exsudada. As plântulas que exsudaram moderada ou elevada quantidade de resina em 21 dias após a inoculação do patógeno, morreram 56 dias após a inoculação. A produção de resina favorece a infecção de *F. circinatum*, pois, este tolera a resina e utiliza os dutos de resina para colonização vertical em novas zonas (MARTÍN-RODRIGUES et al., 2013).

O crescimento de *F. circinatum* apresenta três fases, primeiro, ocorre aumento da biomassa até sete dias após a inoculação, a qual coincide com a colonização do córtex e floema. Entre 7-21 dias a biomassa continua aumentando, mas lentamente, ocorre a colonização do xilema e floema, com produção de conidióforo no floema. O menor crescimento do fungo neste período deve-se a mudança morfológica de micélio vegetativo para conidiogênese, o que requer grande quantidade de energia. A produção de conídios na cavidade medular dispersa o patógeno para áreas abaixo e longe do sítio de infecção. A colonização na medula, em locais acima do ponto de inoculação, parece estar associada a colonização do xilema. Após 21 dias o crescimento estabiliza, surgem os sintomas de clorose, murcha das acículas e dessecação da ponta da plântula (MARTÍN-RODRIGUES et al., 2013). O patógeno avança via radial, em direção à medula e tangencial, através do floema e córtex. A colonização do córtex e medula dá-se pelos espaços intercelulares e provavelmente o fungo libera enzimas degradadoras da parede celular no apoplasto, liberando nutrientes nos tecidos da planta (MARTÍN-RODRIGUES et al., 2013).

Trabalhos com resistência ao patógeno estão sendo realizados. De cinco famílias de pinheiros inoculadas com dois isolados de *F. circinatum*, na Colômbia, os acessos de *P. maximinoi* (PM1564CA e PM1517CA) e *P. tecunumanii* (PTECSUIZ) originados de áreas de baixa altitude apresentaram lesões menores (STEENKAMP et al., 2012).

4.2.3 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* x tomateiro

A murcha do tomateiro, causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) é uma das doenças mais destrutivas do tomateiro, eventualmente pode destruir

campos inteiros antes da colheita (AGRIOS, 2005). O patógeno está presente nos principais centros produtores de tomate do mundo (REIS et al., 2005).

A ocorrência da raça 3 de *Fol* foi observada na Austrália em 1978 (GRATTIDGE e O'BRIEN, 1982). No Brasil, foi identificada pela primeira vez em 2005 em campos produtores de Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo (REIS et al., 2005). No ano seguinte foi relatada nas cidades de São José de Ubá e Itaocara (Rio de Janeiro). A ocorrência quase simultânea dessa raça em regiões geográficas isoladas pode ser devido a lotes de sementes contaminadas (REIS e BOITEUX, 2007).

Marlatt et al. (1996) identificaram diferenças de grupos de compatibilidade entre isolados de *Fol* raça 3 (VCG 0030 e 0033) de diferentes regiões dos Estados Unidos da América. Estes dois grupos apresentaram duas populações geneticamente distintas, sugerindo duas linhas de evolução. Cai et al. (2003), utilizando métodos moleculares, sugerem que a raça 3 de *Fol* presente na Califórnia, é originária de uma população local de *Fol* raça 2.

Os genes de avirulência do *Fol* (*AVR1*, 2 e 3) e de resistência do tomateiro (*I*, *I2* e *I3*) são responsáveis pela compatibilidade do patógeno e hospedeiro (INAMI et al., 2012). Houterman et al. (2009) apresentam um esquema evolucionário da raça 3 de *Fol*, no qual a raça 1 perdeu gene *AVR1* e originou a raça 2. A raça 3 emergiu da mutação na raça 2 em *AVR2* (*avr2*). Uma evolução alternativa para o isolado KoChi-1, obtido no Japão, que possui em seu cromossomo: *avg1*, *avg2* e *AVG3*, foi apresentado por Inami et al. (2012), em que a raça 1 do patógeno sofreu uma inserção no transposon dentro de *AVR1*, emergindo a raça 2. A raça 3 (KoChi-1) originou da mutação de *AVR2*

Os sintomas da murcha de Fusarium em plantas jovens são a paralisação do crescimento, desfolha das folhas velhas e algumas tornam-se amareladas, também ocorre o escurecimento do tecido vascular (CSIZINSZKY et al., 2005). Após os primeiros sintomas, normalmente as mudas murcham e morrem (AGRIOS, 2005). Em plantas adultas, predomina o amarelecimento das folhas velhas, ocorre à progressão do amarelecimento foliar, murcha da planta, principalmente nos períodos quentes do dia (GRATTIDGE e O'BRIEN, 1982; CSIZINSZKY et al., 2005), desfolha e necrose marginal das folhas (AGRIOS, 2005) e eventualmente a planta morre. O sistema vascular sofre escurecimento (GRATTIDGE e O'BRIEN, 1982; AGRIOS, 2005; CSIZINSZKY et al., 2005).

O patógeno penetra as raízes diretamente através dos pelos absorventes ou por ferimentos, assim colonizando o sistema vascular da planta (KUROZAWA e PAVAN, 2005). O patógeno pode permanecer por vários anos no solo. A temperatura ideal de crescimento é de 28 °C. A disseminação ocorre via sementes, estacas, solo, mudas infectadas (CSIZINSZKY et al., 2005), vento, água, implementos agrícolas e tratos culturais (KUROZAWA e PAVAN, 2005).

No controle podem ser utilizadas cultivares resistentes, rotação de cultura de 5 a 7 anos (CSIZINSZKY et al., 2005), tratamento de sementes e plantio em áreas com ausência do patógeno (KUROZAWA e PAVAN, 2005).

O esterco de galinha peletizado reduziu a severidade da doença (*Fol* raça 2). Maior efeito ocorreu com o resíduo na concentração de 1% v/v e incubado a 35 °C. O esterco de galinha peletizado e a compostagem de bagaço de azeitona reduziram a população do patógeno no solo (BORREGO-BENJUMEA et al., 2014). Cinco diferentes compostos, sendo dois comerciais (Plant-mix e Ferticompost) e os compostos de esterco ovelha, vaca e frango, em mistura com turfa na proporção de 1:4, reduziram a murcha de *Fusarium* em tomateiro (TAGHDI et al., 2015). *Fusarium solani* (305) e *Streptomyces* sp. (A19), isolados da rizosfera de plantas saudáveis de tomate crescidas em composto de resíduos de uva e cortiça, reduziram a área abaixo da curva do progresso da doença, causado por *Fol* raça 2, em substrato de fibra de coco (conducente ao patógeno). Em substrato de composto de cortiça (moderadamente supressivo), *Streptomyces* sp. (A19) aumentou a supressividade a *Fol* raça 2. Em composto de resíduo de uvas (altamente supressivo) não houve diferença no controle (CASTAÑO et al., 2013). *Trichoderma asperellum* (CT9), isolado de composto de esterco de frango, e *Trichoderma virens* (ST11), isolado do solo, reduziram a murcha de *Fusarium* (TAGHDI et al., 2015).

CAPÍTULO 1

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE MATERIAIS ORGÂNICOS SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*

Este capítulo foi redigido em formato de artigo de acordo com as normas da revista
Tropical Plant Pathology

1 **Efeito da incorporação de materiais orgânicos sobre a germinação de conídios de**

2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*

3 **Cassiano Forner^{1*}; Dalton Dorighello^{1**}; Wagner Bettiol²**

4
5 ¹Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
6 Filho” (UNESP), Câmpus Botucatu, CEP 18.610-307 - Botucatu, SP, Brasil. *Bolsista
7 CNPq e **Bolsista CAPES.

8 ²Embrapa Meio Ambiente, CP 69, CEP 13.820-000 Jaguariúna, SP, Brasil. Bolsista do
9 CNPq.

10
11 Autor para correspondência: Cassiano Forner, e-mail: forner687@hotmail.com

12
13 **Resumo**

14 A murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*) causa prejuízos consideráveis
15 aos produtores de alface. A incorporação de resíduos orgânicos é uma alternativa para a
16 adequada disposição dos resíduos agrícolas e urbanos, podendo também colaborar na
17 fertilidade e na indução de supressividade a patógenos habitantes do solo. O estudo
18 objetivou avaliar o efeito de hidrolisado de peixe, emulsão de peixe, alga, concha de
19 marisco, casca de camarão e caroço de abacate, incorporados em substrato, sobre a
20 germinação de microconídios de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (*Fola*). Para isto, suportes
21 foram construídos com buchas e luvas de redução hidráulica, nos quais foram depositadas
22 duas membranas de ester de celulose, contendo uma suspensão de microconídios de *Fola*.
23 Os suportes foram enterrados na mistura de substrato e resíduos orgânicos duas horas e
24 sete dias após a incorporação dos resíduos orgânicos. Os suportes permaneceram por 24
25 horas enterrados, quando foram removidos e as membranas retiradas, dispostas sobre

26 lâminas de vidro e os microconídios fixados em meio de cultura ágar-água. A germinação
27 dos microconídios foi paralisada com azul de lactofenol, seguida da determinação da
28 porcentagem de microconídios germinados. Duas horas após a incorporação desses
29 resíduos ao substrato foi observado que tanto o hidrolisado, como a emulsão de peixe
30 reduziram a germinação de microconídios. Alga, casca de camarão, concha de marisco e
31 caroço de abacate não inibiram a germinação dos microconídios de *Fola*.

32 **Palavras chave:** Alface, murcha de Fusarium, supressividade.

33

34 **Effect of organic matter incorporated in container media on the conidia germination**
35 **of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae***

36 **Abstract**

37 Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (*Fola*), may causes
38 serious losses to growers of lettuce. The incorporation of organic residues to induce
39 suppressiveness is an alternative control with a sustainable disposal of rural and urban
40 residues. This study aimed to evaluate the potential of fish hydrolyzed, fish emulsion,
41 shrimp peel, seaweed, mussel shell and grounded avocado seed to induce
42 suppressiveness against *Fola* in container media. For this, supports were built with
43 hydraulic pieces. Into the supports were deposited two cellulose ester membranes,
44 containing a *Fola* microconida suspension. Two hours and seven days after
45 incorporation of organic residue, the supports were buried in a mixture of substrate and
46 organic residues. The supports remained buried for 24 hours, then it was removed, the
47 membranes were arranged on glass slides and the microconidia were fixed in agar-water
48 media. The germination of microconidia was paralyzed with lactophenol blue, followed
49 by determining the percentage of microconidia germinated. The fish hydrolyzed and
50 fish emulsion inhibited microconidia germination after 2 h of incorporation in the

51 substrate. We concluded that fish emulsion and fish hydrolyzes induced suppressiveness
52 in the substrate to this soilborne fungi. Seaweed, mussel shell, shrimp peel and avocado
53 seed did not inhibit microconidia germination.

54 **Keywords:** Fusarium wilt, lettuce, suppressiveness.

55

56 **INTRODUÇÃO**

57 A alface é uma das principais hortaliças consumidas no mundo (Henz & Suinaga, 2009;
58 Kobori et al., 2011). No Brasil, é a hortaliça folhosa mais popular (Lopes et al., 2010), com
59 estimativa de 35 mil hectares cultivados e uma produção de 290.000 toneladas (Kobori et
60 al., 2011). A murcha de Fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (*Fola*)
61 causa perdas no Brasil e no mundo (Lopes et al., 2010), ocorrendo desde viveiros de
62 produção de mudas até no campo (Kobori et al., 2011).

63 O patógeno é encontrado na Itália, Japão, Irã, Taiwan, Portugal, Estados Unidos da
64 América e Brasil (Scott et al., 2012), entre outros. Três raças de *Fola* foram catalogadas
65 (Fujinaga et al., 2003). No Japão, estão presentes as três raças (1, 2 e 3), enquanto nos
66 Estados Unidos da América e na Itália, apenas a raça 1 é encontrada (Fujinaga et al., 2005).
67 No Brasil, *Fola* foi relatada no ano de 2000 (Ventura & Costa, 2008), porém até o
68 momento, apenas a raça 1 foi identificada (Brunelli et al., 2010).

69 O patógeno causa redução no crescimento, escurecimento dos vasos do xilema e
70 amarelecimento e murcha foliar (Lopes et al., 2010). *Fola* pode produzir clamidósporos
71 dentro do tecido doente da planta, que, incorporados ao solo, podem sobreviver por anos
72 (Scott et al., 2012).

73 A severidade da doença é influenciada pela densidade do inóculo, condições ambientais e
74 cultivares de alface. Scott et al. (2012) discutem o manejo da murcha de Fusarium,
75 incluindo rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes nos períodos mais quentes.

76 Agricultores utilizam há séculos materiais orgânicos para manter ou aumentar a fertilidade
77 do solo. O uso de materiais orgânicos na agricultura é também uma alternativa para o
78 aproveitamento de resíduos rurais e urbanos, aumentando a fertilidade do solo e
79 melhorando as características físicas, químicas e biológicas. Esses efeitos podem colaborar
80 no manejo de fitopatógenos habitantes do solo. Estratégias para o manejo da murcha de
81 *Fusarium* da alface, que minimizem as perdas causadas pela doença, necessitam ser
82 investigadas. Dessa forma, considerando os efeitos da incorporação de resíduos orgânicos
83 há necessidade de estudar quais materiais orgânicos possuem a capacidade de induzir a
84 supressividade do solo a *Fola* para se tornar uma alternativa viável ao seu controle.

85 Materiais orgânicos incorporados no solo ou substratos podem suprimir patógenos
86 diretamente devido a presença de compostos (ácido húmico, ácidos graxos voláteis, ácido
87 nitroso e amônia, entre outros) e indiretamente pelo estímulo de microrganismos residentes
88 com atividades antagonistas (Borrero et al., 2006; Conn & Lazarovits, 1999; Du et al.,
89 2015; Gravel et al., 2015; Hoitink & Boehm, 1999; Postma et al., 2008; Postma &
90 Schilder, 2015; Tenuta et al., 2002; Tenuta & Lazarovits, 2002). Resíduos marinhos são
91 descritos como indutores de supressividade para patógenos de plantas, embora com efeitos
92 variáveis, dependendo do tipo de resíduo, concentração e modo de aplicação (Bailey &
93 Lazarovits, 2003).

94 A supressividade do solo induzida por materiais orgânicos foi verificada com o uso de
95 emulsão de peixe no controle de *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium*
96 *ultimum*, *Streptomyces scabie* e *Verticillium dahliae* em rabanete, pepino, berinjela e
97 batata, respectivamente, por Abbasi et al. (2004, 2006, 2009); de hidrolisado de peixe para
98 controle de *Cylindrocladium spathiphyllii* em espatifílio (Visconti et al., 2010); de casca de
99 camarão moído para o controle de *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi* em gengibre (Ghini et al.,
100 2006); *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo (Pinto et al., 2010); de concha de

101 marisco no controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro (Visconti, 2011) e de alga
102 (*Ulva radiata*) para controle de *Alternaria porri* em cebolinha (Araújo et al., 2012), entre
103 outros.

104 Um dos possíveis mecanismos de ação da incorporação de fontes de matéria orgânica ao
105 solo para controlar fitopatógenos é a inibição da germinação de esporos. Assim, este
106 estudo objetivou avaliar o potencial do hidrolisado e emulsão de peixe, casca de camarão,
107 alga, concha de marisco e sementes de abacate incorporadas no solo para inibir a
108 germinação de microconídios de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*.

109

110 MATERIAL E MÉTODOS

111 O isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* Fola 281 (Sakata Seeds Sudamerica SA) foi
112 crescido em meio BDA (Batata, dextrose e ágar), com adição de sulfato de estreptomicina
113 (1000 mg L⁻¹) e eritromicina (100 mg L⁻¹), por cinco dias à 25 ± 1 °C. Transcorrido esse
114 período foi acrescentada água esterilizada ao meio, sendo em seguida filtrada em gaze para
115 obter uma suspensão de microconídios que foi ajustada para 2 x 10⁵ microconídios mL⁻¹.

116 O hidrolisado de Peixe (HP) foi fornecido por FishFértil Active[®] Fish Fertilizantes Ltda.,
117 Estiva Gerbi – SP e a emulsão de Peixe (EP), por JK Fertilizantes, Paulínia – SP. A alga –
118 *Sargassum* sp. (AL), casca de camarão (CC) e concha de mariscos (CM) foram coletados
119 no litoral do estado de Santa Catarina (Balneário Camboriú e Penha), secos em estufa de ar
120 forçado a 40 °C, triturados, moídos e separados em peneira de 60 Mesh (0,25 mm). O
121 caroço de abacate (CA), coletado em São Sebastião do Paraíso (São Paulo), foi seco,
122 triturado, moído e passado por um peneira de 60 Mesh. Os atributos químicos dos
123 materiais são apresentados na Tabela 1.

124 Uma suspensão de 150 µL de *Fola* foi dispensada entre as duas membranas de ester de
125 celulose (Millipore 0,22 µm de poro) de 25 mm de diâmetro e fixadas em um suporte de

126 anel de PVC. Os suportes foram preparados com luvas hidráulicas de ¾” de diâmetro e
127 buchas de redução hidráulicas. Dentro de cada suporte foram acomodados
128 sequencialmente: um anel de borracha de vedação, as membranas de Millipore contendo a
129 suspensão de *Fola* e novamente um anel de borracha de vedação. Em seguida os suportes
130 foram rosqueados para utilização (Figura 1).

131 Uma mistura (3:1) de solo (latossolo) + substrato à base de casca de pinus foi depositada
132 em vasos plásticos de 850 mL de volume. A essa mistura foram incorporados HP e EP nas
133 concentrações de 0 (Testemunha), 10, 20, 30, 40 e 50% do volume de água para atingir a
134 capacidade de campo a partir da mistura solo+substrato completamente seca. Os resíduos
135 foram dispensados na superfície da mistura solo + substrato e o percolado foi coletado e
136 novamente dispensado na mistura por duas vezes. A mesma metodologia foi utilizada para
137 AL, CC, CM e CA, porém a incorporação foi nas concentrações de 0 (Testemunha), 1, 2,
138 3, 4 e 5% (v/v) para cada material orgânico. Para esses materiais orgânicos, a incorporação
139 foi anterior à transferência da mistura para os vasos plásticos. Após a homogeneização, o
140 solo recebeu água até atingir a capacidade de campo, determinada anteriormente. A
141 umidade da mistura solo+substrato, antes da incorporação das matérias orgânicas, é
142 apresentada na Tabela 2.

143 Os suportes (dois por vaso) foram enterrados na mistura de solo + substrato, duas horas
144 após e sete dias após a incorporação dos resíduos a uma profundidade de 4 cm. O
145 delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três vasos para cada
146 concentração dos materiais orgânicos, cada vaso consistiu em uma repetição.

147 Os suportes permaneceram enterrados por 24 horas, nesse período a temperatura do ar
148 (máxima e mínima) foi registrada. Após este período, os suportes foram removidos do solo
149 e cada par de membranas foi recuperado com auxílio de uma pinça. As membranas foram
150 depositadas sobre lâminas de vidro, com a face contendo as estruturas do patógeno

151 voltadas para cima. Com auxílio de anéis de alumínio, o meio de cultura ágar-água foi
152 depositado sobre a superfície das membranas. Após a solidificação do ágar, as membranas
153 foram removidas e as estruturas remanescentes do fungo foram mantidas aderidas à
154 superfície do meio de cultura. Subsequentemente, duas gotas de azul de lactofenol foram
155 depositadas sobre o meio de cultura para facilitar a determinação da porcentagem de
156 microconídios germinados, sendo avaliados 100 microconídios por disco de ágar.

157 Os resultados foram analisados por meio de regressão polinomial usando o programa
158 estatístico SAS v. 9.0, considerando apenas as regressões de primeiro, segundo e terceiro
159 grau. Cada experimento foi repetido duas vezes, exceto os ensaios com hidrolisado e
160 emulsão de peixe com microconídios incubados duas horas após a incorporação dos
161 materiais orgânicos, que foram realizados três vezes.

162

163 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

164 Os materiais orgânicos líquidos (HP e EP) reduziram a germinação dos microconídios de
165 *Fola* (Figuras 6 e 7). Tanto para HP e EP, duas horas após a incorporação, foi verificado
166 um modelo de regressão quadrática, com uma redução da germinação mais expressiva na
167 concentração de 10% (Figuras 2A).

168 O potencial desses dois resíduos no controle de patógenos de plantas foi relatado por
169 diversos autores. A emulsão de peixe (0,5% v/v) reduziu a severidade de *F. solani* e *F.*
170 *oxysporum* em aspargo. A emulsão de peixe reduziu a população de *Fusarium* no solo e
171 aumentou a população de bactérias cultiváveis, além de ocasionar um aumento inicial do
172 pH do solo, seguido de um rápido declínio, a partir do segundo ao sétimo dia (Borrego-
173 Benjumea et al., 2014). Por outro lado, Abbasi (2013) verificou que a aplicação de baixas
174 doses de emulsão de peixe (0,1% v/v), duas vezes ao ano, antes do plantio e depois da
175 colheita de batata, reduziram a sarna da batata durante os quatro anos e a infecção de

176 *Verticillium dahliae* nos três anos de ensaio. O controle foi atribuído ao aumento da
177 população bacteriana nos dois primeiros anos. A emulsão de peixe, além de aumentar a
178 atividade microbiana do solo, serviu como fonte de nutriente para os microrganismos
179 promotores de crescimento de plantas de rabanete (El-Tarabily et al., 2003).

180 Abbasi et al. (2009) verificaram, em solo franco-arenoso, que a emulsão de peixe (1 e 2%
181 m/m de solo seco) reduziu a germinação de microescleródios de *V. dahliae* em avaliações
182 de 1, 3 e 6 dias após a incorporação. Essa rápida inativação do patógeno, também foi
183 observada no presente estudo, onde 24 h após a incorporação, a germinação de *Fola* foi
184 reduzida, tanto com a emulsão, quanto com o hidrolisado de peixe. Abbasi et al. (2009)
185 também mostraram que os ácidos graxos voláteis, presentes na emulsão de peixe,
186 principalmente ácido acético, fórmico *n*-butírico e propiónico, inibiram a germinação de *V.*
187 *dahliae* em pH baixo (3-4). Em pH 6, apenas as concentrações de emulsão de peixe ou
188 solução de ácidos equivalentes à concentração de 10% de emulsão, reduziram a
189 germinação de microescleródios. Os ácidos graxos voláteis também foram tóxicos para *P.*
190 *ultimum*.

191 Os ácidos graxos voláteis presentes na emulsão de peixe protegeram plântulas de pepino
192 contra *P. ultimum* em solos orgânicos e franco-arenosos, mas não em turfa, sugerindo que
193 a ação tóxica da emulsão de peixe depende do tipo de solo e do substrato (Abbasi et al.,
194 2009).

195 Apesar da baixa germinação de microconídios observada sete dias após a incubação,
196 possivelmente devido às temperaturas atingidas durante a incubação, que podem ter
197 prejudicado a germinação de microconídios, observou-se um efeito da EP na redução na
198 germinação dos microconídios de *Fola*. Algumas concentrações de HP aumentaram a
199 germinação de microconídios (Figura 2B). Abbasi et al. (2006) afirmam que a aplicação da
200 emulsão de peixe em um ano não exerce efeito residual de controle no ano seguinte.

201 Visconti et al. (2010) verificaram que o hidrolisado de peixe reduziu o crescimento
202 micelial e a germinação de conídios de *C. spathiphylli*. Entretanto, não observaram
203 supressividade do substrato, naturalmente infestado com *C. spathiphylli*, após 60 dias. No
204 presente trabalho, similarmente, o hidrolisado de peixe não foi efetivo sete dias após a sua
205 incorporação ao substrato. Possivelmente, os ácidos graxos voláteis, presentes no
206 hidrolisado, são disponibilizados mais rapidamente que na emulsão, sendo esgotados em
207 menos de sete dias. O ligeiro aumento na germinação, proporcionado por algumas
208 concentrações de hidrolisado, pode ser devido ao uso de alguma fonte de nutrientes pelo
209 patógeno. No entanto, essa redução inicial da germinação, poderia possibilitar a redução do
210 potencial de inóculo no solo, reduzindo a doença no campo. Esse fator é importante,
211 principalmente, para a cultura de ciclo curto como a alface, o que pode proporcionar o
212 escape da cultura, minimizando os prejuízos.

213 Nenhum dos resíduos sólidos (alga, concha de marisco, casca de camarão e caroço de
214 abacate) reduziu a germinação de microconídios de *Fola* (Tabela 4).

215 Em relação à alga, os resultados obtidos estão de acordo com trabalhos que sugerem que
216 algumas algas não tem efeito direto sobre os patógenos (Gonçalves & Stadnik, 2012;
217 Paulert et al., 2009). Entretanto, a escolha dessa matéria orgânica foi motivada pela
218 possibilidade dos produtos de sua degradação interferir na germinação do patógeno.
219 Paulert et al. (2009) verificaram que os extratos solúveis e insolúveis em metanol e a
220 solução aquosa de ulvana, obtida de *U. fasciata*, não inibiram a germinação de
221 *Colletotrichum lindemuthianum*, ocorrendo inclusive estímulo da germinação. No entanto,
222 esses autores verificaram que o extrato solúvel em metanol reduziu o crescimento micelial
223 *in vitro*. A ulvana também não interferiu na germinação de esporos de *C. gloeosporioides*.
224 Porém, em um primeiro momento atrasou a formação do apressório, pois é utilizada como
225 fonte de nutriente e uma vez esgotada essa fonte, o patógeno inicia a formação do

226 apressório (Gonçalves & Stadnik, 2012). No entanto, diversos trabalhos indicam o
227 potencial de algas induzirem a resistência das plantas, como os observados para *A. porri*
228 em cebolinha (Araújo et al., 2012), antracnose em feijoeiro (Paulert et al., 2009), *C.*
229 *gloeosporioides* em mudas de macieira (Araujo & Stadnik, 2013) e *Alternaria*
230 *cucumerinum*, *Didymella applanata*, *Botrytis cinerea* e *F. oxysporum* em pepino
231 (Jayaraman et al., 2011).

232 A casca de camarão moída não apresentou efeito na germinação de microconídios de *Fola*.
233 Entretanto, existem evidências de que a casca de camarão suprime *F. oxysporum* f. sp.
234 *chrysanthemi* e *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi*, sendo principalmente relacionado à ativação
235 de antagonistas do solo (Ghini et al., 2006; Pinto et al., 2010). O potencial de resíduos de
236 outros crustáceos no controle de fitopatógenos foi demonstrado por Benchimol et al.
237 (2006) os quais verificaram que casca de caranguejo a 1% v/v reduziu a morte de mudas de
238 pimenteira-do-reino, causada por *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, quando aplicados em solo
239 de mata.

240 O *Bacillus subtilis* NPU 001, isolado do solo, quando cultivado em meio de cultura
241 contendo casca de camarão e caranguejo, liberou quitinase, a qual antagoniza *F.*
242 *oxysporum* (Chang et al., 2010). Trabalhando com casca de camarão, bem como os
243 resíduos de cogumelo e quitosana, López-Mondéjar et al. (2012) verificaram que esses
244 resíduos ativaram os genes quitinolíticos de *Trichoderma harzianum* (T-78), protegendo as
245 mudas de melões do ataque de *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, sem no entanto diminuir a
246 população do patógeno. Esses relatos, aliados ao presente trabalho, apontam que a casca de
247 camarão adicionada no solo, não exerce efeito direto sobre o patógeno e, possivelmente,
248 age na microbiota do solo. Assim, necessita maior período pós-incorporação para este
249 estímulo e um solo habitado por potenciais antagonistas. Uma alternativa seria a adição
250 concomitante de microrganismos antagonísticos que utilizem este resíduo como fonte de

251 nutriente, como realizado por López-Mondéjar et al. (2012). Assim, os resultados ora
252 obtidos podem ser devido ao curto tempo de incubação dos resíduos sólidos, não tendo
253 ocorrida a sua degradação e consequente liberação de metabólitos que inibissem a
254 germinação dos microconídios.

255 Poucos são os trabalhos com concha de marisco no controle de doença de plantas. No
256 presente estudo, a concha de marisco não influenciou na germinação de microconídios de
257 *Fola*. Entretanto, na concentração de 6% de pó de concha de marisco, Visconti (2011)
258 verificou redução na severidade e na incidência de *R. solanacearum* em tomateiro,
259 possivelmente associada ao nitrogênio presente no resíduo e a elevação do pH do substrato.
260 Entretanto, o mesmo autor verificou que a concha de marisco não reduziu a doença
261 causada por *C. spathiphylli* em espatifilo.

262 O caroço de abacate, possivelmente sendo a primeira vez estudado para o controle de um
263 fitopatógeno, também não afetou a germinação de microconídios de *Fola*. A sua lenta
264 degradação sugere a hipótese de que em sua composição pode ter algum composto com
265 efeito antagonista a *Fola*, mas o tempo de degradação pode ter sido insuficiente para
266 verificar este efeito.

267 A realização dos estudos avaliando os efeitos de fontes de matéria orgânica sobre a
268 germinação de microconídios de *Fola*, simulando condições de casa de vegetação,
269 possibilitou avaliar o efeito dos resíduos em sua interação com o solo e com as variações
270 do ambiente. Esses resultados apontam o potencial da emulsão e do hidrolisado de peixe
271 no controle de *Fola*. No entanto, o hidrolisado de peixe teve um breve efeito, pois sete dias
272 após a incorporação, com a nova adição de microconídios, não foi reduzida a germinação
273 de *Fola*, indicando uma vulnerabilidade com a reinfestação do solo. Em dados não
274 publicados, em experimento sob casa de vegetação utilizando solo em vasos plásticos, a
275 adição e revolvimento de hidrolisado de peixe, principalmente nas concentrações de 15 e

276 20% do volume necessário para atingir a capacidade de campo, a partir do solo seco,
277 causaram compactação do solo e fitotoxicidade em plântulas de tomate, transplantadas 7-
278 14 dias após a incorporação. Visto isso, é importante avaliar o efeito de diferentes fontes
279 de matéria orgânica para diferentes patossistemas e estabelecer adequados períodos de
280 incubação antes de realizar o plantio.

281

282 **AGRADECIMENTOS**

283 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelas bolsas
284 de estudos, ao Dr. Alexandre Visconti, da Epagri, pelo auxílio na coleta dos resíduos
285 marinhos e às empresas FishFértil Fertilizantes Ltda. e JK Fertilizantes Ltda., por
286 fornecerem os materiais líquidos testados.

287

288 **REFERÊNCIAS**

289 Abbasi PA (2013) Establishing suppressive conditions against soilborne potato diseases
290 with low rates of fish emulsion applied serially as a pre-plant soil amendment. *Canadian*
291 *Journal of Plant Pathology* 35:10-19.

292 Abbasi PA, Conn KL, Lazarovits G (2004) Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium*
293 damping-off of radish and cucumber seedlings by addition of fish emulsion to peat mix or
294 soil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26:177-187.

295 Abbasi PA, Conn KL, Lazarovits G (2006) Effect of fish emulsion used as a preplanting
296 soil amendment on verticillium wilt, scab, and tuber yield of potato. *Canadian Journal of*
297 *Plant Pathology* 28:509-518.

298 Abbasi PA, Lazarovits G, Jabaji-Hare S (2009) Detection of high concentrations of organic
299 acids in fish emulsion and their role in pathogen or disease suppression. *Phytopathology*
300 99:274-281.

- 301 Araújo IB, Peruch LAM, Stadnik MJ (2012) Efeito do extrato de alga e da argila silicatada
302 na severidade da alternariose e na produtividade da cebolinha comum (*Allium fistulosum*
303 L.). *Tropical Plant Pathology* 37:363-367.
- 304 Araujo L, Stadnik MJ (2013) Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants
305 to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases. *Acta*
306 *Scientiarum* 35:287-293.
- 307 Bailey KL, Lazarovits G (2003) Suppressing soil-borne diseases with residue management
308 and organic amendments. *Soil & Tillage Research* 72:169-180.
- 309 Benchimol RL, Sutton JC, Dias-Filho MB (2006) Potencialidade da casca de caranguejo na
310 redução da incidência de Fusariose e na promoção do crescimento de mudas de
311 Pimenteira-do-Reino. *Fitopatologia Brasileira* 31:180-184.
- 312 Borrego-Benjumea A, Basallote-Ureba MJ, Melero-Vara JM, Abbasi PA (2014)
313 Characterization of *Fusarium* Isolates from Asparagus Fields in Southwestern Ontario and
314 Influence of Soil Organic Amendments on Fusarium Crown and Root Rot. *Phytopathology*
315 104:403-415.
- 316 Borrero C, Ordovás J, Trillas MI, Aviles M (2006) Tomato Fusarium wilt suppressiveness.
317 The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities
318 as characterised by Biolog (R). *Soil Biology & Biochemistry* 38:1631-1637.
- 319 Brunelli KR, Cabral CS, Gioria R, Kobori RF, Costa H, Reis A (2010) Presença da raça 1
320 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em alface no Brasil. *Tropical Plant Pathology* 35:
321 S222.
- 322 Chang WT, Chen ML, Wang SL (2010) An antifungal chitinase produced by *Bacillus*
323 *subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World Journal of Microbiology &*
324 *Biotechnology* 26:945-950.

- 325 Conn KL, Lazarovits G (1999) Impact of animal manures on Verticillium wilt, potato scab,
326 and soil microbial populations. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21:81-92.
- 327 El-Tarabily KA, Nassar AH, Hardy GES, Sivasithamparam K (2003) Fish emulsion as a
328 food base for rhizobacteria promoting growth of radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*)
329 in a sandy soil. *Plant and Soil* 252:397-411.
- 330 Du NS, Shi L, Du LT, Yuan YH, Li B, Sang T, Sun J, Shu S, Guo SR (2015) Effect of
331 vinegar residue compost amendments on cucumber growth and Fusarium wilt.
332 *Environmental Science and Pollution Research* 22:19133-19141.
- 333 Fujinaga M, Ogiso H, Shinohara H, Tsushima S, Nishimura N, Togawa M, Saito H, Nozue
334 M (2005) Phylogenetic relationships between the lettuce root rot pathogen *Fusarium*
335 *oxysporum* f. sp. *lactucae* races 1, 2 and 3 based on the sequence of the intergenic spacer
336 region of its ribosomal DNA. *Journal of General Plant Pathology* 71:402-407.
- 337 Fujinaga M, Ogiso H, Tuchiya N, Saito H, Yamanaka S, Nozue M, Kojima M (2003) Race
338 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by differential system
339 with commercial cultivars. *Journal of General Plant Pathology* 69:23-28.
- 340 Ghini R, Domingues F, Bettiol W (2006) Casca de camarão para o controle de Murcha de
341 *Fusarium* em gengibre. *Circular Técnica* 11:1-3.
- 342 Gonçalves AE, Stadnik MJ (2012) Interferência de ulvana no desenvolvimento e
343 melanização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tropical Plant Pathology*
344 37:431-437.
- 345 Gravel V, Dorais M, Dey D, Vandenberg G (2015) Fish effluents promote root growth and
346 suppress fungal diseases in tomato transplants. *Canadian Journal of Plant Science* 95:427-
347 436.
- 348 Henz GP, Suinaga F (2009) Tipos de alface cultivados no Brasil. *Comunicado Técnico* 75.

- 349 Hoitink HAJ, Boehm MJ (1999) Biocontrol within the context of soil microbial
350 communities: A substrate-dependent phenomenon. Annual Review of Phytopathology
351 37:427-446.
- 352 Jayaraman J, Norrie J, Punja ZK (2011) Commercial extract from the brown seaweed
353 *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. Journal of
354 Applied Phycology 23:353-361.
- 355 Kobori RF, Brunelli KR, Gioria R (2011) Impacto potencial das mudanças climáticas sobre
356 as doenças da alface no Brasil. In: Ghini R, Hamada E, Bettiol W (Eds.) Impacto das
357 mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil. Jaguariúna. Embrapa
358 Meio Ambiente. pp. 129-144.
- 359 Lopes CA, Quezado-Duval AM, Reis A (2010) Doenças da alface. Brasília. Embrapa
360 Hortaliças.
- 361 López-Mondéjar R, Blaya J, Obiol M, Ros M, Pascual JA (2012) Evaluation of the effect
362 of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *In vitro* and
363 greenhouse nursery experiments. Pesticide Biochemistry and Physiology 103:1-8.
- 364 Paulert R, Talamini V, Cassolato JEF, Duarte MER, Nosedá MD, Smania A, Stadnik MJ
365 (2009) Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva*
366 *fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).
367 Journal of Plant Diseases and Protection 116:263-270.
- 368 Pinto ZV, Bettiol W, Morandi MAB (2010) Efeito de casca de camarão, hidrolisado de
369 peixe e quitosana no controle da murcha de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* em
370 crisântemo. Tropical Plant Pathology 35:16-23.
- 371 Postma J, Schilder MT (2015) Enhancement of soil suppressiveness against *Rhizoctonia*
372 *solani* in sugar beet by organic amendments. Applied Soil Ecology 94:72-79.

- 373 Postma J, Schilder MT, Bloem J, van Leeuwen-Haagsma WK (2008) Soil suppressiveness
374 and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. *Soil Biology &*
375 *Biochemistry* 40:2394-2406.
- 376 Scott JC, Gordon TR, Kirkpatrick SC, Koike ST, Matheron ME, Ochoa OE, Truco MJ,
377 Michelmore RW (2012) Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from
378 *Fusarium* wilt in lettuce. *California Agriculture* 66:20-24.
- 379 Tenuta M, Conn KL, Lazarovits G (2002) Volatile fatty acids in liquid swine manure can
380 kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92:548-552.
- 381 Tenuta M, Lazarovits G (2002) Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments
382 kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92:255-264.
- 383 Ventura JA, Costa H (2008) *Fusarium* Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* on Lettuce in
384 Espírito Santo, Brazil. *Plant Disease* 92:976-976.
- 385 Visconti A (2011) Resíduos da indústria pesqueira na indução de supressividade a
386 *Cylindrocladium spathiphylli* e *Ralstonia solanacearum* e de biofertilizantes no controle de
387 oídios. Doutorado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade
388 de Ciências Agronômicas. Botucatu.
- 389 Visconti A, Bettioli W, Morandi MAB (2010) Efeito de hidrolisado de peixe sobre o
390 crescimento micelial e controle de *Cylindrocladium spathiphylli* em espatifilo. *Summa*
391 *Phytopathologica* 36:298-308.

392 **Tabela 1.** Atributos químicos dos materiais orgânicos utilizados nos estudos.

Atributo	Hidrolisado de peixe*	Emulsão de peixe*	Casca de camarão	Alga	Concha de marisco
N (g kg ⁻¹)	12	32,7	58,1	18,6	14,5
P ₂ O ₅ (g kg ⁻¹)	20		13,8	1,2	4,9
K ₂ O (g kg ⁻¹)	6		1,65	1,8	11,4
Ca (g kg ⁻¹)	5	13,5	154,4		
Mg (g kg ⁻¹)	1		5,23	1,4	1,3
C (g kg ⁻¹)	80	448	50		
pH	4,5	3,3	8,7	6,9	7,9

393 *Dados fornecidos pelas empresas responsáveis pela produção dos produtos.

394 **Tabela 2.** Umidade da mistura solo + substrato determinada antes da incorporação dos
395 materiais orgânicos. Os valores são relativos as médias dos dois ensaios de cada material.

Material orgânico	Umidade do solo+substrato (%)
Alga	25,64 ± 3,14
Casca de camarão	25,64 ± 3,14
Concha de marisco	26,03 ± 1,69
Caroço de abacate	23,24 ± 1,63
Hidrolisado de peixe	12,91 ± 1,64
Emulsão de peixe	15,77 ± 5,03

396 **Tabela 3.** Temperatura mínima e máxima do ar durante as 24 horas de incubação dos
 397 microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, duas horas e sete dias após a
 398 incorporação dos respectivos materiais orgânicos.

Material orgânico	Temperatura (°C)	
	2 horas*	7 dias*
Alga	11,7 – 24,6	13,5 – 38,9
Casca de camarão	11,7 – 24,6	13,5 – 38,9
Concha de marisco	9,9 – 31,3	12,8 – 28,4
Caroço de abacate	9,9 – 31,3	11,3 – 28,4
Hidrolisado de peixe	18,2 – 37,0	17,3 – 37,5
Emulsão de peixe	18,2 – 37,0	17,3 – 37,5

399 *Temperatura Mínima e Máxima do ar atingida nos dois ensaios de cada material orgânico.

400 **Tabela 4.** Média da germinação de microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*
 401 em solo+substrato previamente (duas horas e sete dias) incorporado com os materiais
 402 orgânicos.

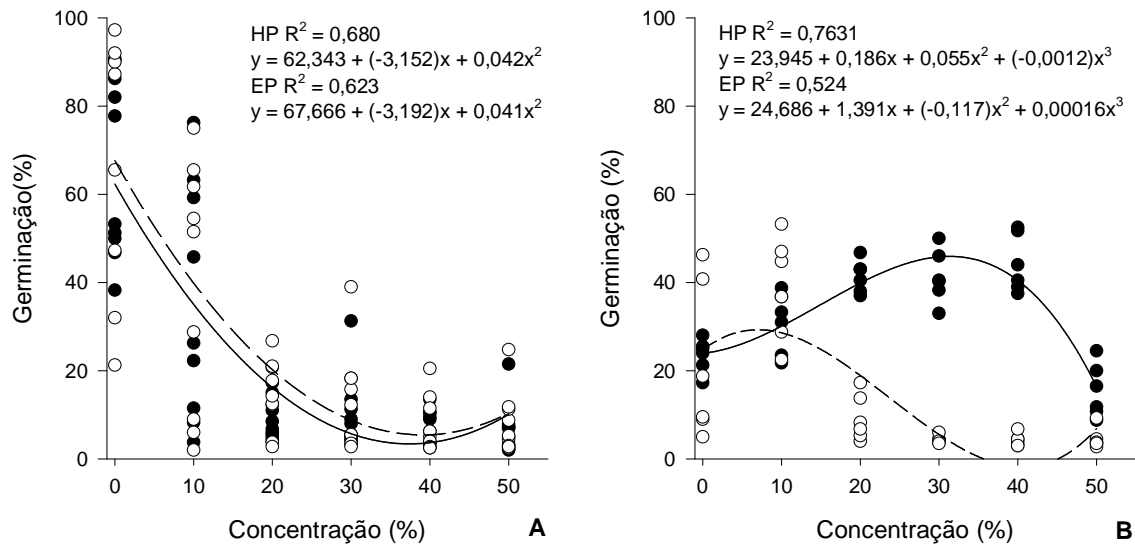
Incubação após a incorporação*	Germinação (%)			
	Alga ^{ns}	Casca de camarão ^{ns}	Concha de marisco ^{ns}	Semente de abacate ^{ns}
2 horas	54,2	47,8	71,0	68,2
7 dias	62,8	65,0	75,7	64,9

403 *Incubação de microconídios após a incorporação dos materiais orgânicos. Incubação dos
 404 microconídios por 24 horas. ns = não significativo pela regressão polinomial (5% de
 405 significância).



406

407 **Figura 1.** Suportes construídos para receberem as membranas contendo microconídios de408 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*.



409

410 **Figura 2.** Efeito da incorporação de hidrolisado de peixe (●) (—) e emulsão de peixe (○)

411 (– –) nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50% do volume de água para atingir a

412 capacidade de campo em mistura de solo + substrato secos sobre a germinação de

413 microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Microconídios depositados no solo

414 duas horas (A) e sete dias (B) após a incorporação do material orgânico. Média de três

415 ensaios para duas horas (A) e dois ensaios para 7 dias (B) após a incorporação dos

416 materiais orgânicos.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS E *Trichoderma harzianum* NO CONTROLE DE
Fusarium circinatum EM *Pinus radiata*

Este capítulo foi redigido em formato de artigo de acordo com as normas da revista Chilean Journal of Agricultural Research.

1 **Efeito de resíduos orgânicos e *Trichoderma harzianum* no controle de *Fusarium circinatum***
2 **em *Pinus radiata***

3
4 **Cassiano Forner^{1*}, Daniella A. Valdabenito², Eugenio Sanfuentes², Wagner Bettiol³**

5 ¹Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
6 (UNESP), Câmpus Botucatu, CEP 18.610-307 - Botucatu, SP, Brasil. Bolsista CNPq. Autor para
7 correspondência (forner687@hotmail.com).

8 ²Universidad de Concepción, Centro de Biotecnología, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

9 ³Embrapa Meio Ambiente, CP 69, CEP 13.820-000 Jaguariúna, SP, Brasil. Bolsista do CNPq.

10
11 **RESUMO**

12 *Fusarium circinatum*, agente causal da Fusariose do pinus, pode atacar tanto mudas quanto plantas
13 adultas, sendo que a ocorrência em viveiros compromete todo o lote de mudas. A utilização de
14 agentes de biocontrole e resíduos orgânicos podem constituir alternativas ao controle. O estudo
15 teve por objetivo avaliar o potencial de resíduos à base de algas, casca de caranguejo, concha de
16 marisco e repolho sobre a germinação de microconídios de *F. circinatum*, bem como da doença em
17 plântulas de *Pinus radiata* em viveiro, associados ou não a *Trichoderma harzianum*. Tanto os
18 resíduos orgânicos, quanto o agente de biocontrole, não inibiram a germinação dos microconídios,
19 nem controlaram a doença.

20 **Palavras-chave:** controle biológico, supressão, cancro resinoso, matéria orgânica.

21
22 **ABSTRACT**

23 *Fusarium circinatum*, the agent that causes the fusariosis of pine, can attack pine seedling and adult
24 plants. In nursery, the pathogen can cause high losses in batches, because had restrictions of
25 transplant in the field. The pathogen control is difficult, and the use of biocontrol agents and
26 organic matter may be an alternative control. In this work we evaluated the potential of seaweed,
27 crab shell, clamshell and cabbage on the microconidia germination of *F. circinatum*, as well as in
28 the control of pitch canker in seedling of *Pinus radiata* in nursery, associated or not with
29 *Trichoderma harzianum*. The organic matter and biocontrol agent did not inhibit the microconidia
30 germination, neither controlled the disease.

31 **Keywords:** Biological control, suppressiveness, pitch canker, organic matter.

32
33 **INTRODUÇÃO**

34 O cancro resinoso do pinus, causado por *Fusarium circinatum* (Gordon, 2006), foi relatado pela
35 primeira vez nos Estados Unidos da América em 1945 (Hepting e Roth, 1946). Atualmente, a
36 doença é encontrada em várias partes do mundo (Gordon, 2006). Especificamente na América do

37 Sul, *F. circinatum* foi identificado no Chile. Ainda que a ocorrência seja restrita em viveiros
38 (Jacobs et al., 2007), são verificadas plantas com sintomas da doença em cultivos comerciais,
39 porém a doença não está estabelecida. Estas ocorrências, provavelmente, são originárias de plantas
40 infectadas nos viveiros. No entanto, o risco do estabelecimento é intensificado pela predominância
41 do cultivo de *Pinus radiata*, altamente suscetível ao patógeno (Wingfield et al., 2008). O patógeno
42 também foi encontrado em viveiros de mudas de *Pinus taeda* no Uruguai (Alonso e Bettucci, 2009)
43 em viveiros de mudas e em cultivos comerciais na Colômbia (Steenkamp et al., 2012) e,
44 recentemente, relatado no Brasil, causando doença em viveiro com plantas de *Pinus patula*, no
45 estado de Santa Catarina (Pfenning et al., 2014).

46 No Chile, não se conhece exatamente o motivo do não estabelecimento do patógeno em cultivo
47 comercial. A ausência de insetos vetores específicos associados à doença é uma hipótese. Fatores
48 ambientais, como o clima seco e temperaturas baixas, desfavoráveis ao estabelecimento ou
49 disseminação do patógeno também são considerados (Wingfield et al., 2008). Na África do Sul, *F.*
50 *circinatum* permaneceu restrito em viveiros por, aproximadamente, 15 anos, até surgir o primeiro
51 relato do patógeno causando doença em cultivo comercial de *P. radiata*. A ocorrência está
52 associada às condições climáticas favoráveis, a associação do patógeno com a infestação do
53 gorgulho *Pissodes nemorensis*, além dos ferimentos causados pelo manejo de poda que
54 favorecerem o desenvolvimento da doença (Coutinho et al., 2007).

55 Os sintomas causados por *F. circinatum* em viveiros são podridão radicular, do colo e da parte
56 aérea, podendo causar a morte da planta (Fourie et al., 2014), além de murcha (Martín-Rodrigues et
57 al., 2015). Em plantas adultas, observa-se, principalmente, clorose das acículas próximas ao sítio de
58 infecção e conseqüente morte de ramos (lesões que anelam o ramo). Podem ocorrer repetidas
59 infecções que causam extensos danos à copa do hospedeiro. Uma grande infecção ocupa uma larga
60 extensão do ramo ou tronco, acarretando em grande produção de resina. Lesões próximas ao nível
61 do solo, em plantas jovens, podem causar clorose em todas as acículas, por conseqüência do
62 anelamento do tronco (Gordon et al., 2001).

63 Plântulas de *P. radiata* infestadas com *F. circinatum* apresentam aumento da quantidade de resina
64 exsudada. As plântulas que, aos 21 dias após a inoculação do patógeno, apresentavam exsudação
65 moderada ou elevada de resina, morreram 56 dias após a inoculação. O *F. circinatum* tolera a
66 resina e utiliza os dutos de resina para colonização vertical em novas zonas (Martín-Rodrigues et
67 al., 2013).

68 Existem relatos de controle de patógenos habitantes do solo com utilização de materiais orgânicos:
69 casca de caranguejo no controle de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em pimenta-do-reino (Benchimol
70 et al., 2006); *Brassica juncea* no solo na redução de Murcha de *Fusarium* em espinafre (Mowlick et
71 al., 2013); pó de algas (*Stokeyia variabile*, *Spatoglossum variabile* e *Melanothamnus afaqhusainii*)

72 no controle de *Rhizoctonia solani*, *F. solani* e *F. oxysporum* em berinjela e melancia (Baloch et al.,
73 2013).

74 Outra alternativa crescente disponível para o controle de patógenos habitantes do solo é o controle
75 biológico. Especificamente, para o controle de *F. circinatum*, *Trichoderma* isolados UDC-23 e
76 UDC-408 e *Clonostachys* UDC-A32 e UDC-222, em substrato esterilizado, sete dias antes da
77 infestação com do patógeno, foram promissores no controle da doença (Moraga-Suazo et al.,
78 2011). Quatro isolados de *Bacillus subtilis* (B1, B2, B3 e B4) e um de *Burkholderia* sp. (B5),
79 endofítico de *P. taeda*, inibiram quatro isolados de *F. circinatum* em testes *in vitro* (Soria et al.,
80 2012). *Penicillium chrysogenum* e *Fusarium lateritium*, isolados de insetos vetores e não vetores de
81 *F. circinatum*, competem por recursos com o patógeno. Em elevada concentração do patógeno, o
82 tratamento de sementes com os antagonistas não foi eficaz, porém em baixas concentrações, houve
83 parcial proteção (Romón et al., 2008).

84 Considerando a recente expansão do patógeno pela América do Sul, torna-se relevante o
85 desenvolvimento de técnicas de controle para evitar o alastramento do patógeno para cultivos
86 comerciais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de resíduos orgânicos sobre a
87 germinação de microconídios de *F. circinatum* e de resíduos associados ou não a *Trichoderma*
88 *harzianum* na redução de mortalidade de plântulas de *P. radiata* pelo patógeno.

89

90

MATERIAL E MÉTODOS

91 **Multiplicação do patógeno e antagonista**

92 O isolado de *F. circinatum* Pr 444641 (*Fc*) foi obtido da coleção do Laboratorio de Patología
93 Forestal da Universidad de Concepción, e multiplicado em meio batata-dextrose-ágar (BDA), por
94 sete dias em temperatura de 25 ± 1 °C. Posteriormente, discos de BDA contendo o micélio do
95 patógeno foram dispensados em meio líquido SNA (1g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g
96 de glicose; 0,2g de sacarose e 1g de KNO_3 por litro de água) por um período de 72 h, quando foi
97 padronizada uma suspensão na concentração de 1×10^4 microconídios mL^{-1} para os testes em casa
98 de vegetação.

99 O antagonista utilizado, *Trichoderma harzianum* CBF84, foi multiplicado em BDA. Após
100 incubação por sete dias, discos contendo micélio do antagonista foram dispensados em bolsas de
101 polipropileno contendo grãos de arroz, previamente autoclavados. As bolsas foram mantidas a
102 $25^\circ\text{C} \pm 1$ °C, por 21 dias, quando os conídios foram suspensos em frascos de vidro por meio da
103 adição de água destilada autoclavada, seguida de agitação por 1 h, em agitador orbital a 150 rpm. A
104 suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze e a suspensão padronizada a 1×10^7 conídios mL^{-1} .

105

106 **Materiais orgânicos**

107 Os materiais orgânicos utilizados nos experimentos foram: concha de marisco (CM), casca de
108 caranguejo (CC), alga (*Mazzaella* sp.) (AL) e repolho - *Brassica oleracea* var. *capitata* - (RE). Os
109 materiais orgânicos marinhos (CM, CC e AL) foram coletados no litoral da VIII Region del Bio
110 Bio (Chile), Playa Blanca, Colcura, Balneário El Morro e Cocholgue em setembro de 2013. Estes
111 materiais foram lavados com água de abastecimento da rede pública, pré-secados ao sol e secados
112 em estufa com circulação de ar forçada com temperaturas de 55 ± 5 °C. Em seguida, os materiais
113 orgânicos foram triturados, com auxílio de um moinho manual, e passados em peneira de 25 mesh
114 (0,71 mm de diâmetro). Os materiais orgânicos foram armazenados em sacos plásticos até o dia da
115 incorporação. O RE foi triturado no dia anterior à incorporação no substrato, com auxílio de um
116 ralador manual, e mantido a 4 °C até o momento de uso.

117

118 **Efeito dos resíduos orgânicos incorporados ao solo sobre a germinação de microconídios.**

119 *F. circinatum* foi multiplicado em meio BDA por sete dias, então foi preparada uma suspensão de
120 microconídios através da dispensa de 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa, seguida
121 da raspagem superficial. A suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze e calibrada em 2×10^5
122 microconídios mL⁻¹. Em seguida, 150 µL desta suspensão foi dispensada entre as duas membranas
123 de ester de celulose (Millipore 0,45 µm de poro) de 25 mm de diâmetro e fixadas em um suporte de
124 anel de PVC. Os suportes foram preparados com luvas hidráulicas de ¾” de diâmetro e buchas de
125 redução hidráulicas. Dentro de cada suporte foram acomodados sequencialmente: um anel de
126 borracha de vedação, as membranas de Millipore contendo a suspensão de *Fola* e novamente um
127 anel de borracha de vedação. Em seguida os suportes foram rosqueados para utilização (Figura 1).
128 Simultaneamente, vasos de 500 mL foram preenchidos com uma mistura de areia, proveniente do
129 viveiro Proplantas (localizado no km 22 em Chillán), com os materiais orgânicos, nas
130 concentrações de 0 (testemunha), 1, 2 e 4% v/v. A mistura foi irrigada e depois de duas horas
131 foram colocados dois suportes contendo os microconídios de *Fc* por vaso, a uma profundidade de 4
132 cm. Os vasos foram mantidos em câmara de crescimento a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h. Os
133 suportes permaneceram por 24 h nessas condições. Quatorze dias após, no mesmo vaso, outros dois
134 suportes também foram enterrados, permanecendo novamente por 24 h, para avaliar o efeito de
135 uma decomposição por um tempo maior.

136 Após a retirada dos suportes, as membranas (duas por suporte) foram retiradas e dispostas sobre
137 lâminas microscópicas, com a face interna voltada para cima. Circundando as membranas foram
138 colocados anéis plásticos com 2 mm de altura e 22 mm de diâmetro. Dentro de cada anel foi
139 depositado meio ágar-água (AA) a 2%. Imediatamente após a solidificação do meio, o filtro foi
140 retirado e sobre o meio, agora contendo os microconídios de *F. circinatum*, foi dispensado azul de

141 lactofenol para paralisação da germinação dos microconídios. A germinação foi determinada a
142 partir de 100 microconídios amostrados em cada disco.

143 O delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições (vasos), contendo dois suportes
144 com duas membranas em cada suporte, por concentração de cada resíduo. Cada resíduo foi
145 analisado separadamente, sendo que todos os ensaios foram realizados duas vezes.

146

147 **Experimento em casa de vegetação**

148 O experimento foi instalado em casa de vegetação na cidade de Los Ángeles, província de Bio Bio,
149 Chile. Os resíduos foram incorporados ao substrato nas concentrações de 0 (testemunha), 1, 2 e 4%
150 (v/v), com ou sem a aplicação do antagonista. Cada resíduo foi considerado como um experimento
151 separadamente. O delineamento utilizado foi o de parcelas subdivididas com três repetições. Para
152 tanto, cada parcela foi composta por duas bandejas (com e sem aplicação do antagonista), sendo
153 divididas nas concentrações de cada resíduo. As bandejas continham 88 tubetes, com capacidade
154 para 140 mL de substrato. Para cada repetição das concentrações foram utilizados 16 tubetes (duas
155 fileiras), deixando uma fileira de 8 tubetes livre para separar as concentrações do resíduo. A
156 incorporação dos materiais orgânicos marinhos (CM, CC e AL) no substrato, ocorreu sete dias
157 antes da semeadura de *P. radiata*, enquanto que RE foi incorporado um dia antes da semeadura.

158 A aplicação do antagonista foi com uma suspensão com 1×10^7 conídios mL^{-1} até atingir 25% do
159 volume necessário para atingir da capacidade de campo do substrato, três dias antes da semeadura
160 de *P. radiata*.

161 O substrato foi infestado com o patógeno em uma concentração de 1×10^4 UFC mL^{-1} , um dia antes
162 da semeadura de *P. radiata*. O volume de suspensão do patógeno utilizado foi para atingir 25% da
163 capacidade de campo do substrato.

164 A desinfestação das sementes de *P. radiata* foi realizada por imersão em solução de peróxido de
165 hidrogênio, por 15 minutos, e, posteriormente, lavadas duas vezes em água destilada, um dia antes
166 da semeadura. Em cada tubete foi semeada uma semente.

167 As avaliações foram realizadas semanalmente determinando o número de plantas emergidas e o de
168 plântulas mortas. As plântulas mortas foram coletadas e o patógeno foi isolado para confirmação da
169 causa. As variáveis de crescimento (comprimento de raiz, altura de planta, massas fresca e seca de
170 raiz e parte aérea) foram avaliadas no final do experimento a partir de cinco plantas selecionadas
171 aleatoriamente de cada repetição de cada concentração do resíduo.

172

173 **Análise estatística**

174 Com os resultados de germinação de microconídios foi realizada análise de variância e os dados
175 submetidos à análise de regressão a 5% de significância, utilizando o programa estatístico SAS®
176 9.0. Com os dados dos ensaios em casa de vegetação foi realizada análise de variância e os dados

177 de mortalidade foram transformados em $x + 0,5$. Para essa análise foi utilizado o programa
178 estatístico Sisvar 5.5. Aplicou-se a análise de regressão para o fator concentração de materiais
179 orgânicos.

180

181

RESULTADOS

182 Efeito dos resíduos orgânicos incorporados ao solo sobre a germinação de microconídios

183 Não houve efeito dos resíduos analisados sobre a germinação de microconídios de *Fc* (Figura 2).
184 Apesar da concha de marisco, após 14 dias de incubação apresentar uma redução da germinação de
185 microconídios com o aumento da concentração. Entretanto, com baixo valor de R^2 , o que não
186 permite uma conclusão sobre este tratamento.

187

188 Experimento em casa de vegetação

189 Não foram verificadas interações entre o *T. harzianum* e os materiais orgânicos na emergência e a
190 redução da mortalidade de plântulas para nenhum dos resíduos orgânicos e o antagonista. A
191 aplicação de *T. harzianum* não interferiu na emergência e mortalidade de *P. radiata* (Figuras 3 e 4).
192 O aumento da concentração de AL no substrato proporcionou uma redução da emergência de
193 plântulas de *Pinus*, seguindo um modelo linear (Figura 3A). No entanto, não reduziu a mortalidade
194 de plantas causadas por *F. circinatum* (Figura 4A). A adição de CC não alterou a emergência de *P.*
195 *radiata* (Figura 3B). Tanto a emergência, quanto o controle de *F. circinatum* não foram
196 significativos para as diferentes concentrações incorporadas de CM e RE (Figura 3CD e 4CD).
197 Para as variáveis de crescimento, não se pode concluir com base nos resultados obtidos devido ao
198 valor de R^2 muito baixo (Figuras 5, 6, 7 e 8).

199

200

DISCUSSÃO

201 A metodologia do teste de germinação utilizada permitiu avaliar diretamente o efeito dos resíduos
202 em mistura no substrato sobre a germinação dos microconídios. Tal efeito abrange a indução da
203 microbiota do substrato, bem como as substâncias voláteis liberadas durante a decomposição dos
204 resíduos orgânicos. Utilizando metodologia similar, o hidrolisado de peixe e a emulsão de peixe,
205 reduziram a germinação de microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, 2 h após a
206 aplicação. Possivelmente, esse efeito deve-se a compostos voláteis fungitóxicos liberados no solo
207 durante a sua decomposição (Bettiol et al., 2014). Ao contrário, materiais orgânicos sólidos,
208 necessitam de um período de tempo maior para serem decompostos e liberarem compostos
209 orgânicos tóxicos aos patógenos ou estimularem a microbiota do solo. Isso poderia explicar a
210 ausência de efeito na germinação dos microconídios, duas horas após a incorporação dos materiais
211 orgânicos. Benchimol et al. (2006) verificaram que a mortalidade de mudas de pimenteira-do-reino
212 por *F. solani* f. sp. *peperis* foi reduzida com a adição de 1% de casca de carangejo, incubados por

213 15 dias, em solo de mata não autoclavado, ou por 30 dias, em solo de mata autoclavado.
214 Supostamente, o controle deve-se a indução de microrganismos quitinolíticos. Porém, no presente
215 estudo, os materiais orgânicos, mesmo quando incorporados por 14 dias, não reduziram a
216 porcentagem da germinação dos microconídios de *F. circinatum*. Um período de tempo maior
217 poderia ser necessário para ocorrer uma maior decomposição e visualizar um possível efeito dos
218 resíduos orgânicos na germinação dos microconídios de *F. circinatum*.

219 Em relação as algas, alguns trabalhos realizados *in vitro* não mostraram efeitos diretos sobre a
220 germinação do patógeno. Extratos solúveis e insolúveis em metanol e a solução aquosa de ulvana
221 de *Ulva fasciata* não inibiram a germinação de *Colletotrichum lindemuthianum*. No caso da ulvana,
222 inclusive estimulou a germinação. No entanto, o extrato solúvel em metanol reduziu o crescimento
223 micelial *in vitro* (Paulert et al., 2009). A ulvana, extraída de *U. fasciata*, em testes de laboratório,
224 também não apresentou efeito contra a germinação de *C. gloeosporioides*, porém em um primeiro
225 momento atrasou a formação do apressório, isto é explicado, pois a ulvana é utilizada como
226 nutriente e uma vez esgotada essa fonte, o patógeno inicia a formação do apressório (Gonçalves e
227 Stadnik, 2012). A incorporação de AL não apresentou efeito sobre a germinação de microconídios
228 de *F. circinatum*.

229 Na literatura são encontrados diferentes trabalhos sobre o efeito direto de brássicas em
230 fitopatógenos. Isotiocianatos, produzidos por brássicas, apresentaram ação fungistática ao
231 crescimento micelial de quatro isolados de *F. oxysporum* patogênicos de coníferas. A ação
232 fungistática pode estar relacionada com a concentração aplicada. Os efeitos foram variáveis contra
233 os diferentes isolados. Maior inibição foi obtida com propenil e isotiocianato etílico (Smolinska et
234 al., 2003). Diversas brássicas promovem redução do crescimento micelial de patógenos como
235 *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora erythroseptica*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*,
236 *Fusarium sambucinum* e *F. oxysporum*. Porém, a *Brassica juncea* foi a única que reduziu em
237 grandes proporções os dois patógenos do gênero *Fusarium* (Larkin e Griffin, 2007). A formação de
238 conídios de *F. oxysporum* não foi afetada por isotiocianatos, porém a germinação de conídios e
239 clamidósporos foi suscetível, principalmente a propenil, etílico, benzílico e feniletil que inibiram
240 totalmente a germinação (Smolinska et al., 2003). No presente trabalho não foi obtido controle do
241 patógeno pela incorporação de repolho. Pode-se presumir a insensibilidade do patógeno aos
242 isotiocianatos produzidos ou mesmo a baixa concentração destes compostos no repolho utilizado.

243 *T. harzianum* não controlou de *F. circinatum*. Resultado semelhante foi observado utilizando um
244 isolado endofítico de *T. viride*, que, apesar de apresentar antibiose em diferentes graus contra sete
245 isolados de *F. circinatum*, não foi observado o mesmo resultado no controle da doença em mudas
246 de *P. radiata*, com exceção a um isolado de *F. circinatum*, no qual ocasionou menor mortalidade
247 de plântulas na presença do antagonista na concentração de 10^5 esporos mL⁻¹ (Martinez-Álvarez et
248 al., 2012). Por outro lado, a aplicação dos isolados de *Trichoderma* UDC-23 e UDC-408 em

249 substrato esterilizado, sete dias antes da infestação com *F. circinaum*, reduziu a doença (Moraga-
250 Suazo et al., 2011). A adição de *T. viride* em substrato na concentração de 10^7 esporos mL⁻¹,
251 reduziu a germinação de *P. radiata* (Martinez-Álvarez et al., 2012). A baixa mortalidade de plantas
252 causada por *F. circinatum* possivelmente mascarou a eficiência do agente de controle biológico.

253 A casca de caranguejo aumentou a mortalidade de plantas de *P. radiata* por *F. circinatum* nas
254 maiores concentrações. Esse resultado está de acordo com os observados por Rose et al. (2003), no
255 qual a adição de 4% (v/v) de quitina extraída de casca de camarão e caranguejo em substrato,
256 aumentou a incidência de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinus* 24 dias após a semeadura. Isso
257 pode ser atribuído à liberação de nitrogênio na forma de amônia, que torna a planta mais suscetível
258 ao ataque do patógeno.

259 Os dados do presente trabalho relativos às variáveis de crescimento não são conclusivos, devido ao
260 valor de R² obtido que foi muito baixo. Alguns trabalhos apresentam promoção de crescimento
261 pelos materiais orgânicos testados. Araújo et al. (2012) verificaram que aplicações semanais do
262 extrato de alga (*U. fasciata*) aumentaram o peso fresco das folhas e um inicial incremento do
263 comprimento das folhas de pepino. Rose et al. (2003) verificaram que a adição de 4% (v/v) de
264 quitina, extraída de casca de camarão e caranguejo, em substrato, aumentou a altura e o peso fresco
265 de plântulas de pepino.

266 Os resultados do presente trabalho sugerem que os resíduos orgânicos testados não agiram sobre o
267 patógeno até 14 dias após a incorporação.

268

269

CONCLUSÃO

270 Os resíduos orgânicos (alga, casca de caranguejo, concha de marisco e repolho) não inibiram a
271 germinação dos microconídios de *F. circinatum*. Em casa de vegetação também não foram
272 observados efeitos dos resíduos orgânicos e de *T. harzianum* sobre a mortalidade de plântulas,
273 causada por *F. circinatum*, nem sobre a promoção de crescimento de *P. radiata*.

274

275

AGRADECIMENTOS

276 Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelas
277 bolsas de estudos no período, e a Universidad de Concepción pela estrutura.

278

279

LITERATURA CITADA

280 Alonso, R. e L. Bettucci. 2009. First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum*
281 affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. Australasian Plant Disease Notes 4:91-92.

282 Araújo, I.B., L.A.M. Peruch, M.J. Stadnik. 2012. Efeito do extrato de alga e da argila silicatada na
283 severidade da alternariose e na produtividade da cebolinha comum (*Allium fistulosum* L.).

284 Tropical Plant Pathology 37:363-367.

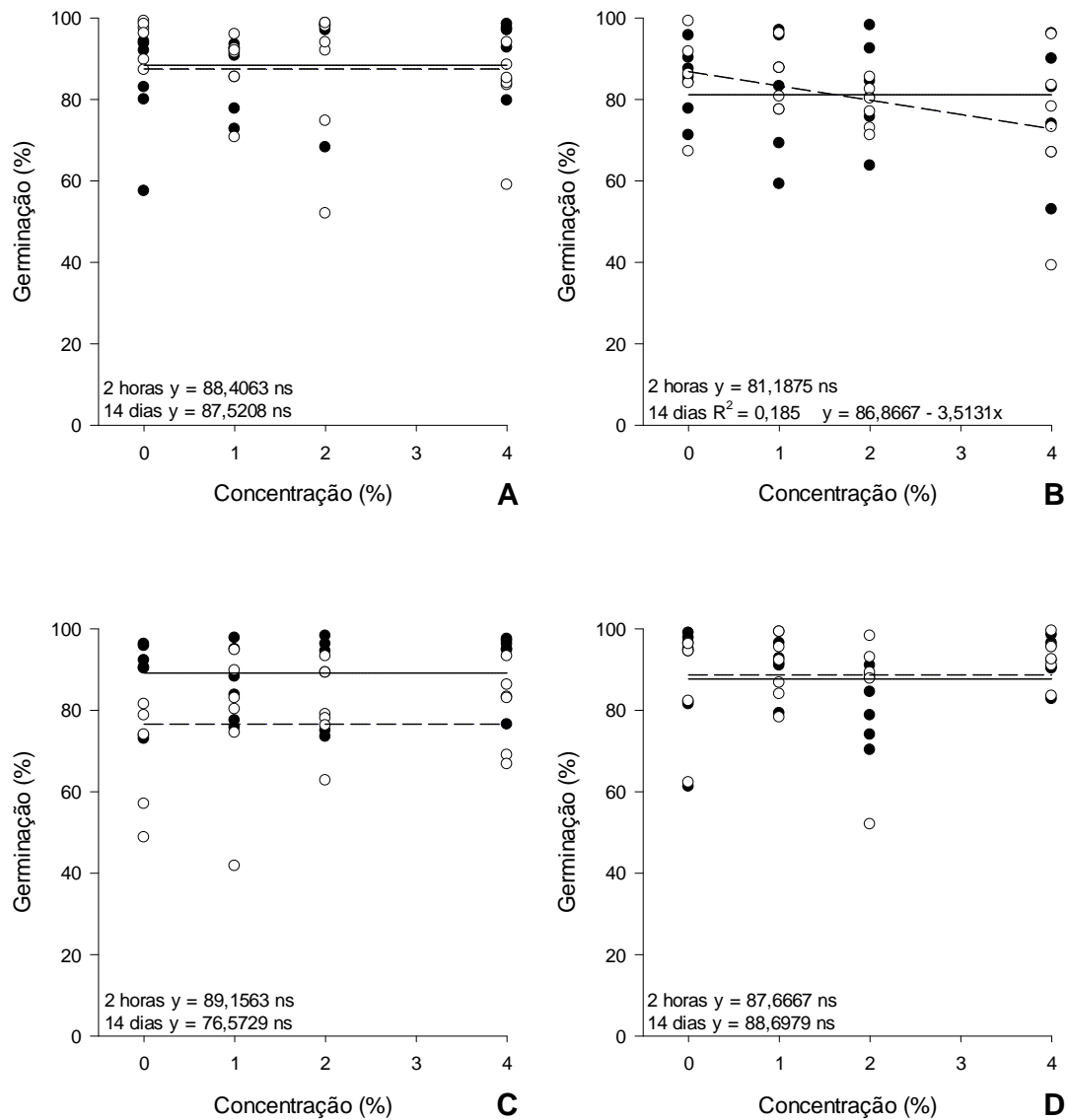
- 285 Baloch, G.N., S. Tariq, S. Ehteshamul-Haque, M. Athar, V. Sultana, J. Ara. 2013. Management of
286 root diseases of eggplant and watermelon with the application of asafoetida and seaweeds.
287 Journal of Applied Botany and Food Quality 86:138-142.
- 288 Benchimol, R.L., J.C. Sutton, M.B. Dias-Filho. 2006. Potencialidade da casca de caranguejo na
289 redução da incidência de Fusariose e na promoção do crescimento de mudas de Pimenteira-do-
290 Reino. Fitopatologia Brasileira 31:180-184.
- 291 Bettiol, W., C. Forner, L.P.V. Mattos. 2014. Development of suppressiveness to *Fusarium*
292 *oxysporum* in container media and soil amended with fish emulsion and fish hydrolyzed. Acta
293 Horticulturae 1044:133-138.
- 294 Coutinho, T.A., E.T. Steenkamp, K. Mongwaketsi, M. Wilmot, M.J. Wingfield. 2007. First
295 outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. Australasian Plant Pathology
296 36:256-261.
- 297 Fourie, G., M.J. Wingfield, B.D. Wingfield, N.B. Jones, A.R. Morris, E.T. Steenkamp. 2014.
298 Culture-independent detection and quantification of *Fusarium circinatum* in a pine-producing
299 seedling nursery. Southern Forests 76:137-143.
- 300 Gonçalves, A.E. e M.J. Stadnik. 2012. Interferência de ulvana no desenvolvimento e melanização
301 de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*. Tropical Plant Pathology 37:431-437.
- 302 Gordon, T.R. 2006. Pitch canker disease of pines. Phytopathology 96:657-659.
- 303 Gordon, T.R., A.J. Storer, D.L. Wood. 2001. The Pitch Canker Epidemic in California. Plant
304 Disease 85:1128-1139.
- 305 Hepting, G.H. e E.R. Roth. 1946. Pitch Canker, a new disease of some Southern Pines. Journal of
306 Forestry 44:742-744.
- 307 Jacobs, A., T.A. Coutinho, M.J. Wingfield, R. Ahumada, B.D. Wingfield. 2007. Characterization
308 of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Chile. South African Journal of Science
309 103:253-257.
- 310 Larkin, R.P. e T.S. Griffin. 2007. Control of soilborne potato diseases using *Brassica* green
311 manures. Crop Protection 26:1067-1077.
- 312 Martín-Rodrigues, N., S. Espinel, J. Sanchez-Zabala, A. Ortíz, C. González-Murua, M.K.
313 Duñabeitia. 2013. Spatial and temporal dynamics of the colonization of *Pinus radiata* by
314 *Fusarium circinatum*, of conidiophora development in the pith and of traumatic resin duct
315 formation. New Phytologist 198:1215-1227.
- 316 Martín-Rodrigues, N., J. Sanchez-Zabala, I. Salcedo, J. Majada, C. González-Murua, M.K.
317 Duñabeitia. 2015. New insights into radiata pine seedling root infection by *Fusarium*
318 *circinatum*. Plant Pathology 64:1336-1348.
- 319 Martínez-Álvarez, P., F.M. Alves-Santos, J.J. Diez. 2012. In Vitro and In Vivo Interactions
320 between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. Silva Fennica 46:303-316.

- 321 Moraga-Suazo, P., A. Opazo, S. Zaldúa, G. González, E. Sanfuentes. 2011. Evaluation of
322 *Trichoderma* spp. And *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus*
323 *radiata* seedlings. Chilean Journal of Agricultural Research 71:412-417.
- 324 Mowlick, S., H. Yasukawa, T. Inoue, T. Takehara, N. Kaku, K. Ueki, A. Ueki. 2013. Suppression
325 of spinach wilt disease by biological soil disinfestation incorporated with *Brassica juncea* plants
326 in association with changes in soil bacterial communities. Crop Protection 54:185-193.
- 327 Paulert, R., V. Talamini, J.E.F. Cassolato, M.E.R. Duarte, M.D. Nosedá, A. Smania, M.J. Stadnik.
328 2009. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva*
329 *fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal
330 of Plant Diseases and Protection 116:263-270.
- 331 Pfenning, L.H., S.D. Costa, M.P. de Melo, H. Costa, J.A. Ventura, C.G. Auer, A.F. dos Santos.
332 2014. First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker
333 in Brazil. Tropical Plant Pathology 39:210-216.
- 334 Romón, P., M. Troya, M.E.F. de Gamarra, A. Eguzkitza, J.C. Iturrondobeitia, A. Goldarazena.
335 2008. Fungal communities associated with pitch canker disease of *Pinus radiata* caused by
336 *Fusarium circinatum* in northern Spain: association with insects and pathogen-saprophyte
337 antagonistic interactions. Canadian Journal of Plant Pathology 30:241-253.
- 338 Rose, S., M. Parker, Z.K. Punja. 2003. Efficacy of biological and chemical treatments for control of
339 fusarium root and stem rot on greenhouse cucumber. Plant Disease 87:1462-1470.
- 340 Smolinska, U., M.J. Morra, G.R. Knudsen, R.L. James. 2003. Isothiocyanates produced by
341 Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. Plant Disease 87:407-412.
- 342 Soria, S., R. Alonso, L. Bettucci. 2012. Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol
343 agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'donnell. Chilean Journal of Agricultural
344 Research 72:281-284.
- 345 Steenkamp, E.T., C.A. Rodas, M. Kvas, M.J. Wingfield. 2012. *Fusarium circinatum* and pitch
346 canker of *Pinus* in Colombia. Australasian Plant Pathology 41:483-491.
- 347 Wingfield, M.J., A. Hammerbacher, R.J. Ganley, E.T. Steenkamp, T.R. Gordon, B.D. Wingfield,
348 T.A. Coutinho. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - a growing threat to pine
349 plantations and forests worldwide. Australasian Plant Pathology 37:319-334.



350

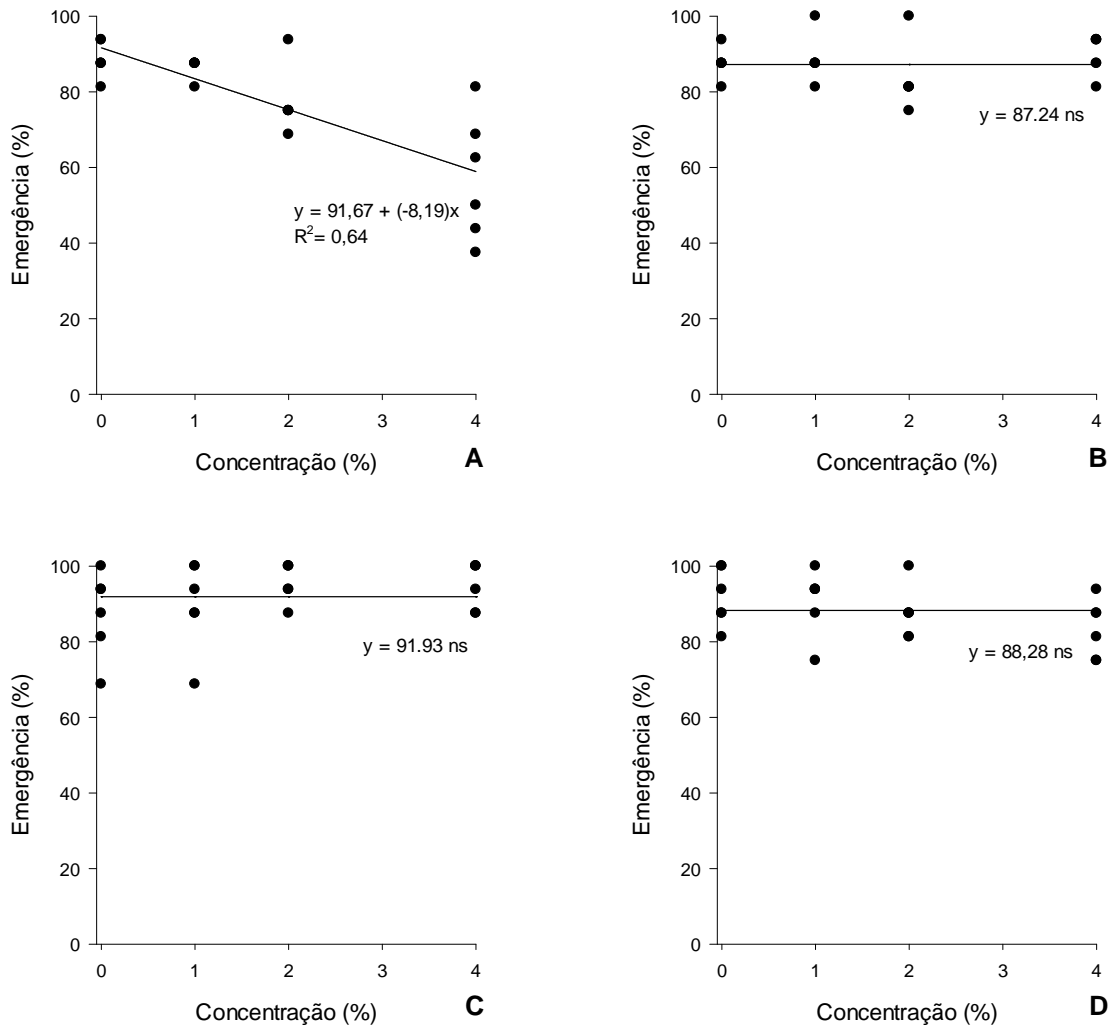
351 **Figura 1.** Suportes construídos para receberem as membranas contendo microconídios de352 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*.



353

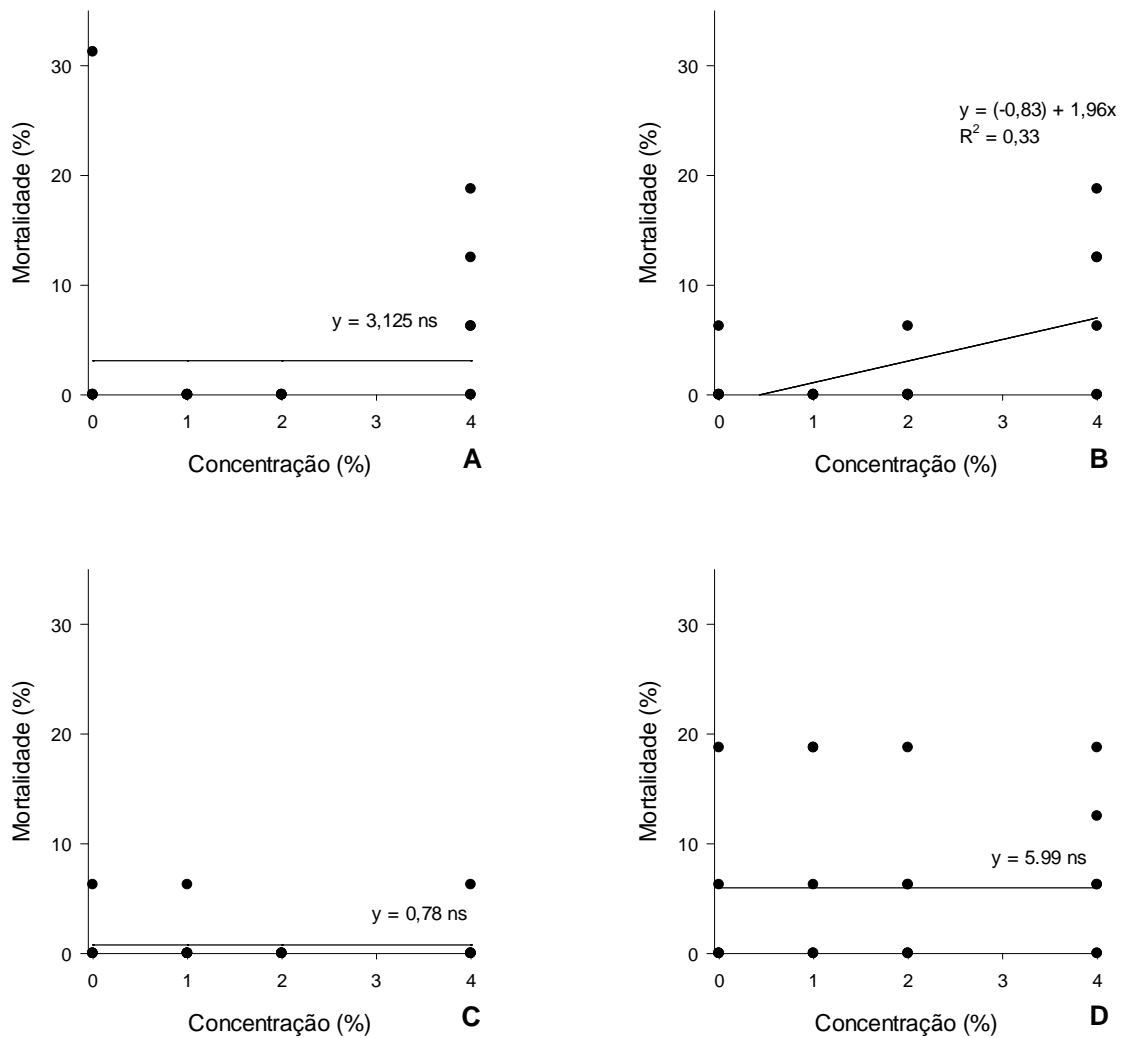
354 **Figura 2.** Efeito da incorporação de alga (A), concha de marisco (B), casca de caranguejo (C) e355 repolho (D) em substrato sobre a germinação de microconídios de *Fusarium circinatum*, 2 h (●)

356 (—) e 14 dias (○) (---) após a incorporação. Média dos dois ensaios.



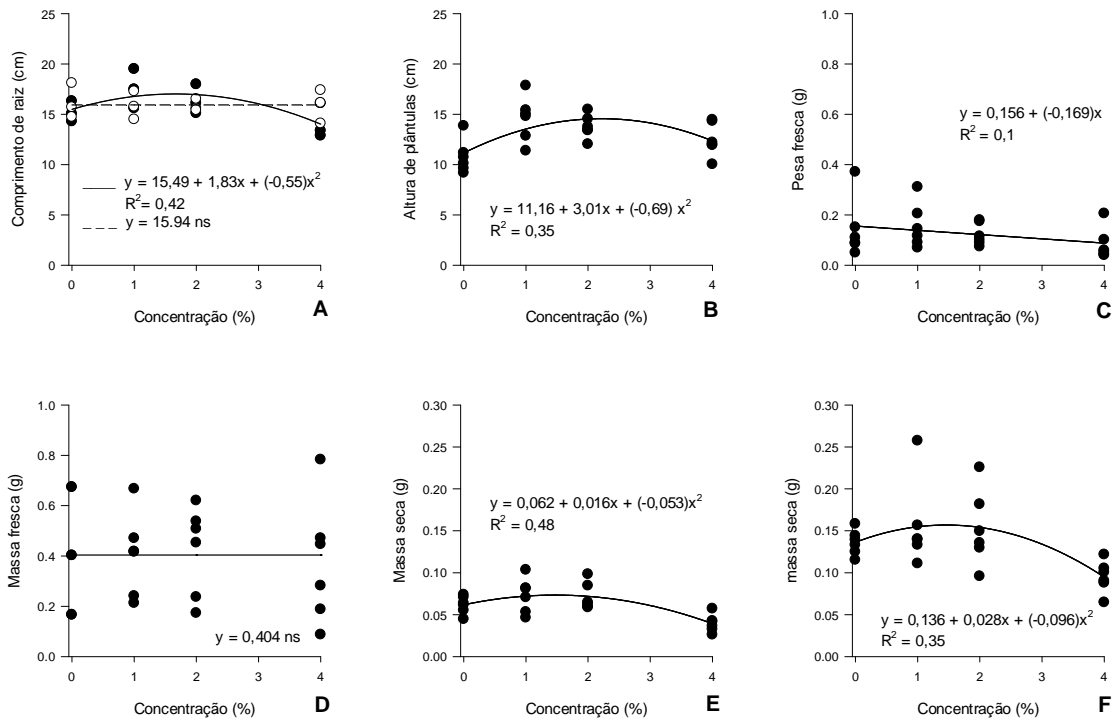
357

358 **Figura 3.** Efeito da incorporação de alga (A), casca de caranguejo (B), concha de marisco (C) e
 359 repolho (D) em substrato infestado com *Fusarium circinatum*, associado ou não a *Trichoderma*
 360 *harzianum*, sobre a emergência de *Pinus radiata*.



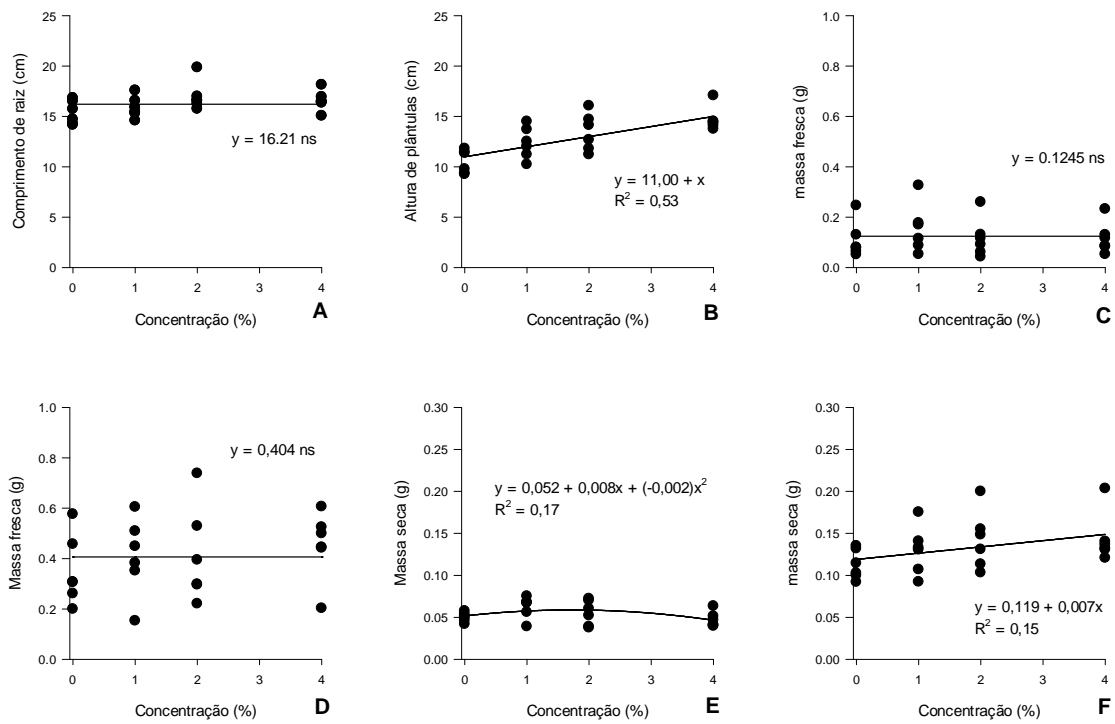
361

362 **Figura 4.** Efeito da incorporação de alga (A), casca de caranguejo (B), concha de marisco (C) e363 repolho (D) em substrato infestado com *Fusarium circinatum*, associado ou não a *Trichoderma*364 *harzianum*, sobre a mortalidade de *Pinus radiata*.



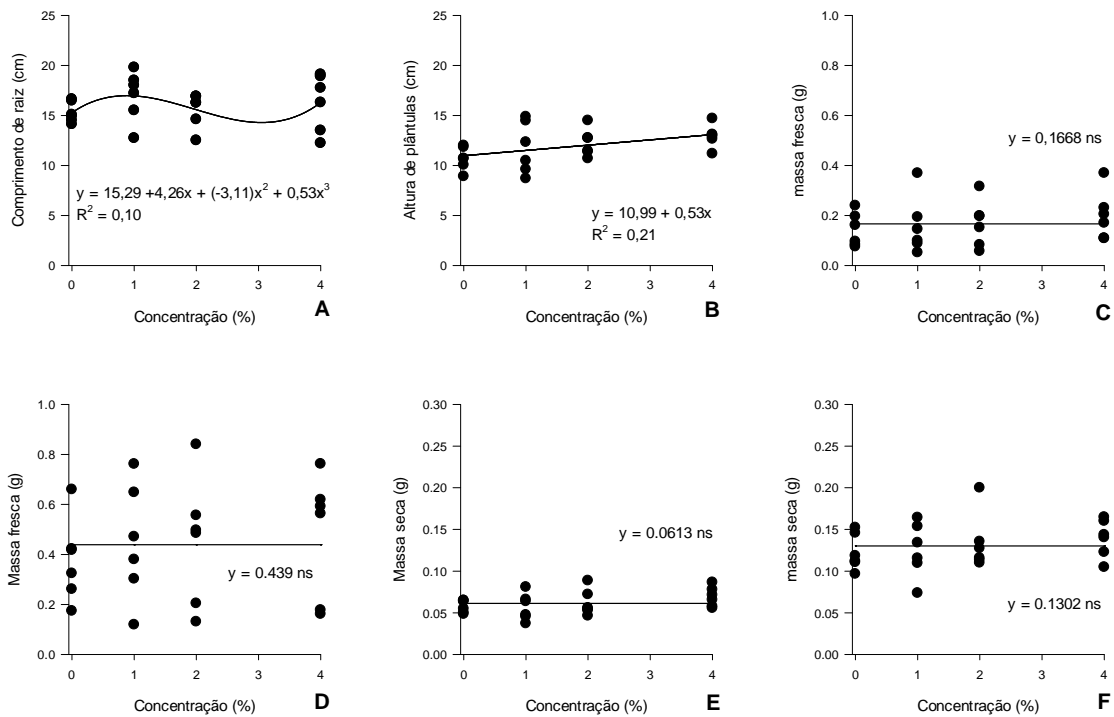
365

366 **Figura 5.** Efeito da incorporação de alga em substrato infestado com *Fusarium circinatum*,
 367 associado (-) ou não (-) a *Trichoderma harzianum*, sobre o comprimento de raiz (A), altura de
 368 planta (B), massa fresca de raiz (C), massa fresca de parte aérea (D), massa seca de raiz (E) e massa
 369 seca de parte aérea (F) de *Pinus radiata*.



370

371 **Figura 6.** Efeito da incorporação de casca de caranguejo em substrato infestado com *Fusarium*
 372 *circinatum*, associado ou não a *Trichoderma harzianum*, sobre o comprimento de raiz (A), altura de
 373 planta (B), massa fresca de raiz (C), massa fresca de parte aérea (D), massa seca de raiz (E) e massa
 374 seca de parte aérea (F) de *Pinus radiata*.



375

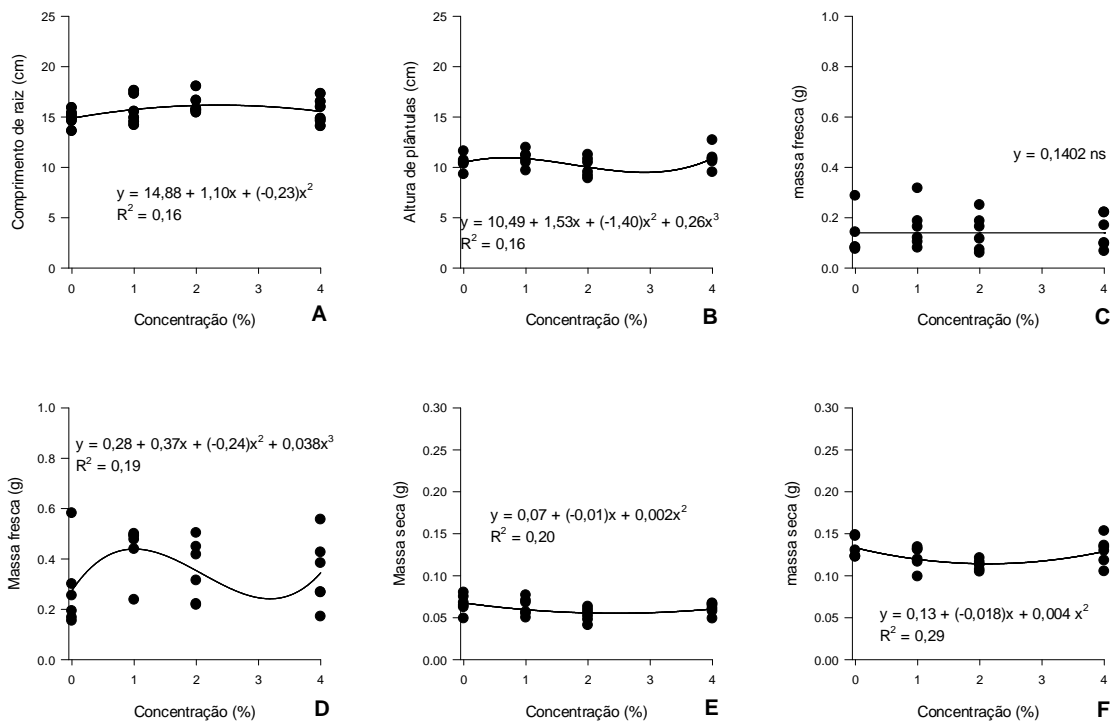
376

377

378

379

Figura 7. Efeito da incorporação de concha de marisco em substrato infestado com *Fusarium circinatum*, associado ou não a *Trichoderma harzianum*, sobre o comprimento de raiz (A), altura de planta (B), massa fresca de raiz (C), massa fresca de parte aérea (D), massa seca de raiz (E) e massa seca de parte aérea (F) de *Pinus radiata*.



380

381 **Figura 8.** Efeito da incorporação de repolho picado em substrato infestado com *Fusarium*
 382 *circinatum*, associado ou não a *Trichoderma harzianum*, sobre o comprimento de raiz (A), altura de
 383 planta (B), massa fresca de raiz (C), massa fresca de parte aérea (D), massa seca de raiz (E) e massa
 384 seca de parte aérea (F) de *Pinus radiata*.

CAPÍTULO 3

HIDROLISADO DE PEIXE ASSOCIADO A *Trichoderma harzianum* e *Bacillus* spp. NO CONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM EM TOMATEIRO

Este capítulo foi redigido em formato de artigo de acordo com as normas da revista
Tropical Plant Pathology

1 **Hidrolisado de peixe associado a *Trichoderma harzianum* e *Bacillus* spp. no controle**
2 **da murcha de *Fusarium* em tomateiro**

3 **Cassiano Forner^{1*}, Dalton Dorighello¹, Regiane Iost¹, Michelli dos Santos¹, Daniel**
4 **Winter Heck¹, Lúcio Bertoldo Costa^{1*}, Wagner Bettiol^{2*}**

5
6 ¹Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
7 Filho” (UNESP) Câmpus Botucatu, CEP 18.610-307 - Botucatu, SP, Brasil. ²Embrapa
8 Meio Ambiente, CP 69, 13820.000 Jaguariúna, SP. *Bolsista CNPq

9 Autor para correspondência: Cassiano Forner, e-mail: forner687@hotmail.com

10
11 **Resumo**

12 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) causa a murcha de *Fusarium* em tomateiro. A
13 raça 3, recentemente relatada no Brasil, encontra condições ideais para o seu
14 desenvolvimento e uma alternativa à inexistência de variedades resistentes pode ser o
15 controle biológico e materiais orgânicos na supressão do patógeno. No presente trabalho
16 foi avaliado o efeito de hidrolisado de peixe, associado ou não a *Trichoderma harzianum*
17 ou *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*, no controle de *Fol*. O hidrolisado de peixe,
18 nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20% do valor necessário para atingir a capacidade de
19 campo a partir do solo seco, foi incorporado no solo infestado com o patógeno, associado
20 ao tratamento das mudas com os bioagentes. No transcorrer dos ensaios foram mensurados
21 o pH, a condutividade elétrica e a atividade microbiana do solo, bem como a severidade da
22 doença. O hidrolisado de peixe estimulou a atividade microbiana, acidificou o solo e
23 aumentou a condutividade elétrica. Entretanto, não foram observados efeitos do
24 hidrolisado de peixe e dos bioagentes sobre a doença. O hidrolisado de peixe nas
25 concentrações elevadas causou fitotoxicidade às plantas.

26 **Palavras-chave:** Controle biológico, resíduo orgânico, supressividade.

27

28 **Abstract**

29 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) causes Fusarium wilt in tomato. The race 3
30 recently has being reported in Brazil, place where found good conditions to the
31 development. As an alternative to the inexistence of resistant varieties, the biological
32 control and organic matter in suppression of the pathogen may be used. The study
33 evaluated the effect of fish hydrolyzed, with or without the *Trichoderma harzianum* or
34 *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* in the control of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
35 In the infested soil with pathogen was incorporated the fish hydrolyzed at concentration of
36 0, 5, 10, 15 and 20% of volume of water required to reach the water capacity of the soil,
37 from the dry soil, associated or not with the treatment of seedlings with bioagents. In the
38 tests were measured the pH, electrical conductivity and soil microbial activity as well as
39 the disease severity. The fish hydrolyzed stimulated the soil microbial activity, acidify the
40 soil and increased the electrical conductivity. However, did not have effect of fish
41 hydrolyzed and bioagents over the disease. The hydrolyzed in high concentrations caused
42 phytotoxicity to the plants.

43 **Keywords:** Biological control, organic matter, suppressiveness.

44

45 **INTRODUÇÃO**

46 A murcha de Fusarium do tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*
47 (*Fol*), é uma das principais doenças da cultura. O patógeno está presente nos principais
48 centros produtores de tomate do mundo (Reis et al., 2005). Os sintomas típicos da murcha
49 de Fusarium caracterizam-se pelo amarelecimento das folhas baixas, progredindo para

50 as folhas superiores e o escurecimento vascular (castanho avermelhado) que se estende até
51 o ápice da planta (Grattidge & O'Brien, 1982).

52 As principais variedades comerciais de tomate possuem resistência às raças 1 e 2 de *Fol*,
53 mas desde o relato da raça 3 de *Fol*, na Austrália em 1978 (Grattidge & O'Brien, 1982),
54 houve necessidade de desenvolver métodos alternativos para o seu controle. No Brasil, a
55 raça 3 foi identificada pela primeira vez em Venda Nova do Imigrante, ES (Reis
56 et al., 2005). No ano seguinte foi relatada em São José de Ubá e Itaocara, RJ, sugerindo
57 que a ocorrência quase simultânea dessa raça em regiões geográficas distantes pode ser
58 devido a lotes de sementes contaminadas (Reis & Boiteux, 2007). Marlatt et al. (1996)
59 identificaram diferenças de grupos de compatibilidade entre isolados de *Fol* raça 3 (VCG
60 0030 e 0033) de diferentes regiões dos Estados Unidos da América. Ainda, estes dois
61 grupos apresentaram duas populações geneticamente distintas, sugerindo duas linhas de
62 evolução. Cai et al. (2003), utilizando métodos moleculares, sugeriram que a raça 3 de *Fol*,
63 presente na Califórnia, é originária de uma população local de *Fol* raça 2.

64 Como alternativa para o controle da doença, pode-se lançar mão do controle biológico.
65 Castaño et al. (2013), trabalhando com *Fusarium solani* (305) e *Streptomyces* sp. (A19),
66 isolados da rizosfera de plantas sadias de tomate desenvolvidas em composto de resíduos
67 de uva e cortiça, respectivamente, verificaram redução da área abaixo da curva do
68 progresso da doença, causado por *Fol* raça 2, em substrato à base de fibra de coco,
69 conducente ao patógeno. Em substrato moderadamente supressivo (composto de cortiça),
70 *Streptomyces* sp. (A19) aumentou o nível de supressividade.

71 Cawoy et al. (2011), em uma revisão sobre o gênero *Bacillus*, discutem as vantagens e os
72 principais mecanismos de ação deste gênero como agente de biocontrole, destacando a
73 antibiose, a competição e a indução de resistência. Dentre as vantagens, se destacam a sua
74 não patogenicidade e a formação de endósporo. O potencial de *B. subtilis* e *Bacillus*

75 *licheniformis* foi demonstrado por Touré et al. (2004), Ongena et al. (2005b), Baysal et al.
76 (2008), Wang et al. (2009) e Yang et al. (2009) no controle de fitopatógenos, como *F.*
77 *oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia*
78 *sclerotiorum*, *Rhizopus* sp., *Botrytis cinerea*, *Dothiorella gregaria*, *Gibberella zeae*,
79 *Colletotrichum gossypii* e *Bipolaris maydis*. Baysal et al. (2008) e Grover et al. (2010)
80 demonstraram que diversos isolados de *B. subtilis* produziram iturina, fengicina, surfactina
81 e bacilomicina que possuem ação contra diversos fitopatógenos.

82 O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos de vida livre do solo, que podem
83 ser simbiontes oportunistas de plantas. Algumas espécies podem induzir de resistência e
84 promover o crescimento em plantas, ou antagonizar patógenos por parasitismo e antibiose
85 (Harman et al., 2004). Diversos são os relatos desse antagonista no controle de *Fusarium*
86 sp., como os isolados de *T. harzianum* (CEN202, CEN234, CEN238 e CEN240) reduzindo
87 a incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro (CARVALHO et al., 2011), *T.*
88 *harzianum* (T22) no controle de murcha de *Fusarium* em alface (GILARDI et al., 2007), *T.*
89 *harzianum* (T-78) controlando *F. oxysporum* f. sp. *melonis* em melões (BERNAL-
90 VICENTE et al., 2009) e *Trichoderma asperellum* (T34) reduzindo a doença causada por
91 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro (SEGARRA et al., 2010).

92 Alguns materiais orgânicos tem a habilidade de induzir a supressividade de solos ou de
93 substratos a patógenos específicos. O composto de lodo de esgoto induziu a supressividade
94 a *F. oxysporum* f. sp. *crysanthemi* (Pinto et al., 2013); a emulsão de peixe controlou *R.*
95 *solani* e *P. aphanidermatum* em rabanete e pepino (Abbasi et al., 2004), murcha de
96 *Verticillium* em berinjela e sarna da batata (Abbasi et al., 2006) e *Verticillium dahliae*
97 (Abbasi et al., 2009). O hidrolisado de peixe reduziu o crescimento micelial e a
98 germinação de conídios de *Cylindrocladium spathiphylli*, além de reduzir a doença em
99 espatifilo em casa de vegetação, por até 60 dias, em substrato à base de casca de pinus

100 (Visconti et al., 2010). O hidrolisado de peixe também suprimiu *Fol* raça 3 (isolados 145,
101 146 e 149) em tomateiro, nas concentrações de 5 a 50% do volume de água necessário para
102 atingir a capacidade de campo, em substrato composto por 40% de substrato à base de
103 casca de pinus e 60% de solo (Mattos & Bettiol, 2007).

104 A associação de esterco de ovelha (6 e 10%) com *T. harzianum* (Jn14) apresentou efeito
105 sinérgico no controle de *Fol*, quando comparado aos tratamentos isolados, durante 28
106 meses, diminuindo a população de *Fol* no solo (Barakat & Al-Masri, 2009).

107 Considerando a possibilidade de realizar manejo da murcha do Fusarium utilizando
108 diversos métodos alternativos, o presente trabalho teve como objetivo estudar o controle de
109 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por meio de hidrolisado de peixe associado ou não a *T.*
110 *harzianum* e *B. subtilis* + *B. licheniformis*.

111

112 **MATERIAL E MÉTODOS**

113 Foram utilizados dois isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (149 e 157),
114 cedidos pelo Dr. Rômulo Kobori, da Sakata Seeds Sudamérica. Os isolados foram
115 multiplicados em meio batata-dextrose-ágar suplementado por estreptomicina (0,1%), por
116 sete dias. Em seguida, foram transferidos para meio batata-dextrose e incubados por 31 e
117 24 dias, respectivamente para *Fol* 149 e *Fol* 157, para a produção de microconídios. Os
118 antagonistas utilizados foram os produtos comerciais à base de *T. harzianum* Iblf 006 e a
119 mistura de *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Nemix C, FMC).

120 Antes de realizar a incorporação do hidrolisado de peixe ao solo, foi determinada a
121 capacidade de campo do solo seco. Com esse resultado foi realizada a adição do
122 hidrolisado de peixe: testemunha (sem a adição de hidrolisado de peixe e sem a infestação
123 do solo com *Fol*), 0 (testemunha infestada com *Fol*), 5, 10, 15 e 20% do volume de água
124 para atingir a capacidade de campo do solo.

125 O experimento com o solo infestado com *Fol* e tratado com hidrolisado de peixe foi
126 realizado em esquema fatorial, no qual o Fator 1 consistiu nas concentrações de hidrolisado
127 de peixe e o Fator 2 no tratamento com ou sem *Trichoderma* ou *B. subtilis* + *B.*
128 *licheniformis*. Cada tratamento foi composto por 10 vasos, com uma planta de tomate cada
129 (considerado uma repetição por vaso). O delineamento utilizado foi o inteiramente
130 casualizado. O experimento foi conduzido com dois isolados de *Fol* (149 e 157), cada
131 isolado foi considerado um experimento independente. Cada ensaio foi realizado duas
132 vezes.

133

134 **Infestação do solo, incorporação do hidrolisado de peixe e tratamento de produtos** 135 **biológicos**

136 Vasos de 2,2 litros de capacidade foram completados com solo (latossolo amarelo, pH =
137 5,1; matéria orgânica = 18 g dm⁻³), previamente infestado com *Fol* 149 ou *Fol* 157 na
138 concentração de 10⁵ microconídios/mL de solo. Quatro dias após a infestação do solo, o
139 hidrolisado de peixe foi incorporado conforme indicado anteriormente.

140 Três dias após a incorporação do hidrolisado de peixe, amostras de solo das 10 repetições
141 de cada tratamento foram coletadas e homogeneizadas para realizar medições de pH e
142 condutividade elétrica. Para tanto, três subamostras de 10 g de solo foram retiradas e
143 depositadas em três diferentes frascos de plástico. A seguir, foi adicionado 25 mL de água
144 deionizada em cada frasco, que foram agitados a 120 rpm por 30 minutos. Passado o
145 período, os frascos foram mantidos em repouso por 2 h, quando se realizou a leitura do pH
146 com auxílio de um medidor de pH de bancada. Para a análise da condutividade elétrica, a
147 metodologia foi basicamente a mesma descrita para avaliação do pH, mas utilizando 50
148 mL de água deionizada e o repouso por uma noite. A leitura da condutividade elétrica (μS

149 cm^{-1}) foi realizada com auxílio de um condutivímetro portátil: Cond 3110. As análises
150 foram realizadas em intervalos de 15 dias, num total de cinco avaliações.

151 Sete dias após a incorporação de hidrolisado de peixe, foram transplantadas mudas de
152 tomateiro cultivar Santa Clara, com 30 dias de idade, cujo sistema radicular, juntamente
153 com o substrato, foram imersos por cinco minutos em uma suspensão de 2×10^8
154 conídios/mL de *Trichoderma harzianum* e $3,2 \times 10^8$ UFC/mL de solo para a mistura
155 contendo dois isolados de *Bacillus* (*B. subtilis* + *B. licheniformis*). A adubação foi
156 realizada semanalmente com 2 g do formulado NPK 10:10:10, a partir da segunda semana
157 após o transplante das mudas de tomateiro.

158 Devido a morte de plantas, possivelmente por fitotoxidez ou compactação do solo e
159 consequente encharcamento, pela aplicação de hidrolisado de peixe, principalmente nas
160 doses mais altas, houve substituição das plantas mortas sete dias após o primeiro
161 transplante. Grande parte dessas plantas substitutas também morreram.

162 A severidade foi avaliada por meio de duas escalas de notas modificadas, a partir da
163 proposta de Tokeshi and Galli (1966). Assim, para os sintomas externos utilizou-se as
164 seguintes notas: 1 - planta sem sintomas; 2 - planta com amarelecimento até a segunda
165 folha; 3 - planta com amarelecimento até a terceira folha; 4 - planta com murcha e sem
166 amarelecimento; 5 - planta com murcha e amarelecimento; 6 - planta morta. Os sintomas
167 externos foram avaliados a cada duas semanas. Na primeira repetição dos experimentos
168 foram realizadas quatro avaliações. Para o segundo experimento foram realizadas cinco
169 avaliações. Com os resultados destas avaliações foram calculadas as áreas abaixo da curva
170 de progresso da doença (AACPD). Para os sintomas internos a escala de nota utilizada foi:
171 1 - planta sem escurecimento dos vasos; 2 - planta com escurecimento dos vasos até a
172 altura da primeira folha; 3 - planta com escurecimento dos vasos até a segunda folha; 4 -
173 planta com escurecimento dos vasos até a terceira folha; 5 - planta com escurecimento dos

174 vasos até a metade do comprimento do caule; 6 - planta com escurecimento até próximo ao
175 ponteiro. Para esta avaliação, 13 semanas após o transplante das plantas, foi realizado o
176 corte longitudinal e avaliado o escurecimento vascular.

177 Para avaliar o desprendimento de CO₂ do solo um novo experimento foi realizado, de
178 forma semelhante ao descrito anteriormente, exceto que os vasos foram mantidos em uma
179 câmara de incubação a 22 ± 2 °C. Um dia após a incorporação do hidrolisado de peixe,
180 realizou-se a medição do CO₂ desprendido, com auxílio de um IRGA a cada duas semanas,
181 até atingir um total de cinco avaliações. O experimento foi repetido duas vezes.

182

183 **Análise estatística**

184 Nos ensaios de respiração do solo por desprendimento de CO₂ foi realizada a análise de
185 variância e os dados foram submetidos à análise de regressão, considerando a significância
186 até nível de terceiro grau.

187 Com os dados da avaliação dos sintomas externos (AACPD) e internos foram realizadas as
188 análises de variância das médias dos tratamentos.

189

190 **RESULTADOS**

191 **Severidade da doença**

192 Como nas concentrações de 15 e 20% houve forte compactação do solo e/ou fitotoxicidade
193 que ocasionaram morte das plantas, esses tratamentos foram excluídos da análise. Para
194 ambos experimentos com os dois isolados de *Fol* não houve interação significativa entre os
195 tratamentos biológicos e o hidrolisado de peixe quando analisados os sintomas internos.
196 Diferenças foram observadas entre o tratamento não infestado com *Fol* e os demais
197 tratamentos. O hidrolisado de peixe não reduziu a doença até a concentração de 10% do
198 volume para atingir a capacidade de campo (Tabelas 1). Considerando os sintomas

199 externos, nos ensaios com os dois isolados de *Fol*, nenhuma das concentrações estudadas
200 de hidrolisado de peixe reduziu a severidade da doença (Tabela 2).

201

202 **pH e condutividade elétrica**

203 A adição de hidrolisado de peixe, principalmente nas concentrações de 10, 15 e 20% do
204 volume necessário para atingir a capacidade de campo, inicialmente reduziram o pH do
205 solo. Isso foi menos visível após a quinta semana, onde a maioria dos tratamentos
206 apresentaram valores similares aos tratamentos testemunha (sem adição de hidrolisado de
207 peixe e sem a infestação de *Fol*) e 0% (sem adição de hidrolisado de peixe e infestado com
208 *Fol*). Após a sétima semana, o tratamento com 20% de hidrolisado de peixe apresentou
209 valores de pH superiores a testemunha ou o tratamento 0% (Figura 1A).

210 Os tratamentos sem a adição de hidrolisado de peixe (testemunha e 0%) apresentaram
211 valores iniciais de condutividade elétrica baixa e com o passar das semanas houve um
212 incremento desses valores. A adição de hidrolisado de peixe, em todas as concentrações,
213 aumentou a condutividade elétrica do solo, onde as maiores concentrações proporcionaram
214 maiores aumentos (Figura 1B).

215 Não foi observado efeito consistente dos produtos biológicos sobre o pH e a condutividade
216 elétrica do solo.

217

218 **Desprendimento de CO₂**

219 Com o aumento da concentração de hidrolisado de peixe incorporado ao solo foi verificado
220 aumento no desprendimento do CO₂, sendo esse aumento proporcional à concentração do
221 produto. As concentrações de 5% e 10% apresentaram praticamente o mesmo
222 comportamento, sendo que o desprendimento de CO₂ foi, aproximadamente, três vezes
223 maior do que a testemunha até a terceira semana. A partir da quinta e sétima semana, as

224 concentrações de 5% e 10% respectivamente, não diferiram da testemunha e testemunha
225 infestada (0%).

226 Nas concentrações de 15 e 20% o desprendimento de CO₂ foi entre 10 e 15 vezes superior
227 à testemunha e três vezes superior que as concentrações de 5 e 10%. Também para as
228 maiores concentrações ocorreu uma redução no desprendimento de CO₂ com o transcorrer
229 da avaliação, sendo que na nona semana praticamente, em todos os tratamentos os valores
230 foram semelhantes. Para a concentração de 20%, o pico máximo obtido foi na terceira
231 semana, com aproximadamente 25.000 ppm de CO₂. Foi atingida intensa degradação da
232 matéria orgânica no início da incorporação do hidrolisado de peixe até praticamente se
233 igualar à testemunha e a testemunha infestada (0%) após nove semanas (Figura 2).

234

235 **DISCUSSÃO**

236 Vários derivados da indústria pesqueira tem potencial no controle de doenças de plantas. A
237 supressão de microescleródios de *Verticillium dahliae* foi atribuída aos ácidos graxos
238 voláteis presentes na emulsão de peixe, como ácidos glicólico, acético, fórmico, *n*-butírico
239 e propiônico (Abbasi et al., 2009). Especificamente, o hidrolisado de peixe reduziu o
240 crescimento micelial e a germinação de conídios de *C. spathiphylli* e controlou a doença
241 em espatifilo em casa de vegetação por até 60 dias (Visconti et al., 2010), além de suprimir
242 *Fol* em tomateiro (Mattos, 2007; Mattos & Bettiol, 2007). No presente trabalho, o
243 hidrolisado de peixe não reduziu a severidade da doença causada por *Fol*, fato que também
244 pode estar relacionado com a agressividade dos isolados utilizados nos dois estudos ou a
245 forma de infestação do solo, bem como às características do solo, pois Mattos (2007)
246 utilizou um substrato enriquecido com matéria orgânica. Também uma alteração nas
247 características dos produtos ao longo do tempo pode explicar os diferentes efeitos.
248 Resultados similares foram obtidos por Pinto et al. (2010) em crisântemo, onde o aumento

249 da concentração do hidrolisado, proporcionou um aumento da doença causada por *F.*
250 *oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*.

251 No entanto, o trabalho de Mattos (2007) mostra um grande potencial do hidrolisado de
252 peixe no controle de *Fol* em plantas de tomateiro, onde concentrações de 5-50% de
253 hidrolisado de peixe a partir do volume de água necessário para atingir a capacidade de
254 campo controlaram a doença. No presente trabalho, foram aplicadas as concentrações de
255 hidrolisado de peixe a partir da capacidade de campo considerando o solo seco, o que
256 proporcionou maiores volumes de hidrolisado de peixe em aplicado no solo. Mattos (2007)
257 aplicou um volume de 12,5 mL de hidrolisado de peixe em 2,8 L de solo, correspondendo
258 a concentração de 5%. Enquanto no presente trabalho foram adicionados 49 mL de
259 hidrolisado de peixe em um volume de 2,2 L de solo, para a mesma concentração de 5%.

260 Ao contrário do esperado, esta maior concentração adicionada ao solo não controlou *Fol*.
261 Também foi observado, nas concentrações elevadas, problemas graves com a compactação
262 do solo e fitotoxidez. Pode estar associado à compactação o fato de ter utilizado apenas o
263 solo sem acréscimo de substrato à base de casca de pinus. Também o período de incubação
264 no presente estudo foi inferior ao utilizado por Mattos (2007).

265 A ausência de controle, no presente trabalho, pode ser explicada pelo solo utilizado. Mattos
266 (2007) utilizou uma mistura de 60% de substrato comercial e 40% de solo, enquanto no
267 presente trabalho utilizou-se apenas solo. Essa mistura pode proporcionar diferenças nas
268 propriedades físicas do solo, microbiota presente e pH do solo. Abbasi et al. (2009) atribui
269 a supressão de microescleródios de *V. dahliae* aos ácidos graxos voláteis presentes na
270 emulsão de peixe, os quais tem maior ação em pH mais ácido. Estes ácidos protegem
271 plântulas de pepino contra *Pythium ultimum* em solos orgânicos e franco-arenosos, mas
272 não em turfa, sugerindo que a ação tóxica da emulsão de peixe é dependente do solo e

273 substrato. Assim, para o hidrolisado de peixe, alterações do pH do solo podem influenciar
274 na liberação de compostos tóxicos ao patógeno.

275 Neste estudo, o hidrolisado de peixe, nas concentrações superiores de 10%, reduziram
276 inicialmente o pH do solo. Pinto et al. (2010) também observaram uma redução do pH com
277 o aumento da concentração de hidrolisado de peixe, contrariamente, Visconti et al. (2010),
278 obtiveram aumento do pH após a incorporação do hidrolisado de peixe, que atingiu valores
279 próximos ao tratamento sem aplicação, após 182 dias, mas este utilizou somente um
280 substrato à base de casca de pinus. No presente estudo foi observado o aumento do pH com
281 o passar das semanas, atingindo valores similares a testemunha e testemunha infestada com
282 o patógeno (0%), possivelmente devido a degradação dos compostos e a adição de
283 fertilizante a cada duas semanas.

284 A condutividade elétrica (CE) foi altamente influenciada pela adição de hidrolisado de
285 peixe, aumentando-a em todas as concentrações de hidrolisado. Pinto et al. (2010)
286 obtiveram aumento exponencial com a adição de hidrolisado de peixe ao substrato em
287 concentrações de 0-50%. De forma similar, Visconti et al. (2010) obtiveram aumento
288 linear da CE com a adição de hidrolisado de peixe (0-50%) no momento do plantio de
289 espatifilo, porém 182 dias após a adição, a CE atingiu valores similares a não aplicação de
290 hidrolisado de peixe. Mattos (2007) obteve um aumento linear com o aumento da
291 concentração de hidrolisado de peixe no substrato.

292 A partir da quinta semana, os tratamentos controle infestados e não infestados com o
293 patógeno iniciaram um aumento da condutividade elétrica, possivelmente devido à adição
294 de fertilizante químico. No entanto, a adição de hidrolisado de peixe possibilitou maior
295 condutividade elétrica por nove semanas.

296 A adição de hidrolisado de peixe aumentou instantaneamente o desprendimento de CO₂,
297 indicando uma elevação da atividade microbiana do solo. Isso é devido aos nutrientes

298 prontamente disponíveis, principalmente carbono e nitrogênio, estimulando a microbiota
299 do solo. Visconti et al. (2010) também observaram aumento da atividade microbiana do
300 substrato por meio do desprendimento de CO₂, carbono da biomassa microbiana e hidrólise
301 do diacetato de fluoresceína pela aplicação de hidrolisado de peixe. Fator que associaram
302 ao controle de *C. spathiphylli*.

303 No estudo foi observado um rápido declínio no desprendimento de CO₂, principalmente
304 nas menores concentrações, possivelmente a atividade microbiana é tão intensa nas
305 primeiras semanas que provoca exaustão dos nutrientes adicionados. A adição de
306 hidrolisado de peixe, nas concentrações 15 e 20%, mantiveram elevado desprendimento de
307 CO₂ por um maior período de tempo, possivelmente devido a maior oferta de nutrientes,
308 prolongando a atividade microbiana. Abbasi et al. (2004) apontam que a supressão
309 exercida pela emulsão de peixe contra *R. solani* e *P. aphanidermatum* em rabanete e
310 pepino está relacionada com o estímulo biológico do solo. Assim, o aumento da atividade
311 microbiana no solo pode ser um fator auxiliar no controle de fitopatógenos do solo.

312 Na literatura estão disponíveis diversos trabalhos relacionados a *Bacillus* sp. no controle de
313 fitopatógenos (Bais et al., 2004; Baysal et al., 2008; Grover et al., 2010; Ongena et al.,
314 2005a; Ongena et al., 2005b; Wang et al., 2009). No entanto, no presente trabalho não foi
315 observado controle consistente pela ação de *B. subtilis* + *B. licheniformis*. Possivelmente,
316 os isolados utilizados não produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento de *Fol*,
317 ou mesmo produzir lipopeptídeos, relacionados à indução de resistência de plantas
318 (Ongena et al., 2007).

319 Vários trabalhos mostram o potencial de *Trichoderma* sp. no controle de *Fusarium* sp.
320 (Bernal-Vicente et al., 2009; Carvalho et al., 2011; Gilardi et al., 2007). O isolado de *T.*
321 *harzianum*, utilizado neste trabalho, é registrado para o controle de *Sclerotinia*
322 *sclerotiorum*. Marzano et al. (2013) obtiveram o extrato orgânico de *Fol* (Fo2797), dos

323 quais um dos principais compostos é o ácido fusárico. Tanto o extrato quanto o ácido
324 fusárico foram altamente inibitórios ao crescimento de *T. harzianum* (Th908), motivo que
325 pode explicar a ausência de antagonismo contra *Fol* a campo. Os autores, através de
326 mutação UV-C, obtiveram um mutante de *T. harzianum* (Th908-5), resistente tanto ao
327 extrato quanto ao ácido fusárico produzidos por *Fol*. Este mutante obteve sucesso em
328 proteger plantas de tomate contra *Fol*. Assim, os isolados de *Fol* utilizados podem produzir
329 compostos que inibam e impossibilitem a ação antagonista de *Trichoderma harzianum*.

330 O objetivo final do trabalho foi associar materiais orgânicos com agentes de controle
331 biológicos no controle de *Fol*. Na literatura são encontrados trabalhos com sucesso na
332 associação de diferentes métodos no controle de patógenos de solo, como a mistura de
333 *Trichoderma viride* (Tv1), *Pseudomonas fluorescens* (Pf1) e *B. subtilis* (Bs16) com torta
334 de nim, esterco de animais e sulfato de zinco reduzindo a doença causada por
335 *Lasiodiplodia theobromae* em pinhão manso (Latha et al., 2011). A mistura de extrato de
336 *Allium cepa* x *Allium sativum* com *P. fluorescens* (Pf1 e Py15) e *B. subtilis* (Bs16)
337 apresentaram efeito sinérgico no controle de *Alternaria solani* em tomateiro. Ocorreu ação
338 direta sobre o patógeno e indução da resistência de plantas pelo acúmulo de peroxidase,
339 polifenol oxidase, fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanase, quitinase e fenóis (Latha et
340 al., 2009).

341 No entanto, algumas associações de controle não se mostraram promissoras. A mistura de
342 agentes de controle biológico (*T. virens*, *B. subtilis* e *R. solani*) apresentou resultados
343 inconsistentes quando associado com a rotação com colza e compostos à base de coníferas
344 (Bernard et al., 2014). A adição de biofertilizante, hidrolisado de peixe ou *T. asperellum*
345 [SF04 (URM-5911)] não proporcionou maior supressão do lodo de esgoto sobre *F.*
346 *oxysporum* f. sp. *crysanthemi* em crisântemo (Pinto et al., 2013).

347 No presente trabalho não foi obtido qualquer efeito sinérgico de hidrolisado de peixe
348 associados com *T. harzianum* ou *B. subtilis* + *B. licheniformis*.

349

350 **CONCLUSÃO**

351 Hidrolisado de peixe, *T. harzianum*, *B. subtilis* + *B. licheniformis* não reduziram a
352 severidade da doença causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomate. O hidrolisado
353 de peixe proporcionou aumento da condutividade elétrica e atividade microbiana do solo
354 mensurada pelo CO₂ do solo.

355

356 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

357 Abbasi PA, Conn KL, Lazarovits G (2004) Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium*
358 damping-off of radish and cucumber seedlings by addition of fish emulsion to peat mix or
359 soil. Canadian Journal of Plant Pathology 26:177-187.

360 Abbasi PA, Conn KL, Lazarovits G (2006) Effect of fish emulsion used as a preplanting
361 soil amendment on verticillium wilt, scab, and tuber yield of potato. Canadian Journal of
362 Plant Pathology 28:509-518.

363 Abbasi PA, Lazarovits G, Jabaji-Hare S (2009) Detection of high concentrations of organic
364 acids in fish emulsion and their role in pathogen or disease suppression. Phytopathology
365 99:274-281.

366 Bais HP, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of
367 *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and
368 surfactin production. Plant Physiology 134:307-319.

369 Barakat RM, Al-Masri MI (2009) *Trichoderma harzianum* in combination with sheep
370 manure amendment enhances soil suppressiveness of Fusarium wilt of tomato.
371 Phytopathologia Mediterranea 48:385-395.

- 372 Baysal Ö, Çaliskan M, Yesilova Ö (2008) An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis*
373 strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Physiological and
374 Molecular Plant Pathology 73:25-32.
- 375 Bernal-Vicente A, Ros M, Pascual JA (2009) Increased effectiveness of the *Trichoderma*
376 *harzianum* isolate T-78 against Fusarium wilt on melon plants under nursery conditions.
377 Journal of the Science of Food and Agriculture 89:827-833.
- 378 Bernard E, Larkin RP, Tavantzis S, Erich MS, Alyokhin A, Gross SD (2014) Rapeseed
379 rotation, compost and biocontrol amendments reduce soilborne diseases and increase tuber
380 yield in organic and conventional potato production systems. Plant and Soil 374:611-627.
- 381 Cai G, Gale LR, Schneider RW, Kistler HC, Davis RM, Elias KS, Miyao EM (2003)
382 Origin of Race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a Single Site in California.
383 Phytopathology 93:1014-1022.
- 384 Carvalho DDC, Mello SCM, Lobo M, Silva MC (2011) Controle de *Fusarium oxysporum*
385 f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro
386 comum por *Trichoderma harzianum*. Tropical Plant Pathology 36:28-34.
- 387 Castaño R, Borrero C, Trillas MI, Avilés M (2013) Selection of biological control agents
388 against tomato Fusarium wilt and evaluation in greenhouse conditions of two selected
389 agents in three growing media. Biocontrol 58:105-116.
- 390 Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, Ongena M (2011) *Bacillus*-based biological control of
391 plant diseases. In: Stoytcheva M (Ed.) Pesticides in the modern world - pesticides use and
392 management. Rijeka. InTech. pp. 273-302.
- 393 Gilardi G, Garibaldi A, Gullino ML (2007) Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and of
394 different commercial biofungicide formulations on Fusarium wilt of lettuce.
395 Phytoparasitica 35:457-465.

- 396 Grattidge R, O'Brien RG (1982) Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in
397 Queensland. *Plant Disease* 66:165-166.
- 398 Grover M, Nain L, Singh SB, Saxena AK (2010) Molecular and biochemical approaches
399 for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24.
400 *Current Microbiology* 60:99-106.
- 401 Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species -
402 Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56.
- 403 Latha P, Anand T, Prakasam V, Jonathan EI, Paramathma M, Samiyappan R (2011)
404 Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and
405 micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. *Applied*
406 *Soil Ecology* 49:215-223.
- 407 Latha P, Anand T, Ragupathi N, Prakasam V, Samiyappan R (2009) Antimicrobial activity
408 of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of
409 PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control* 50:85-
410 93.
- 411 Marlatt ML, Correll JC, Kaufmann P, Cooper PE (1996) Two genetically distinct
412 populations of *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant*
413 *Disease* 80:1336-1342.
- 414 Marzano M, Gallo A, Altomare C (2013) Improvement of biocontrol efficacy of
415 *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* through UV- induced
416 tolerance to fusaric acid. *Biological Control* 67:397-408.
- 417 Mattos LPV (2007) Potencial de hidrolisado de peixe para o controle de fitopatógenos.
418 Doutora, Universidade Federal de Lavras. Lavras.
- 419 Mattos LPV, Bettiol W (2007) Efeito do hidrolisado de peixe na severidade da murcha
420 causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 3 em tomateiro. In: Reunião

- 421 brasileira sobre controle biológico de doenças de plantas, Resumos... Campinas. Embrapa
422 Meio Ambiente. p. 68.
- 423 Ongena M, Duby F, Jourdan E, Beaudry T, Jadin V, Dommes J, Thonart P (2005a)
424 *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing
425 host resistance associated with differential gene expression. Applied Microbiology and
426 Biotechnology 67:692-698.
- 427 Ongena M, Jacques P, Touré Y, Destain J, Jabrane A, Thonart P (2005b) Involvement of
428 fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*.
429 Applied Microbiology and Biotechnology 69:29-38.
- 430 Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P
431 (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced
432 systemic resistance in plants. Environmental Microbiology 9:1084-1090.
- 433 Pinto ZV, Bettiol W, Morandi MAB (2010) Efeito de casca de camarão, hidrolisado de
434 peixe e quitosana no controle da murcha de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* em
435 crisântemo. Tropical Plant Pathology 35:16-23.
- 436 Pinto ZV, Morandi MAB, Bettiol W (2013) Induction of suppressiveness to Fusarium wilt
437 of chrysanthemum with composted sewage sludge. Tropical Plant Pathology 38:414-422.
- 438 Reis A, Boiteux LS (2007) Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in
439 commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. Horticultura
440 Brasileira 25:451-454.
- 441 Reis A, Costa H, Boiteux LS, Lopes CA (2005) First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp.
442 *lycopersici* Race 3 on Tomato in Brazil. Fitopatologia Brasileira 30:426-428.
- 443 Segarra G, Casanova E, Aviles M, Trillas I (2010) *Trichoderma asperellum* strain T34
444 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for
445 iron. Microbial Ecology 59:141-149.

- 446 Tokeshi H, Galli F (1966) Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Wr) Sny &
447 Hans em São Paulo. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 23:195-
448 209.
- 449 Touré Y, Ongena M, Jacques P, Guiro A, Thonart P (2004) Role of lipopeptides produced
450 by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea*
451 on apple. Journal of Applied Microbiology 96:1151-1160.
- 452 Visconti A, Bettiol W, Morandi MAB (2010) Efeito de hidrolisado de peixe sobre o
453 crescimento micelial e controle de *Cylindrocladium spathiphylli* em espatifilo. Summa
454 Phytopathologica 36:298-308.
- 455 Wang HL, Wen K, Zhao XY, Wang XD, Li AY, Hong HZ (2009) The inhibitory activity
456 of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant
457 growth-promoting effect. Crop Protection 28:634-639.
- 458 Yang DJ, Wang B, Wang JX, Chen Y, Zhou MG (2009) Activity and efficacy of *Bacillus*
459 *subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and Sclerotinia stem rot of rape. Biological
460 Control 51:61-65.

461 **Tabela 1.** Severidade da doença causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 149 e
 462 157 no sistema vascular (internos) de plantas de tomateiro tratadas com hidrolisado de
 463 peixe e os produtos biológicos à base de *Trichoderma harzianum* ou *Bacillus subtilis* e
 464 *Bacillus licheniformis*. Utilizando a escala de notas adaptada de Tokeshi and Galli (1966).

Tratamento	Nota			
	<i>Fol 149</i>		<i>Fol 157</i>	
*Controle	1,78	A	2,20	A
**0%	4,48	B	4,92	B
5%	5,50	C	5,23	B
10%	5,17	BC	4,80	B

465 Cada dado representa a média de dois experimentos.

466 *Tratamento controle com solo não infestado.

467 **Tratamento controle com solo infestado.

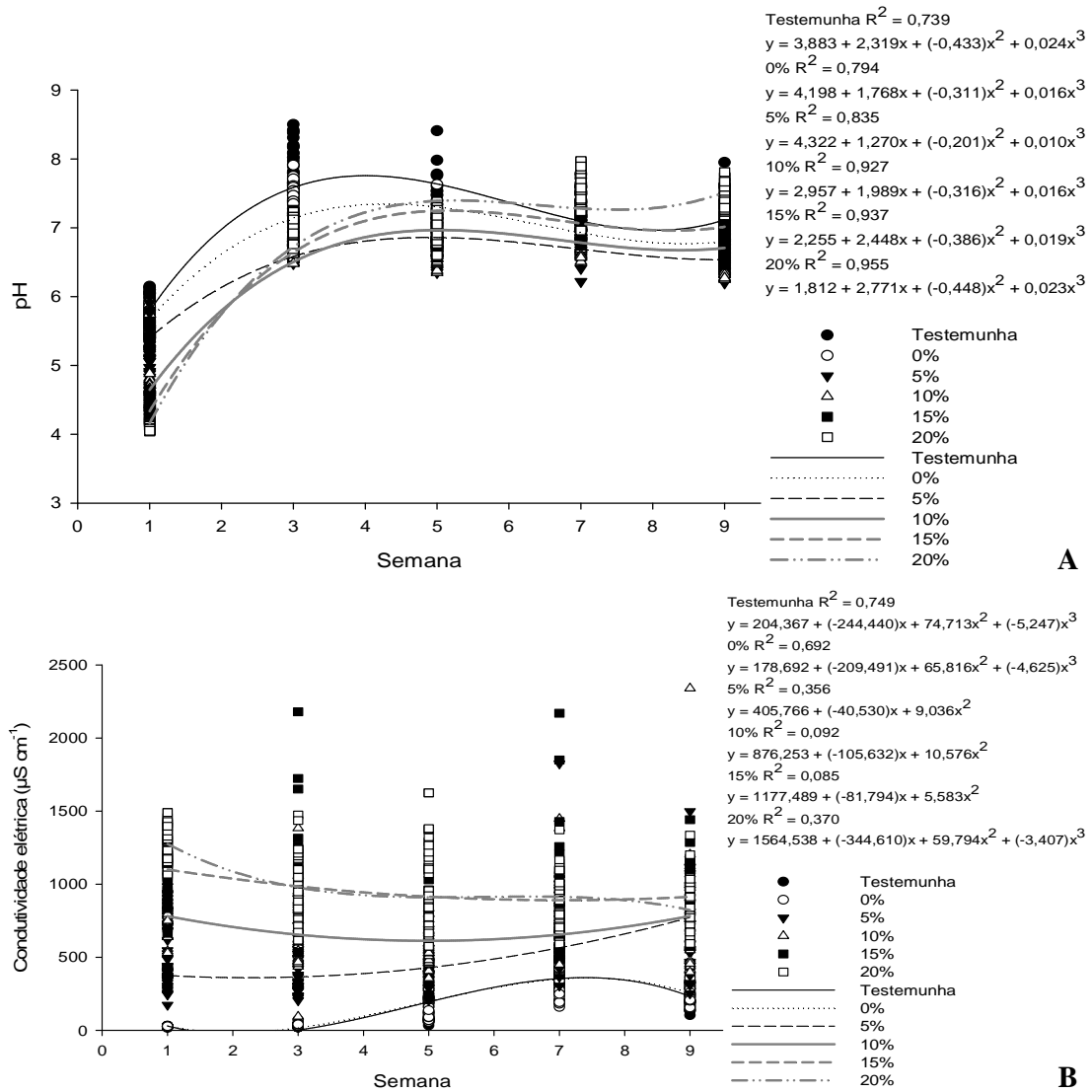
468 **Tabela 2.** Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) causada por *Fusarium*
 469 *oxysporum* f. sp. *lycopersici* 149 e 157 a partir dos sintomas externos em tomateiro
 470 cultivado em solo tratado com hidrolisado de peixe e os produtos biológicos à base de
 471 *Trichoderma harzianum* ou *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Utilizando a escala
 472 de notas adaptada de Tokeshi and Galli (1966).

Tratamento	AACPD			
	<i>Fol 149</i>		<i>Fol 157</i>	
*Controle	20,30	A	19,97	A
**0%	22,42	AB	22,82	AB
5%	22,58	AB	24,29	B
10%	25,45	B	30,27	C

473 Cada dado representa a média de dois experimentos.

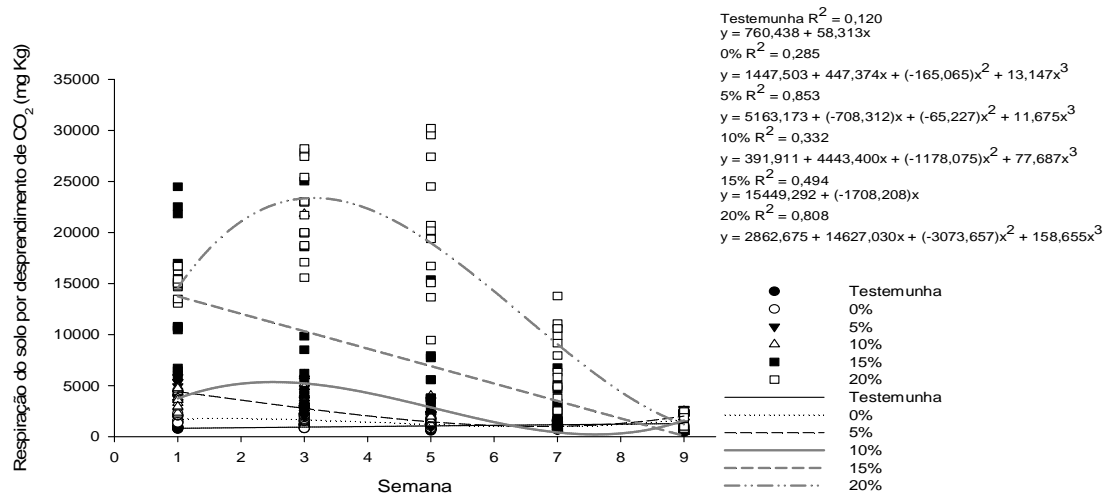
474 *Tratamento controle com solo não infestado.

475 **Tratamento controle com solo infestado.



476

477 **Figura 1.** Efeito do hidrolisado de peixe sobre o pH (A) e a condutividade elétrica (B) do478 solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



479 **Figura 2.** Efeito do hidrolisado de peixe no desprendimento de CO₂ do solo infestado com
 480 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O hidrolisado de peixe e a emulsão de peixe reduziram a germinação de microconídios de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*. A liberação de compostos tóxicos ou o estímulo da atividade microbiana, possivelmente, estão relacionados à supressão do fitopatógeno.

Os resíduos sólidos (casca de camarão, concha de marisco, caroço de abacate, alga, casca de caranguejo e repolho) não proporcionaram efeito na germinação dos microconídios dos patógenos testados (*F. oxysporum* f. sp. *lactucae* e *F. circinatum*), ou o controle de *F. circinatum* em casa de vegetação. Talvez, para esses resíduos, um maior período de degradação seria necessário para apresentar efeito na indução da supressividade. Outros efeitos, como a indução de resistência de planta podem estar associados a estes resíduos, mas não foram testados.

O hidrolisado de peixe não controlou a murcha de Fusarium em tomateiro. O tipo de solo e a comunidade microbiana presente podem ser fundamentais para tal controle, visto os exemplos na literatura com resultados variando nos diferentes tipos de solo/substrato testados. O pH também pode alterar a forma disponível dos compostos voláteis, alterando a eficácia na supressividade do solo.

Por fim, os agentes de biocontrole estudados não exerceram controle aos patógenos testados. Possivelmente, a especificidade seja um fator limitante que explicaria a ausência de controle. No caso de *T. harzianum* x *F. circinatum*, o baixo nível da doença pode ter mascarado um eventual controle do patógeno.

5 CONCLUSÕES

1. O hidrolisado e a emulsão de peixe inibiram a germinação de microconídios de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, quando incorporados ao solo.

2. A casca de camarão, a concha e marisco, o caroço de abacate e as algas não inibiram a germinação de microconídios de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, quando incorporados ao solo.

2. Alga, casca de caranguejo, concha de marisco e repolho não inibiram a germinação de microconídios de *F. circinatum* e não controlaram o cancro resinoso de pinus, mesmo quando associado a *Trichoderma*.

3. O hidrolisado de peixe não controlou a Murcha de Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) em tomateiro cultivado em um latossolo amarelo.

6 REFERÊNCIAS

ABBASI, P. A.; CONN, K. L.; LAZAROVITS, G. Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* damping-off of radish and cucumber seedlings by addition of fish emulsion to peat mix or soil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 26, n. 2, p. 177-187, Apr-Jun. 2004.

ABBASI, P. A.; CONN, K. L.; LAZAROVITS, G. Effect of fish emulsion used as a preplanting soil amendment on verticillium wilt, scab, and tuber yield of potato. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 28, n. 4, p. 509-518, Oct-Dec. 2006.

ABBASI, P. A.; LAZAROVITS, G.; JABAJI-HARE, S. Detection of high concentrations of organic acids in fish emulsion and their role in pathogen or disease suppression. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 274-281, Mar. 2009.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5^a.Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

AKRAM, W.; ANJUM, T.; ALI, B. Searching ISR determinant/s from *Bacillus subtilis* IAGS174 against *Fusarium* wilt of tomato. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 60, n. 2, p. 271-280, Apr. 2015.

ALONSO, R.; BETTUCCI, L. First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. **Australasian Plant Disease Notes**, Collingwood, v. 4, p. 91-92. 2009.

BALOCH, G. N.; TARIQ, S.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; ATHAR, M.; SULTANA, V.; ARA, J. Management of root diseases of eggplant and watermelon with the application of asafoetida and seaweeds. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Göttingen, v. 86, p. 138-142. 2013.

BAYSAL, Ö.; ÇALISKAN, M.; YESILOVA, Ö. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 73, n. 1-3, p. 25-32, Oct. 2008.

BENCHIMOL, R. L.; SUTTON, J. C.; DIAS-FILHO, M. B. Potencialidade da casca de caranguejo na redução da incidência de Fusariose e na promoção do crescimento de mudas de Pimenteira-do-Reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 2, p. 180-184, mar-abr. 2006.

BORREGO-BENJUMEA, A.; BASALLOTE-UREBA, M. J.; ABBASI, P. A.; LAZAROVITS, G.; MELERO-VARA, J. M. Effects of incubation temperature on the organic amendment-mediated control of *Fusarium* wilt of tomato. **Annals of Applied Biology**, London, v. 164, n. 3, p. 453-463, May. 2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em:
<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 de março de 2016.

BRUNELLI, K. R.; CABRAL, C. S.; GIORIA, R.; KOBORI, R. F.; COSTA, H.; REIS, A. Presença da raça 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em alface no Brasil. In: XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010. Cuiabá. Cuiabá: Tropical Plant Pathology, 2010. p.S222.

CABRAL, C. S.; REIS, A. Screening of lettuce accessions for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp *lactucae* race 1. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 38, n. 4, p. 275-281, Jul-Aug. 2013.

CAI, G.; GALE, L. R.; SCHNEIDER, R. W.; KISTLER, H. C.; DAVIS, R. M.; ELIAS, K. S.; MIYAO, E. M. Origin of Race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* at a Single Site in California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 8, p. 1014-1022, Aug. 2003.

CARVALHO, D. D. C.; DE MELLO, S. C. M.; MARTINS, I.; LOBO, M. Biological control of Fusarium wilt on common beans by in-furrow application of *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 375-381, Dec. 2015a.

CARVALHO, D. D. C.; GERALDINE, A. M.; LOBO, M.; DE MELLO, S. C. M. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 12, p. 1220-1224, Dec. 2015b.

CASTAÑO, R.; BORRERO, C.; TRILLAS, M. I.; AVILÉS, M. Selection of biological control agents against tomato Fusarium wilt and evaluation in greenhouse conditions of two selected agents in three growing media. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 105-116, Feb. 2013.

CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: STOYTCHIEVA, M. (Ed. **Pesticides in the modern world - pesticides use and management**. Rijeka: InTech, 2011. cap. 13, p.273-302.

CHANG, W. T.; CHEN, M. L.; WANG, S. L. An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 945-950, May. 2010.

COUTINHO, T. A.; STEENKAMP, E. T.; MONGWAKETSI, K.; WILMOT, M.; WINGFIELD, M. J. First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 36, n. 3, p. 256-261. 2007.

CSIZINSZKY, A. A.; SCHUSTER, D. J.; JONES, J. B.; C., V. L. J. Crop Protection. In: HEUVENLINK, E. (Ed. **Tomatoes**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2005. cap. 7, p.199-235.

FOURIE, G.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D.; JONES, N. B.; MORRIS, A. R.; STEENKAMP, E. T. Culture-independent detection and quantification of *Fusarium circinatum* in a pine-producing seedling nursery. **Southern Forests**, Grahamstown, v. 76, n. 3, p. 137-143. 2014.

FUJINAGA, M.; OGISO, H.; SHINOHARA, H.; TSUSHIMA, S.; NISHIMURA, N.; TOGAWA, M.; SAITO, H.; NOZUE, M. Phylogenetic relationships between the lettuce root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* races 1, 2 and 3 based on the sequence of the intergenic spacer region of its ribosomal DNA. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 71, p. 402-407. 2005.

FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TUCHIYA, N.; SAITO, H.; YAMANAKA, S.; NOZUE, M.; KOJIMA, M. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by differential system with commercial cultivars. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, p. 23-28. 2003.

GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 32, n. 1, p. 61-65, Jan. 2004.

GHINI, R.; DOMINGUES, F.; BETTIOL, W. Casca de camarão para o controle de Murcha de *Fusarium* em gengibre. **Circular Técnica 11**, Jaguariúna, p. 1-3. 2006.

GILARDI, G.; TINIVELLA, F.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Seed dressing to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 112, n. 3, p. 240-246, May. 2005.

GONÇALVES, A. E.; STADNIK, M. J. Interferência de ulvana no desenvolvimento e melanização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 37, n. 6, p. 431-437, dez. 2012.

GONG, A. D.; LI, H. P.; YUAN, Q. S.; SONG, X. S.; YAO, W.; HE, W. J.; ZHANG, J. B.; LIAO, Y. C. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 2, Feb 17. 2015.

GORDON, T. R. Pitch canker disease of pines. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6, p. 657-659, Jun. 2006.

GORDON, T. R.; STORER, A. J.; WOOD, D. L. The Pitch Canker Epidemic in California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1128-1139, nov. 2001.

GRATTIDGE, R.; O'BRIEN, R. G. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, n. 2, p. 165-166. 1982.

GROVER, M.; NAIN, L.; SINGH, S. B.; SAXENA, A. K. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. **Current Microbiology**, New York, v. 60, n. 2, p. 99-106, Feb. 2010.

GUPTA, R.; VAKHLU, J. Native *Bacillus amyloliquefaciens* W2 as a potential biocontrol for *Fusarium oxysporum* R1 causing corm rot of *Crocus sativus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 143, n. 1, p. 123-131, Sep. 2015.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 1, p. 43-56, Jan. 2004.

HEPTING, G. H.; ROTH, E. R. Pitch Canker, a new disease of some Southern Pines. **Journal of Forestry**, Washington, v. 44, p. 742-744. 1946.

HOUTERMAN, P. M.; MA, L.; VAN OOIJEN, G.; DE VROOMEN, M. J.; CORNELISSEN, B. J. C.; TAKKEN, F. L. W.; REP, M. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. **Plant Journal**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 970-978, Jun. 2009.

INAMI, K.; YOSHIOKA-AKIYAMA, C.; MORITA, Y.; YAMASAKI, M.; TERAOKA, T.; ARIE, T. A Genetic Mechanism for Emergence of Races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Inactivation of Avirulence Gene AVR1 by Transposon Insertion. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. 1-10 e44101, Aug. 2012.

INNOCENTI, G.; ROBERTI, R.; PIATTONI, F. Biocontrol ability of *Trichoderma harzianum* strain T22 against *Fusarium* wilt disease on water-stressed lettuce plants. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 60, n. 4, p. 573-581, Aug. 2015.

JACOBS, A.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J.; AHUMADA, R.; WINGFIELD, B. D. Characterization of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Chile. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 103, n. 5-6, p. 253-257, Mai-Jun. 2007.

JAYARAMAN, J.; NORRIE, J.; PUNJA, Z. K. Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 23, n. 3, p. 353-361, Jun. 2011.

JOHN, N. S.; ANJANADEVII, I. P.; NATH, V. S.; SANKAR, S. A.; JEEVA, M. L.; JOHN, K. S.; MISRA, R. S. Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of *Amorphophallus* - A polyphasic approach. **Biological Control**, San Diego, v. 90, p. 164-172, Nov. 2015.

KIPNGENO, P.; LOSENGE, T.; MAINA, N.; KAHANGI, E.; JUMA, P. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. **Biological Control**, San Diego, v. 90, p. 92-95, Nov. 2015.

KOBORI, R. F.; BRUNELLI, K. R.; GIORIA, R. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da alface no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E. e BETTIOL,

W. (Eds.). **Impacto das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. cap. 7, p.129-144.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. e CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*)**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 2005. cap. 67, p.607-626.

LARKIN, R. P.; GRIFFIN, T. S. Control of soilborne potato diseases using *Brassica* green manures. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 7, p. 1067-1077, Jul. 2007.

LI, R. X.; CAI, F.; PANG, G.; SHEN, Q. R.; LI, R.; CHEN, W. Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 6, Jun. 2015.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010. p.

MARLATT, M. L.; CORRELL, J. C.; KAUFMANN, P.; COOPER, P. E. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* race 3 in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 12, p. 1336-1342, Dec. 1996.

MARTÍN-RODRIGUES, N.; ESPINEL, S.; SANCHEZ-ZABALA, J.; ORTÍZ, A.; GONZÁLEZ-MURUA, C.; DUÑABEITIA, M. K. Spatial and temporal dynamics of the colonization of *Pinus radiata* by *Fusarium circinatum*, of conidiophora development in the pith and of traumatic resin duct formation. **New Phytologist**, Oxford, v. 198, n. 4, p. 1215-1227, Jun. 2013.

MATHERON, M. E.; MCCREIGHT, J. D.; TICKES, B. R.; PORCHAS, M. Effect of planting date, cultivar, and stage of plant development on incidence of Fusarium wilt of lettuce in desert production fields. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 6, p. 565-570, Jun. 2005.

MCCREIGHT, J. D.; MATHERON, M. E.; TICKES, B. R.; PLATTS, B. Fusarium wilt race 1 on lettuce. **Hortscience**, Alexandria, v. 40, n. 3, p. 529-531, Jun. 2005.

MOWLICK, S.; YASUKAWA, H.; INOUE, T.; TAKEHARA, T.; KAKU, N.; UEKI, K.; UEKI, A. Suppression of spinach wilt disease by biological soil disinfestation incorporated with *Brassica juncea* plants in association with changes in soil bacterial communities. **Crop Protection**, Guildford, v. 54, p. 185-193, Dec. 2013.

ORIO, A. G. A.; BRÜCHER, E.; DUCASSE, D. A. A strain of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* shows a specific antagonistic activity against the soil-borne pathogen of onion *Setophoma terrestris*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 144, n. 1, p. 217-223, Jan. 2016.

PALAZZINI, J. M.; ALBERIONE, E.; TORRES, A.; DONAT, C.; KÖHL, J.; CHULZE, S. Biological control of *Fusarium graminearum* sensu stricto, causal agent of Fusarium head blight of wheat, using formulated antagonists under field conditions in Argentina. **Biological Control**, San Diego, v. 94, p. 56-61, Mar. 2016.

PAULERT, R.; TALAMINI, V.; CASSOLATO, J. E. F.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; SMANIA, A.; STADNIK, M. J. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 116, n. 6, p. 263-270, Dec. 2009.

PFENNING, L. H.; COSTA, S. D.; DE MELO, M. P.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; AUER, C. G.; DOS SANTOS, A. F. First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 39, n. 3, p. 210-216, May-Jun. 2014.

PINTO, Z. V.; BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Efeito de casca de camarão, hidrolisado de peixe e quitosana no controle da murcha de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* em crisântemo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 16-23, Jan-Feb. 2010.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 3, p. 451-454, Jul-Sep. 2007.

REIS, A.; COSTA, H.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 on Tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 426-428. 2005.

ROCHA, D. A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 423-430, Sep-Oct. 2013.

ROSE, S.; PARKER, M.; PUNJA, Z. K. Efficacy of biological and chemical treatments for control of *Fusarium* root and stem rot on greenhouse cucumber. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 12, p. 1462-1470, Dec. 2003.

SARAVANAKUMAR, K.; YU, C. J.; DOU, K.; WANG, M.; LI, Y. Q.; CHEN, J. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Biological Control**, San Diego, v. 94, p. 37-46, Mar. 2016.

SCOTT, J. C.; GORDON, T. R.; KIRKPATRICK, S. C.; KOIKE, S. T.; MATHERON, M. E.; OCHOA, O. E.; TRUCO, M. J.; MICHELMORE, R. W. Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from *Fusarium* wilt in lettuce. **California Agriculture**, Berkeley, v. 66, n. 1, p. 20-24, Jan-Mar. 2012.

SCOTT, J. C.; GORDON, T. R.; SHAW, D. V.; KOIKE, S. T. Effect of Temperature on Severity of *Fusarium* Wilt of Lettuce Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 1, p. 13-17, Jan. 2010.

SILVA, V. N.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1609-1618, dez. 2011.

SMOLINSKA, U.; MORRA, M. J.; KNUDSEN, G. R.; JAMES, R. L. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 4, p. 407-412, Apr. 2003.

SOUZA, J. T.; TROCOLI, R. O.; MONTEIRO, F. P. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic *Trichoderma* species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. **Biological Control**, San Diego, v. 94, p. 25-32, Mar. 2016.

STEENKAMP, E. T.; RODAS, C. A.; KVAS, M.; WINGFIELD, M. J. *Fusarium circinatum* and pitch canker of Pinus in Colombia. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 41, n. 5, p. 483-491. 2012.

SULTANA, V.; BALOCH, G. N.; ARA, J.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; TARIQ, R. M.; ATHAR, M. Seaweeds as an alternative to chemical pesticides for the management of root diseases of sunflower and tomato. **Journal of Applied Botany and Food Quality-Angewandte Botanik**, Göttingen, v. 84, n. 2, p. 162-168, Dec. 2011.

SWAIN, M. R.; RAY, R. C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. **Microbiological Research**, Jena, v.164, p.121-130, 2009;

TAGHDI, Y.; HERMOSA, R.; DOMÍNGUEZ, S.; RUBIO, M. B.; ESSALMANI, H.; NICOLÁS, C.; MONTE, E. Effectiveness of composts and *Trichoderma* strains for control of Fusarium wilt of tomato. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 54, n. 2, p. 232-240. 2015.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* on Lettuce in Espírito Santo, Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 6, p. 976-976. 2008.

VISCONTI, A. **Resíduos da indústria pesqueira na indução de supressividade a *Cylindrocladium spathiphylli* e *Ralstonia solanacearum* e de biofertilizantes no controle de oídios.** 2011. 127 p. (Doutorado). Proteção de Plantas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.

VISCONTI, A.; BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Efeito de hidrolisado de peixe sobre o crescimento micelial e controle de *Cylindrocladium spathiphylli* em espátifilo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 4, p. 298-308. 2010.

WINGFIELD, M. J.; HAMMERBACHER, A.; GANLEY, R. J.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T. R.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - a growing threat to pine plantations and forests worldwide. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 37, n. 4, p. 319-334. 2008.

WINGFIELD, M. J.; JACOBS, A.; COUTINHO, T. A.; AHUMADA, R.; WINGFIELD, B. D. First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 397, maio. 2002.

YAMAUCHI, N.; HORIUCHI, S.; SATOU, M. Pathogenicity groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on horticultural types of lettuce cultivars. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 67, p. 288-290. 2001.

YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, Paris, p.1-8, 2010;