



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**POTENCIAL DE ISOLADOS DE *Trichoderma* E DE
LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DA MURCHA-DE-
FUSÁRIO DO TOMATEIRO**

Maria Geane Fontes

**Recife – PE
Fevereiro – 2013**

Maria Geane Fontes

**POTENCIAL DE ISOLADOS DE *Trichoderma* E DE LEVEDURAS NO
BIOCONTROLE DA MURCHA-DE-FUSÁRIO DO TOMATEIRO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

Co-Orientador: Prof. Dr. Ailton Reis (Embrapa/CNPH)

Co-Orientadora: Profa Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)

**Recife – PE
Fevereiro – 2013**

Ficha catalográfica

F682p

Fontes, Maria Geane

Potencial de isolados de *Trichoderma* e de leveduras no biocontrole da murcha-de-fusário do tomateiro / Maria Geane Fontes. -- Recife, 2013.

66 f.: il.

Orientador(a): Delson Laranjeira.

Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Agronomia, Recife, 2013.

Referências.

1. Antagonismo 2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 3. *Pichia* 4. Patógenos radiculares 5. *Solanum lycopersicum* L. I. Laranjeira, Delson, orientador
II. Título

CDD 632

POTENCIAL DE ISOLADOS DE *Trichoderma* E DE LEVEDURAS NO
BIOCONTROLE DA MURCHA-DE-FUSÁRIO DO TOMATEIRO

Maria Geane Fontes

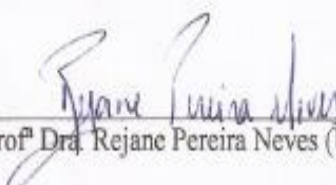
Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em:
21/02/2013.

ORIENTADOR:

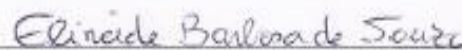


Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

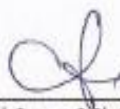
EXAMINADORES:



Prof. Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)



Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)



Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE)

Recife – PE

Fevereiro - 2013

Agradeço

A Deus, pelo dom da vida, pela realização de mais um sonho e pela presença constante em minha vida.

Dedico

Aos meus irmãos e toda a minha família, pelo apoio, incentivo e pelas demonstrações de carinho e afeto.

Ofereço

Aos meus queridos pais Valdemar e Maria dos Remédios, pelo amor incondicional, pela educação concedida, compreensão e incentivo.

Agradecimentos

À universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos;

Ao professor Delson Laranjeira, pela orientação, paciência, compreensão, e por todos os ensinamentos repassados durante a minha permanência no Laboratório de Fungos do Solo e no decorrer do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia (UFRPE);

À professora Rejane Pereira Neves e ao Laboratório de Micologia Médica – UFPE, pela contribuição dada no desenvolvimento desta pesquisa;

Ao pesquisador Dr. Ailton Reis pelo apoio, paciência e colaboração prestada;

Ao professor Sami Michereff, pela atenção, dedicação e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia em especial, Rosa Mariano, Elineide Barbosa, Sônia Oliveira e Marcos Câmara, pelos ensinamentos e atenção;

Aos queridos e eternos professores Beatriz Barguil, Marissônia Noronha e Evando Beserra, pela amizade, incentivo e confiança;

À Rejane Rodrigues, pelo carinho, amizade, dedicação, paciência e apoio para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Fungos do solo Iwanne, Emmanuelle, Adelmo Leonardo e em especial a Viviane pela amizade, apoio, incentivo e contribuição para esta pesquisa;

Às amigas Celma e Josiene, pela amizade construída, carinho e respeito;

À família de coração, Nadja, Rebeca, Felipe, Tia Nádia, José Augusto, Teresa Paula, Maria Luisa e Reginho, pela acolhida, apoio, carinho e incentivo;

Aos funcionários Romildo e Darcy pela amizade, atenção e suporte durante o curso;

Ao Senhor Luís Coelho, pela amizade, apoio e pela grande contribuição para esta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vi
RESUMO GERAL.....	vii
GENERAL ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I – Introdução Geral	09
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO II – Potencial de isolados de <i>Trichoderma</i> e de leveduras no biocontrole da murcha-de-fusário do tomateiro.....	27
ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	44
RESUMO.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CONCLUSÕES GERAIS.....	65

RESUMO GERAL

A murcha-de-fusário é uma das principais doenças na cultura do tomateiro e causa redução na produtividade e qualidade do produto. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de espécies de *Trichoderma* e de leveduras como agentes biocontroladores da murcha-de-fusário em tomateiro causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, raça 3. Para isto, plântulas de tomateiro aos 21 dias foram transplantadas para vasos contendo solo, infestado com 50 g de substrato colonizado com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e com os isolados de *Trichoderma* (8g/vaso). No experimento visando à seleção de leveduras, a inoculação foi efetuada pelo método do corte de raízes, onde plântulas de tomateiro, aos 21 dias foram imersas na suspensão de células ($1,5 \times 10^7$ células/mL) de leveduras e transplantadas para vasos, previamente infestado com as estruturas do patógeno. Também foi avaliado o efeito de diferentes dosagens de inóculo de *Trichoderma* (2, 4, 6, 8 e 10g) e diferentes concentrações de leveduras (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 células/mL). A atividade antagônica de *Trichoderma in vitro* foi avaliada através do pareamento de cultura. O antagonismo de leveduras foi realizado, por meio de estria contínua, no centro da placa de Petri e dois discos de meio de cultura do patógeno posicionados a 0,2 cm das extremidades opostas da placa. Dos 48 isolados de *Trichoderma* testados quatro (T25, LCB72, LCB80 e LCB 48Te) foram os mais eficientes na redução da severidade da doença, sendo o isolado T25 o que proporcionou maior nível de controle da doença (71,2%). Quanto aos valores da dose efetiva para reduzir em 50% a severidade da doença (DE50), os menores valores foram apresentados pelos isolados LCB 48Te (6,8 g) e LCB 80 (7,2 g), indicando serem mais efetivos no controle da doença. Das 45 leveduras testadas, quatro (*Hanseniaspora opuntia*, *Pichia kluyveri*, *P. caribbica* e *P. fermentans*) reduziu em 100% a severidade da murcha-de-fusário. Quanto aos valores da concentração efetiva para reduzir em 50% a severidade da doença (CE50), os menores valores foram apresentados pelos isolados 28FR ($2,1 \times 10^6$ células/mL) e 32FR ($2,3 \times 10^6$ células/mL), indicando serem os mais efetivas no controle da doença. Com relação à produção do fenótipo *killer* as quatro leveduras se apresentaram como positivas. Nos testes *in vitro* os isolados de *Trichoderma* T25, LCB72, LCB80 e LCB 48 Te inibiram completamente o fitopatógeno, e o isolado de levedura 39F2B foi o mais eficiente na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno.

Palavras-chave: Antagonismo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pichia*, patógenos radiculares, *Solanum lycopersicum* L.

GENERAL ABSTRACT

The fusarium wilt is a major disease in tomato and cause reduction in productivity and product quality. This study aimed to evaluate the efficiency of *Trichoderma* species and yeasts as agents biocontrollers of fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. For this, tomato seedlings at 21 days were transplanted to pots containing soil infested with 50 g of substrate colonized with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and with *Trichoderma* (8g/vaso). In the experiment aiming at the selection of yeast inoculation was performed by the method of root pruning where tomato seedlings at 21 days were immersed in cell suspension (1.5×10^7 cells/mL) of yeast and transplanted to pots, previously infested structures with the pathogen. We also assessed the effect of different dosages of inoculum of *Trichoderma* (2, 4, 6, 8 and 10g) and different concentrations of yeast (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 cells/mL). The antagonistic activity of *Trichoderma in vitro* was assessed by base pairing in culture. Antagonism of yeast was performed by means of continuous groove, the center of the Petri dish and two discs culture medium pathogen positioned 0.2 cm from opposite ends of the plate. Of the 48 isolates of *Trichoderma* tested four (T25, LCB72, LCB80 and LCB 48Te) were the most effective in reducing disease severity, and the isolate T25 promoted the highest level of disease control (71.2%). The values of the effective dose for 50% reduction in disease severity (ED50), the lowest values were presented by isolated LCB 48Te (6.8 g) and LCB80 (7.2 g), indicating that they are more effective in controlling of the disease. Of the 45 tested yeasts, four (*Hanseniaspora opuntia*, *Pichia kluyveri*, *P. caribbica* and *P. fermentans*) decreased by 100% severity of fusarium wilt. The values of the effective concentration for 50% reduction in disease severity (EC50), the lowest values were presented by isolated 28FR (2.1×10^6 cells/mL) and 32FR (2.3×10^6 cells/mL), indicating they are the most effective in controlling the disease. With regard to the production of the four yeast *killer* phenotype presented as positive. In *in vitro* tests, *Trichoderma* T25, LCB72, LCB80 and LCB 48Te completely inhibited the pathogen, and the isolated yeast 39F2B was the most effective in inhibiting the mycelial growth of the pathogen.

Keywords: Antagonism, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pichia*, root pathogens, *Solanum lycopersicum* L.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

POTENCIAL DE ISOLADOS DE *Trichoderma* E DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DA MURCHA-DE-FUSÁRIO DO TOMATEIRO

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma hortaliça originária da zona andina da América do Sul, abrangendo parte do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru. Embora as espécies selvagens de tomate sejam originárias dessas áreas, sua ampla domesticação se deu no México, chamado de centro de origem secundário (HARVEY et al., 2002). Inicialmente, o tomateiro era cultivado apenas como planta ornamental, pois seus frutos eram considerados venenosos, devido a sua cor avermelhada, intimamente relacionada à época, como perigo e morte, retardando assim o uso dessa hortaliça na culinária (FILGUEIRA, 2003). A introdução do tomate na Europa foi feita pelos espanhóis no início do século XVI e sua aceitação como uma cultura cultivada e a sua inclusão no preparo como alimento foi relativamente lenta, ficando seu uso restrito à região de origem por quase dois séculos (HARVEY et al., 2002). Existem evidências de que os italianos foram os primeiros a cultivar o tomate, por volta de 1550, inicialmente pela curiosidade e valor ornamental de seus frutos (FILGUEIRA, 2003). De acordo com Harvey et al. (2002), a produção e o consumo de tomate estendeu-se para os Estados Unidos no século XIX e, até ao final desse século, produtos derivados na forma de sopas, molhos, bebidas e catchup já eram consumidos regularmente. No Brasil, o hábito de consumo foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX.

O tomate começou a ter relevância mundial a partir de 1900 e, atualmente, é o segundo produto olerícola mais cultivado no mundo, sendo a quantidade produzida superada apenas pela batata, que juntamente com a cebola e o alho são os alimentos mais industrializados (FILGUEIRA, 2003).

O tomateiro e espécies silvestres afins são plantas dicotiledôneas, da ordem Tubiflorae, do gênero *Solanum* pertencente à família Solanaceae. Esta é uma família botânica extremamente diversificada que engloba cerca de 90 gêneros e 1750 espécies (BOITEUX et al., 2012).

A classificação do tomate foi por muito tempo fruto de divergência entre taxonomistas, o qual foi classificado inicialmente como pertencente ao gênero *Lycopersicum* (PERALTA et al., 2006). Contudo, com base em evidências obtidas a partir de estudos filogenéticos utilizando sequências de DNA, estudos morfológicos mais aprofundados e de distribuição das plantas, foi verificada alta correlação genética entre a espécie *Lycopersicon*

esculentum e espécies do gênero *Solanum*, sendo o tomateiro reclassificado como *Solanum lycopersicum* (SPOONER et al., 2005). Esta nova classificação do tomateiro é amplamente aceita por parte de taxonomistas, melhoristas e geneticistas, conforme consta no Code of Nomenclature for Cultivated Plants (BRICKELL et al., 2004).

O tomate pode ser consumido nas formas *in natura* e industrializado. Este possui alto valor nutritivo e contribui para uma dieta mais saudável e equilibrada, pois contém grandes quantidades de vitaminas B e C, ferro e fósforo, além de ser rico em licopeno, substância que está associada à prevenção do câncer de próstata (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007).

O tomate é uma hortaliça que faz parte da dieta alimentar da maioria da população brasileira. Dentre as hortaliças, é uma das culturas mais importantes, não apenas em produção, mas também em valor sócio-econômico, estando o Brasil entre os principais países produtores (FILGUEIRA, 2003).

Em 2011, a produção brasileira de tomate foi de 4,1 milhões de toneladas, com cerca de 66.179 ha plantados, com rendimento médio de 62.567 kg/ha. A região Sudeste teve uma participação de 35,5 % na produção nacional de tomate, sendo os estados de São Paulo e Minas Gerais os principais produtores. A região Centro-Oeste apresentou uma participação de 34,8% na produção nacional desta hortaliça, destacando-se o estado de Goiás como principal produtor. Em 2011 a produção desse estado foi estimada em 1.387.681 toneladas, com cerca de 17.909 ha plantados, com rendimento médio de 77.485 kg/ha, o equivalente a 33,6% da produção nacional. A região Nordeste teve uma participação de 14% na produção nacional desta cultura, sendo o estado da Bahia o maior produtor, respondendo por 325. 932 toneladas em uma área cultivada de 7.529 ha. O estado de Pernambuco é o segundo maior produtor, respondendo por 94. 723 toneladas em uma área plantada de 2.483 ha (IBGE, 2011).

Mais de cem doenças já foram relatadas no tomateiro. Algumas delas são frequentemente destrutivas, podendo provocar níveis significativos de redução de produtividade ou na qualidade do produto comercial. Essas doenças podem ser parasitárias ou não parasitárias. A maioria das doenças parasitárias é de origem bacteriana, virótica, fúngica, ou causada por nematóides. Entretanto, mais da metade das doenças infecciosas do tomateiro são causadas por fungos, sendo que estes podem infectar todos os órgãos das plantas. As não parasitárias, também conhecidas como distúrbios fisiológicos, são provocadas pela exposição da planta a condições desfavoráveis ao desenvolvimento, tais como: deficiência ou excesso de nutrientes, falta de oxigênio, falta ou excesso de água no solo, fitotoxidez de agrotóxicos e deficiência de luminosidade (REIS; LOPES, 2012).

Dentre os fungos causadores de doenças em plantas, o gênero *Fusarium* está entre os mais importantes na fitopatologia mundial, geralmente causando murchas em diferentes culturas, tendo nos últimos anos adquirido também importância devido à produção de micotoxinas responsáveis por doenças em pessoas e animais (HAWKSWORTH et al., 1995).

A murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C Snyder & H.N. Hansen é uma das doenças mais importantes para a cultura, estando disseminada na maioria dos países onde essa hortaliça é cultivada (REIS; LOPES, 2007). A espécie *Fusarium oxysporum* Schlechtend pertence atualmente ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes e ordem Hypocreales. Espécies fitopatogênicas distribuídas dentro do gênero *Fusarium*, dentre as quais *F. oxysporum*, tem sua fase teleomórfica desconhecida, sendo uma espécie grupo composta de dezenas de espécies que necessitam ser claramente definidas e separadas de maneira adequada (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresenta micélio septado, colônias pouco coloridas inicialmente, mas com a idade tornam-se amarelas com um tom de aspecto pálido e sob determinadas condições, adquire cor rosa pálida ou coloração purpúrea (VALE, 2000). Nesta espécie são produzidos três tipos de esporos assexuais: microconídios, macroconídios e clamidósporos (AGRIOS, 2005). Os microconídios são produzidos em fiálides simples, apresentando formato oval a elipsóide, ligeiramente curvados e sem septos, é o tipo de esporo mais abundante e frequentemente produzido pelo fungo em todas as condições. Os macroconídios são esparsos a abundantes, produzidos em conidióforos ou na superfície de esporodóquios, apresentando formato fusóide e pontiagudos nas extremidades, com as paredes finas e três a cinco septos. Os clamidósporos apresentam paredes espessas, duplas e rugosas, formato globoso e podem ser formados isolados ou nas extremidades de conidióforos ou intercalados nas hifas ou nos macroconídios, constituindo as estruturas de resistência (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Isolados patogênicos de *F. oxysporum* são morfologicamente semelhantes, mas diferem em sua especificidade a hospedeiros distintos, resultam em *forma specialis* (f. sp.). Mais de 150 formas específicas ao hospedeiro já foram descritas (BAAYEN et al., 2000), cada uma delas representando isolados com habilidade de causar murcha em um grupo de hospedeiras do mesmo gênero ou da mesma família (HAWKSWORTH et al., 1995).

Das formas especializadas de *F. oxysporum*, uma das mais importantes em hortaliças no Brasil tem sido a espécie *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* causadora da murcha-de-fusário em tomateiro. Esta espécie é agrupada em três raças fisiológicas (1, 2 e 3) conforme as suas habilidades de infectar e causar doença em uma série de cultivares diferenciadoras

possuidoras de genes de resistência em diferentes loci (BAAYEN et al., 2000). As raças fisiológicas 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* encontram-se distribuídas em todo o mundo, enquanto a raça fisiológica 3 está limitada a algumas regiões geográficas (REIS; BOITEUX, 2007).

A raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2005, no município de Venda Nova do Imigrante, Estado do Espírito Santo, onde plantas das cultivares “Carmem” e “Alambra”, consideradas resistentes as raças 1 e 2 do patógeno, apresentavam sintomas típicos da murcha-de-fusário (REIS; BOITEUX, 2007). Até recentemente, no Brasil, a raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* encontrava-se restrita a região Sudeste, em estados de clima ameno como Espírito Santo e Rio de Janeiro. Entretanto, trabalhos realizados por Barbosa et al. (2013) relataram a propagação da raça 3 para a região Nordeste do Brasil, mais precisamente na cidade de Jaguaquara, Sudoeste da Bahia. Plantas em lavouras com a cultivar “Alambra” (resistente às raças 1 e 2) foram encontrados com sintomas de murcha, clorose e escurecimento vascular.

Os sintomas da doença podem aparecer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Entretanto, os sintomas mais típicos são quando as plantas estão no estágio de florescimento ou de frutificação. O principal sintoma é a murcha das folhas superiores, principalmente nas horas mais quentes do dia. As folhas mais velhas tornam-se amareladas, e este amarelecimento vai progredindo até atingir também as folhas mais novas. Geralmente, a murcha ou o amarelecimento aparece em apenas um lado da planta ou da folha. Em plantações muito atacadas pelo patógeno, é comum no final do ciclo da cultura se observar grandes reboleiras com plantas murchas, amareladas ou mortas (REIS et al., 2005). Os sintomas internos são evidentes pelo escurecimento dos vasos do xilema, pois o patógeno é responsável pelo desarranjo e bloqueio de elementos dos vasos, formação de tiloses e alterações no transporte de água na planta (ZITTER et al., 1996). O escurecimento dos tecidos vasculares infectados é mais intenso na base do caule sendo uma característica marcante, embora não exclusiva da doença. A planta quando infectada também pode apresentar crescimento retardado (LOPES et al., 2005).

A maior severidade da doença está condicionada a condições ambientais favoráveis, tais como: temperatura, umidade, plantio em solos arenosos, presença de nematóides, solo com pH baixo e adubação com pouco teor de potássio; além da falta de resistência do hospedeiro. A temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno fica entre 25 e 32°C (BEDENDO, 1995).

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pode sobreviver em restos culturais ou através das estruturas de resistência (clamidósporos), que podem ser disseminados pela água da chuva, mudas e implementos agrícolas entre pequenas e longas distâncias, o fungo também pode disseminar-se por meio de sementes infectadas (VALE, 2000).

Os métodos de controle químico e cultural para as murchas vasculares são pouco eficientes ou difíceis de serem aplicados (REIS; BOITEUX, 2007). Muitas destas só podem ser controladas eficientemente quando é adotado um adequado programa de manejo integrado, envolvendo o uso de variedades resistentes e a adoção de medidas de exclusão, erradicação e proteção (KUROZAWA; PAVAN, 2005). O melhor método de controle da murcha-de-fusário é por meio do cultivo de variedades resistentes. No mercado brasileiro, existem variedades comerciais resistentes às raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Entretanto, a raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tem sido descrita em diversos países e, mais recentemente, no Brasil. Assim, essa doença pode vir a tornar-se importante, pois as cultivares com resistência à raça 3 ainda não estão amplamente disponíveis (REIS, BOITEUX, 2007). Por esta razão, métodos alternativos de controle da doença vêm sendo estudados, destacando-se o controle biológico.

O uso intensivo de agroquímicos para o controle de doenças tem promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, água, solo e dos animais. Dentre as alternativas para a redução do uso desses produtos o controle biológico é um dos mais discutidos, podendo tanto aproveitar o controle biológico natural, quanto introduzir um agente de biocontrole em um ambiente (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Controle biológico é definido por Agrios (2005) como a total ou parcial redução da população do patógeno por outros organismos, e que ocorre rotineiramente na natureza. Já Cook e Baker (1993) definem controle biológico como “a redução da densidade do inóculo ou das atividades determinantes da doença realizadas por/ou através de um ou mais organismos que não o homem”.

Segundo Bettiol e Morandi (2009), os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico. O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre microrganismos e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de atuação: competição por espaço e nutrientes, antibiose, parasitismo e indução de resistência da planta hospedeira (MORAES et al., 1991).

Dentre os fungos que apresentam elevado potencial de atuação como agentes de biocontrole, o gênero *Trichoderma* é um dos mais pesquisados e estudados. Este gênero é

naturalmente encontrado no solo e apresenta uma importante função ecológica, pois participa da decomposição e mineralização dos resíduos vegetais, contribuindo com a disponibilização de nutrientes para as plantas (MENEZES et al., 2010).

De acordo com Samuel e Hadavi (1996), o gênero *Trichoderma* corresponde à fase anamórfica do gênero *Hypocrea*, pertencente à classe dos fungos Mitospóricos, subclasse Hifomicetos, ordem Moniliales, família Moniliacea. Este gênero é, segundo Gams e Bisset (1998), um dos mais interessantes grupos de fungos antagônicos, visto que as espécies de *Trichoderma* são cosmopolitas, sendo encontradas na maioria dos solos.

Os conídios de *Trichoderma* são unicelulares, subgloboso, ovóide, elipsóide ou com textura lisa ou rugosa e coloração hialina, verde-amarelo ou verde escuro, sendo a última mais comum, produzidos no ápice de fiálides, estas são hialinas formando um ângulo reto com os conidióforos, que são ramificados, solitários ou em tufo compactos, em formato cônico ou piramidal. O micélio apresenta-se, inicialmente de coloração branca e de crescimento rápido. Os clamidósporos estão presentes na maioria das espécies, intercalados nas hifas ou, ocasionalmente, terminais (MELO, 1991).

Espécies de *Trichoderma* compreendem fungos que se reproduzem assexuadamente, presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical. Esses fungos também colonizam madeira, onde a fase sexual tem sido mais frequentemente encontrada. Entretanto, muitas linhagens, incluindo diversas empregadas no controle biológico, não possuem ciclo sexual conhecido. Tais fungos apresentam alta diversidade genética, e podem ser usados para produzir uma ampla variedade de produtos de interesse ecológico e comercial (HARMAN et al., 2004).

Em meio de cultura, as colônias de *Trichoderma* crescem rapidamente e apresentam, inicialmente, superfície lisa e quase translúcida, tornando-se posteriormente flocosas ou compactas. A coloração da colônia exibe vários tons de verde, podendo ser influenciada pelo pH do meio de cultivo (MELO, 1991). Fatores como temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração, pH e teor de matéria orgânica influenciam na sobrevivência de *Trichoderma* no solo ou substrato (HOWELL, 2003).

Espécies de *Trichoderma* são eficientes no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos (MELO, 1991). Sua ação como biocontrolador foi demonstrada pela primeira vez em 1932, por Weindling, que sugeriu seu uso no controle de doenças (SPIEGEL; CHET, 1998).

No Brasil, o primeiro registro do uso do *Trichoderma* como agente de controle biológico de doenças de plantas foi em 1950, quando Foster (1950) descreveu a inativação do

vírus do mosaico do fumo (TMV) por filtrados de *Trichoderma*. Entretanto, somente em 1987 foi disponibilizado o primeiro produto comercial de *Trichoderma viride* Pers, para o controle de *Phytophthora cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet causador de podridão do colo e raízes em macieira, disponibilizado pelo Centro Nacional de Pesquisas de Fruteiras de Clima Temperado da Embrapa. O agente de controle biológico foi selecionado pela capacidade de colonizar o solo e proteger as mudas após o plantio (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Segundo Bettiol e Morandi (2009), os patógenos alvos de controle biológico por *Trichoderma* são *Fusarium*, *Pythium*, *Rizhoctonia*, *Macrophomina*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Botrytis* e *Moniliophthora* para as culturas do feijão (*Phaseolus vulgaris* L), soja (*Glycine max* (L.) Merr), algodão (*Gossypium hirsutum* L), morango (*Fragaria vesca* L), tomate, cebola (*Allium cepa* L), alho (*Allium sativum* L), cacau (*Theobroma cacao* L.) e plantas ornamentais. Alguns produtos são recomendados para o tratamento de substratos e sementes.

A produção de compostos antibióticos é característica de muitos fungos utilizados como agentes de biocontrole (BETTIOL, 1991). Dos antibióticos produzidos por espécies de *Trichoderma*, Bastos (1991) cita gliotoxina, viridina e trichodermina, como substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de outros fungos.

A ação de *Trichoderma* como agente de biocontrole ocorre devido à associação ou não dos mecanismos de antibiose, hiperparasitismo e competição (MELO, 1991). Além do hiperparasitismo Howell (2003) acrescenta a indução de resistência do hospedeiro, enquanto Harman (2000) cita o favorecimento da planta na tolerância a estresse ambiental, solubilização e sequestro de nutrientes inorgânicos e inativação de enzimas dos patógenos.

Hiperparasitismo é o fenômeno que consiste em um microrganismo parasitar o outro (BETTIOL, 1991). Espécies de *Trichoderma* possuem características hiperparasitas, pois podem detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, formando estruturas semelhantes a apressórios e enrolando-se em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa (MELO, 1991). O hiperparasitismo realizado por *Trichoderma* ocorre sobre vários fungos, inclusive *Fusarium oxysporum*, no qual ocorre enrolamento e invasão de hifas, sítios de penetração e crescimento intracelular por isolado de *Trichoderma longibrachiatum* Rifai (MELO, 1991). Segundo Harman et al. (2004), há de 20 a 30 genes envolvidos no processo de micoparasitismo devido a quantidade de proteínas e outros metabólitos que são utilizados nessa interação.

A falta de nutrientes é a causa de morte mais comum de microrganismos, por isso a competição por nutrientes limitantes ou escassos resulta em controle biológico de

fitopatógenos. *Trichoderma* tem uma capacidade superior para mobilizar e obter nutrientes do solo em comparação com outros organismos. O uso eficiente de nutrientes disponíveis é baseado na habilidade do *Trichoderma* em obter ATP do metabolismo de diferentes açúcares, tais como os derivados de polímeros amplamente distribuídos na natureza, como celulose, glucanas, quitina entre outros (CHET et al., 1998)

Este fungo apresenta também a capacidade de induzir ações de defesa, pela própria planta. Segundo Howell (2003) estas ações consistem na expressão de um conjunto de proteínas conhecidas como PRs (proteínas de resistência) e na liberação de fitoalexinas, que protegem a planta contra infecções fúngicas. Plantas pré-imunizadas com *Trichoderma* são capazes de resistir às doenças causadas por fungos patogênicos.

A eficiência do *Trichoderma* tem sido demonstrada em trabalhos de laboratório, casa de vegetação e campo, mostrando-se eficiente como um agente biocontrolador de patógenos em diferentes situações (MELO, 1991). Este é sem dúvida, o agente de controle biológico de plantas mais estudado e utilizado no Brasil e outros países da América Latina. As formulações disponíveis no mercado incluem grânulos dispersáveis, pó-molhável, suspensão concentrada, óleo emulsionável, grãos colonizados e esporos secos (BETTIOL; MORANDI, 2009). O gênero *Trichoderma* apresenta um excelente potencial para a aplicação em várias áreas de interesse agrícola, ambiental e industrial (ESPOSITO; SILVA, 1998).

Vários estudos sobre bactérias, actinomicetos e fungos filamentosos antagônicos a patógenos habitantes do solo têm sido publicados (WHIPPS, 2001). No entanto, há poucos relatos publicados sobre o uso de leveduras como agentes de controle biológico de fitopatógenos habitantes do solo. Entretanto, uma variedade de gêneros de leveduras tem sido usada para testar o potencial no biocontrole de doenças pós-colheita de frutas e vegetais (EL-GHAOUTH, 2002), de fungos que habitam madeira e de doenças foliares, como oídio (URQUHART; PUNJA, 2002).

As leveduras constituem um grupo de microrganismos eucariotos, unicelulares pertencentes ao Reino Fungi, apresentando características típicas de fungos, como a presença de parede celular rígida, núcleo organizado em membrana nuclear, aclorofilados, nutrição heterotrófica por absorção de nutrientes e reprodução assexuada por brotamento ou fissão binária (KURTZMAN; FELL, 1998). Este grupo está relacionado aos Filos Ascomycota e Basidiomycota e entre os fungos mitospóricos, que são aqueles sem reprodução sexuada definida (HAWKSWORT et al., 1995).

As leveduras são fungos que existem predominantemente como organismos unicelulares. No entanto, algumas leveduras podem tornar-se multicelulares através da

formação de cadeias de brotos alongadas conhecidas como pseudohifas, ou através da formação de hifas verdadeiras que tenham desenvolvido paredes transversais, como as observadas nos típicos fungos filamentosos (KURTZMAN; PISKUR, 2006).

As leveduras fazem parte do ambiente no qual desenvolvem-se as plantas, da microbiota epifítica e endofítica, sendo encontradas também no solo. São ativas consumidoras de nutrientes, efetivas como colonizadoras de ferimentos, e em alguns casos, indutoras da resistência do hospedeiro. Desta forma, estes organismos agem no controle das doenças preferencialmente como protetores da infecção, e não como curativos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

As células das leveduras contêm quantidades elevadas de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais. As modalidades sugeridas de ação das leveduras no biocontrole, não se constituem em nenhum perigo para o consumidor e diversos trabalhos demonstram o efeito benéfico da utilização de leveduras no tratamento de vegetais (GOUVEA, 2007). Estas agem principalmente por competição de nutrientes e indução de resistência, bem como interagem diretamente com as hifas fúngicas e produzem enzimas líticas da parede celular. Por serem eficientes colonizadoras de superfícies foliares, são capazes de consumir nutrientes mais rapidamente do que os fungos fitopatogênicos (FIALHO, 2004).

A indução de resistência em plantas hospedeiras tem sido relatada a partir da inoculação de leveduras antagonistas em frutos (WILSON et al., 1994; DROBY et al., 2002). Esta resistência induzida tem sido relacionada com a produção de fenilalanina amônia-liase, fitoalexinas, peroxidases e etileno, em tecidos de plantas (DROBY et al 2002). A levedura *Candida saitoana* Nakase & M. suzuk induziu a atividade de quitinase e ocasionou a deposição de papilas nas células do hospedeiro em ferimentos na superfície de maçãs (EL GHAOUTH et al., 1998). Em maçãs feridas, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud causou aumentos na produção de β -1, 3-glucanase, quitinase, e atividade de peroxidase (IPPOLITO et al., 2000). A ativação das defesas do hospedeiro contra os patógenos invasores de folhas e frutas relatados até o momento sugere que esta ativação também ocorra contra patógenos que infectam raízes (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006).

Vários relatos sobre leveduras em superfície de folhas e frutos sugeriram a ocorrência e a atividade de antibióticos na interação com fungos fitopatogênicos. No entanto, poucos trabalhos apresentam detalhes sobre a natureza dos antibióticos produzidos (CHOUDHURY et al, 1994; BENYAGOUB et al, 1996). Choudhury et al. (1994) isolou dois metabolitos secundários (4-metil-7, 11 - heptadecadienal e ácido 4-metil-7,11 - heptadecadienoico) com atividade antifúngica e antibacteriana a partir de culturas líquidas de *Sporothrix flocculosa*

Traquair L.A Shaw & Jarvis e *Sporothrix rugulosa* Traquair L.A Shaw & Jarvis. A ação de metabólitos voláteis, tal como acetato de etila, por algumas estirpes de leveduras foi relatada no caso de *Pichia anomala* (E.C Hansen) Kurtzman. A ação desses produtos é importante para o manejo das doenças, pois inibi o crescimento e a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos, diminuindo a sobrevivência (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000). O tratamento de *Botrytis cinerea* Pers e *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker com o antibiótico produzido por *S. flocculosa* reduziu significativamente a germinação de esporos e produção de biomassa (HAJLAOUI et al., 1994).

Determinadas leveduras, por sua vez, apresentam o fator *killer*, um peptídeo tóxico liberado no meio de cultivo capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos. As toxinas *killer* atuam na membrana de células sensíveis, reduzindo o pH intracelular e causando conseqüentemente o extravasamento de íons potássio e ATP (COELHO et al., 2003). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (WALKER et al., 1995) e *Sporobolomyces roseus* Kluyver & C.B. Niel (JANISIEWICZ et al., 1994) estão entre as linhagens com maior potencial antagônico, inibindo tanto fungos filamentosos quanto outras espécies de leveduras. Essas linhagens são imunes as suas próprias toxinas devido a um mecanismo chamado autoimunidade, no entanto, podem ser sensíveis a toxinas de outras linhagens de leveduras (MARTINAC et al., 1990). Pesquisas visando incremento na produção de fator *killer*, aliado a caracterização molecular abrem perspectivas para o desenvolvimento deste novo elemento no controle biológico (GOUVEA, 2007).

Competência na rizosfera parece ser um pré-requisito para o sucesso do controle biológico de doenças radiculares, e dificuldades para colonizar raízes podem explicar a pouca eficiência do controle biológico observada em muitos estudos (EL-TARABILY, 2004). Na competência de leveduras, os estudos ecológicos demonstram que estas são colonizadoras com sucesso da filosfera. Embora a maioria dos relatos sobre a ocupação de leveduras seja sobre órgãos aéreos de plantas, uma grande variedade de gêneros de leveduras tem sido relatada a partir da rizosfera (GOMES et al., 2003). Contudo, há uma necessidade de avaliar o potencial das leveduras na rizosfera, particularmente em relação às suas habilidades para competir com outros microrganismos neste nicho (EL-TARABILY, 2004).

Entre os gêneros mais citados no biocontrole estão *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Rhodotorula*. A maior parte dos isolados antagônicos a patógenos de plantas tem sido obtidas da microbiota epifítica associada às flores e aos frutos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

De acordo com Bettiol e Morandi (2009), em muitos países diversas leveduras (*Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud; *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner e *Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby) são registradas como agentes de biocontrole de fitopatógenos como *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Sclerotinia* e *Erwinia amylovora*, entre outros.

As leveduras podem sobreviver na superfície de folhas, cascas, frutas, flores, tecidos necróticos, do solo e da rizosfera (EL-TARABILY, 2004). O número total de leveduras no solo geralmente é relativamente baixo quando comparados com a quantidade de bactérias e fungos filamentosos. Leveduras são comuns em solos de diferentes textura, composição química, umidade, pH e em várias regiões geográficas e condições climáticas (PHAFF; STARMER 1987).

Populações de leveduras são afetadas pela profundidade em que ocorrem no solo e são mais numerosas nas camadas superiores aproximadamente 2-10 cm de profundidade. A distribuição vertical de leveduras no solo depende de fatores como compactação e porosidade, chuvas, cultivo e a presença de insetos que habitam o solo. Enquanto muitas espécies tem existência temporária no solo sendo consideradas transitórias, outras são residentes permanentes. Leveduras são particularmente numerosas nas raízes de certas plantas como a couve, milho, beterraba e aveia (PHAFF; STARMER, 1987).

Segundo Valdebenito-sanhueza (2000), nos componentes da solução do solo, mesmo em quantidade menor que bactérias, podem ser encontradas leveduras, e os principais gêneros encontrados nesse ambiente são *Cryptococcus*, *Torulaspora*, *Tremella* e *Trichosporon*. O número de leveduras no solo depende da quantidade de nutrientes disponíveis, sendo a população aumentada através da adição de substâncias metabolizáveis. A maioria das leveduras encontradas no solo são aeróbicas (PHAFF; STARMER, 1987).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos: Avaliar a eficiência de espécies de *Trichoderma* e leveduras como agentes biocontroladores da murcha-de-fusário em tomateiro; selecionar antagonistas mais efetivos para o biocontrole da murcha-de-fusário do tomateiro; avaliar o efeito de diferentes dosagens e concentrações dos antagonistas selecionados sobre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; avaliar o antagonismo *in vitro* de isolados de *Trichoderma* e leveduras; verificar a produção de toxinas killer pelas leveduras selecionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 5.ed. San diego: **Academic Press**, 2005. 635p.

BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and aflp analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Ecology and Population Biology**, v. 90, p. 891-900. 2000.

BARBOSA, E. A.; COSTA, C. S; GONCALVES, A. M.; REIS, A.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L.S. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 infecting tomatoes in north-east Brazil. **Plant Disease**, v. 97, p. 422-422, 2013.

BASTOS, C.N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauzeiro. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 333-344.

BEDENDO, I.P. Doenças vasculares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (EDS.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 838-847.

BENYAGOUB, M.; RHLID, R. B.; BÉLANGER, R. R. Purification and characterization of new fatty acids with antibiotic activity produced by *Sporothrix flocculosa*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22 p. 405–413, 1996.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 3-5.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.

BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; GIORDANO, L. B.; MELO, P. C. T. Melhoramento genético. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 31-50.

BRICKELL, C.D.; BAUM, B.R.; HETTERSCHIED, W.L.A.; LESLIE, A.C., MCNEILL, J.; TREHANE, P.; VRUGTMAN, F.; WIERSEMA, J.H. International code of nomenclature of cultivated plants. **Acta Horticulturae**, v. 647, p. 1-123, 2004.

CARVALHO, J. L.; PAGLIUCA, L. G. Tomate: um mercado que não para de crescer globalmente. **Revista Hortifruti Brasil**, v. 58, p. 6-14, 2007.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Kubicek, C. P.; Harman, G. E. (Org.). *Trichoderma* and *Gliocladium*. London: Taylor and Francis, 1998. p. 153–171.

CHOUDHURY, S. R.; TRAQUAIR, J. A.; JARVIS, W.R. 4-Methyl-7,11- heptadecadienal and 4-methyl-7,11-heptadecadienoic acids: newantibiotics from *Sporothrix flocculosa* and *Sporothrix rugulosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 700-704, 1994.

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Ciências Agrárias**, v. 24, p. 337-358, 2003.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **American Phytopathological Society**, St. Paul: 1993. 539p.

DROBY, S.; VINOKUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOLDSCHMIDT, E. E.; PORAT, R. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**, v. 92, p. 393–399, 2002.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. **Phytopathology**, v. 88 p. 282–291, 1998.

EL-GHAOUTH. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. In: KHACHATOURIANS, G.G.; ARORA, D. K. (EDS) **Applied mycology and biotechnology**, v. 2. Agriculture and food production. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 219–223.

EL-TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 69–74, 2004.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, v. 47, p. 25–35, 2006.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 24, p. 89-98, 1998.

FIALHO, M.B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta - preta dos citros.** 2004. 60p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBUCEK, C.P.; HARMAN, G.E. (Ed.) **Trichoderma & Gliocladium.** London: Taylor & Francis Ltd., 1998. v. 1, p. 3-34.

GASPERINI, A. M; HASHIMOTO E. H.; COELHO, A. R.; HIROOKA, E. Y. Leveduras killer visando o biocontrole de *Fusarium verticillioides* micotoxigênico para a qualidade de milho. In: III Encontro Paranaense de Engenharia de Alimento, 2011, Paraná. **Resumos...** Paraná: Departamento de Engenharia de Alimentos – UNICENTRO, 2011. p. 4-5.

GOMES, N. C. M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R. RUMJANEK, N. G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. **Applied Environmental Microbiology.** v. 69, p. 3758–376, 2003.

GOUVEA, A. **Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*.** 2007. 85 f. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

HAJLAOUI, M. R.; TRAQUAIR, J. A.; JARVIS, W. R.; BÈLANGER, R. R. Antifungal activity of extracellular metabolites produced by *Sporothrix flocculosa*. **Biocontrol Science Technology**, v. 4, p. 229–237, 1994.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi.** 8. ed. Oxon: CAB International, 1995. 84 p.

HARVEY, M.; QUILLEY, S.; BEYNON, H. **Exploring the tomato: transformations of nature, society and economy.** Cheltenham: Edward Elgar, 2002. 324 p.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* t-22. **Plant Disease**, v. 84, p. 377-393, 2000.

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

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático de Produção Agrícola - LSPA, 2012. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201111.pdf>
Acesso em: 18 out. 2012.

IPPOLITO, A.; EL GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biological Technology**, v. 19 p. 265–272, 2000.

JANISIEWICZ, W. J.; PETERSON, D. L.; BORS, R. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. **Plant Disease**, v. 78, p. 466–470, 1994.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. P. Doenças do tomateiro. IN: KIMATI, H. et al. (EDS.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 607– 626.

KURTZMAN C. P., FELL, J. **The yeast, a taxonomic study**. 4.ed. Amsterdam: Elsevier Science publishers, 1998. 1088p.

KURTZMAN C. P., PISKUR J. Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In: SUNNERHAGEN, P.; PISKUR, J. (Eds). **Comparative Genomics: Using Fungi as Models**. Berlin: Springer, 2006. p. 29-46.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388 p.

LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. S. Doenças fúngicas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. (Eds.). **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p. 19-51.

MARTINAC, B.; ZHU, H.; KUBALSKI, A.; ZHOU, X.; CULBERTSON, M.; BUSSEY, H.; KUNG, C. Yeast K1 *killer* toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. **Cell Biology**, v. 87, p. 6228-6232, 1990.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 7-23.

MENEZES, J. P.; JUNGES, E.; BLUME, E.; PEREIRA, M. E. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma* sp. (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. **Revista da FZVA**, v.17, n.1, p.38-50, 2010.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**, Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 7-23.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (eds) **The yeasts**. 2. Ed. New York: Academic Press, 1987. v. 1, p. 123–180.

PERALTA, I.E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **TGC Report**, v. 56, p. 6-12, 2006.

REIS, A; COSTA, H.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. First report *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p. 426–428, 2005.

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**, v. 25, p. 451-454, 2007.

REIS, A.; LOPES, C.A. Principais fungos de solo em hortaliças: epidemiologia e manejo. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Eds.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 189-191.

REIS, A.; LOPES, C. A. Doenças causadas por fungos e distúrbios fisiológicos. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**. Brasília. EMBRAPA–CNPQ, 2012. p. 179-202.

SAMUEL, N.; HADAVI, N. *Trichoderma*: review of biology and systematics of the genus. **Journal of General Microbiology**, v. 100, p. 923-935, 1996.

SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Review**, v. 3, p. 169-175, 1998.

SPOONER, D.M.; PERALTA, I.E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes *Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. **Taxon**, v.54, p. 43-61, 2005.

URQUHART, E. J.; PUNJA, Z. K. Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by tilletiosis species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 219–229, 2002.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 41-55.

VALE, F. X. R. Doenças causadas por fungos em tomate. IN: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (EDS.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2000. p. 699-750.

WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between *killer* yeast and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology**, v.127, p.213-222, 1995.

WILSON, C. L.; EL GHAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J. Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, v. 78, p. 837–844, 1994.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487–51, 2001.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. St. Paul: APS Press, 1996. 57 p.

CAPÍTULO II

POTENCIAL DE ISOLADOS DE LEVEDURAS E DE *TRICHODERMA* NO BIOCONTROLE DA MURCHA-DE-FUSÁRIO DO TOMATEIRO

POTENCIAL DE ISOLADOS DE *Trichoderma* E DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DA MURCHA-DE-FUSÁRIO DO TOMATEIRO

Maria Geane Fontes¹; Rejane Pereira Neves², Ailton Reis³, Rejane Rodrigues Costa e Carvalho¹, Sami Jorge Michereff¹, Viviane Maria da Silva¹, Leonardo Tavares de Souza¹, Melyna Chaves Leite², Delson Laranjeira¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, 52171-900, Recife-PE; ²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, 50670-901, Recife-PE; ³Embrapa Hortaliças, 70359-970, Brasília-DF.

Palavras-chave: Antagonismo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pichia*, patógenos radiculares, *Solanum lycopersicum* L.

Seção: Ciências Agrárias

Correspondência: Delson Laranjeira

Email: Delson@depa.ufrpe.br

ABSTRACT

The fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 is a major disease that occurs in tomato and cause reduction in productivity and product quality. Thus, the present study aimed to evaluate the efficiency of *Trichoderma* species and yeasts as agents biocontrollers disease. Of the 48 isolates of *Trichoderma* tested four (T25, LCB72, LCB80 and Te LCB 48) were the most effective in reducing disease severity, and the isolate T25 promoted the highest level of disease control (71.2%). The values of the effective dose (ED50), the lowest values were presented by isolated LCB 48Te (6.8 g) and LCB 80 (7.2 g). Of the 45 tested yeasts, four (*Hanseniaspora opuntia*, *Pichia kluyveri*, *P. caribbica* and *P. fermentans*) reduced in 100% severity of fusarium wilt. The values of effective concentration (EC50), the lowest values were presented by isolated 28FR (2.1×10^6 cells/mL) and 32 FR (2.3×10^6 cells/mL). The four yeasts tested showed activity *killer*. In in vitro tests, *Trichoderma* T25, LCB72, LCB80 and LCB 48Te completely inhibited the pathogen, and the isolated yeast 39F2B was the most effective in inhibiting the mycelial growth of the pathogen.

Keywords: Antagonismo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pichia*, root pathogens, *Solanum lycopersicum* L.

INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro tem sua produção limitada devido à ocorrência de problemas fitossanitários, dentre os quais se destaca a murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C Snyder & H.N. Hansen. É uma das doenças mais importantes para a cultura estando disseminada na maioria dos países onde essa hortaliça é cultivada (Reis e Lopes 2007).

O principal sintoma da doença é a murcha das folhas superiores, principalmente nas horas mais quentes do dia. As folhas mais velhas tornam-se amareladas, e este amarelecimento vai progredindo até atingir as folhas mais novas. É comum o sintoma aparecer em apenas um lado da planta ou da folha. As plantações mais atacadas pelo patógeno, sobretudo no final do ciclo da cultura apresentam grandes reboleiras com plantas murchas, amareladas ou mortas (Reis et al. 2005).

Os métodos de controle químico e cultural para as murchas vasculares são pouco eficientes ou difíceis de serem aplicados (Reis e Boiteux 2007). Muitas destas só podem ser controladas eficientemente quando é adotado um adequado programa de manejo integrado, envolvendo o uso de variedades resistentes e a adoção de medidas de exclusão, erradicação e proteção (Kurozawa e Pavan 2005).

O uso intensivo de agroquímicos para o controle de doenças tem promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, água, solo e dos animais. Para a redução do uso desses produtos o controle biológico é uma das alternativas mais discutidas, podendo tanto aproveitar o controle biológico natural, quanto introduzir um agente de biocontrole em um ambiente (Bettiol e Morandi 2009).

Dentre os fungos que apresentam elevado potencial para serem utilizados como agentes de biocontrole, o gênero *Trichoderma* é um dos mais pesquisados e estudados (Menezes et al. 2010). Espécies deste gênero se reproduzem assexuadamente, e estão

presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (Harman et al. 2004).

A ação de *Trichoderma* como agente de biocontrole ocorre devido à associação ou não dos mecanismos de antibiose, competição, hiperparasitismo, indução de resistência do hospedeiro, além de favorecer a planta na tolerância a estresse ambiental, solubilização e sequestro de nutrientes inorgânicos e inativação de enzimas dos patógenos (Harman 2000).

Além de *Trichoderma*, as leveduras surgem como uma nova classe de agentes de controle biológico, que vem sendo bastante estudadas nos últimos anos (El-Ghaouth 2002, He et al. 2003, El-Tarabily 2004, Machado e Bettiol 2010,). As leveduras fazem parte do ambiente no qual se desenvolvem as plantas, da microbiota epifítica e endofítica, sendo encontradas também no solo. São ativas consumidores de nutrientes, efetivas como colonizadoras de ferimentos, e em alguns casos, indutoras da resistência do hospedeiro. Desta forma, estes organismos agem no controle das doenças preferencialmente como protetores da infecção, e não como curativos (Valdebenito-Sanhueza 2000).

Segundo El-Mehalawy et al. (2004), diferentes mecanismos ou combinação de mecanismos podem estar envolvidos na supressão de diferentes doenças de plantas por leveduras, tais como, inibição do patógeno por compostos antimicrobianos, competição, indução de mecanismos de resistência em plantas, e degradação de fatores de patogenicidade como toxinas e enzimas. A importância das leveduras no controle biológico baseia-se nas características atóxicas, cuja utilização direta em produtos alimentícios não traria riscos à saúde dos consumidores (Valdebenito-Sanhueza 2000).

Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de espécies de *Trichoderma* e de leveduras como agentes biocontroladores da murcha-de-fusário em tomateiro causada por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 3.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados em casa de vegetação e no Laboratório de Fungos de Solo da Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Produção do inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Foi utilizado um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* da raça 3 (CMM – 2125), obtido de planta de tomateiro (cultivar “alambra”) com sintoma de murcha coletada em Muniz Freire (Estado do Espírito Santo – Brasil). O isolado encontra-se depositado na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Prof. Maria Menezes" – CMM/UFRPE.

O inóculo do patógeno foi preparado em frascos de vidro de 500 mL contendo substrato constituído da mistura de areia lavada peneirada (150g), farinha de milho (17g) e água destilada (34mL). Após a esterilização em autoclave (120 °C, 1 atm, 60 min, dois dias consecutivos) e resfriamento, em cada frasco foram colocados 10 discos de 5 mm de diâmetro de cultura do patógeno, cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA), com 10 dias de crescimento. Os frascos contendo o substrato foram incubados à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h, sendo agitados a cada dois dias para distribuir o inóculo do patógeno na mistura e favorecer a colonização homogênea.

A densidade do inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* no substrato infestado foi determinada previamente a cada experimento, pelo método de diluição em placa.

Produção dos agentes de controle biológico

***Trichoderma* sp.**

Os isolados de *Trichoderma* utilizados na prospecção de agentes de biocontrole da murcha-de-fusário encontram-se disponíveis no Laboratório de Fungos do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para o preparo do inóculo, discos de 5mm de diâmetro, do fungo cultivado em meio de cultura BDA durante 7 dias, à temperatura de 25±2°C, foram transferidos para frascos contendo arroz parboilizado (50g) umedecido com

água destilada (75mL), previamente esterilizado (121°C, 1 atm, 40 min.). Após a infestação do substrato, os frascos foram acondicionados a 25°C durante 15 dias.

Leveduras

As leveduras utilizadas no controle da murcha-de-fusário foram isoladas de caule, folhas e frutos do tomateiro. Para o isolamento foram retirados de 5 a 10 fragmentos, os quais foram colocados separadamente em tubos de ensaio contendo água de torneira esterilizada-ATE (10 mL) adicionada de cloranfenicol (50 mg.L⁻¹) mantidos sob agitação em banho de ultra-som durante 15 minutos e colocados em vórtex durante 30 segundos. Foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e distribuídas em placas de Petri contendo meio Sabouraud-Dextrose-Ágar (DAS) e mantidas à temperatura de 25± 2°C durante um período de 72 horas. As colônias isoladas foram repicadas para placas contendo meio Sabouraud e posteriormente conservadas em óleo mineral à 28 ± 2°C.

Seleção de isolados de *Trichoderma* eficientes no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

Para a seleção de antagonistas na redução da severidade da murcha-de-fusário do tomateiro foram utilizados 48 isolados do gênero *Trichoderma*. Plântulas de tomateiro cultivar Viradoro foram cultivadas em substrato comercial Basaplant® contido em bandejas de isopor, em casa de vegetação. Antes do transplante para vasos (2L de capacidade) contendo solo areno-argiloso (pH = 7,2; P = 74 mg/dm³; Na = 0,06 cmol_c/dm³; K⁺ = 1,2 cmol_c/dm³; Ca⁺² = 5,1 cmol_c/dm³; Mg⁺² = 1,5 cmol_c/dm³; Al⁺³ = 0; H+Al = 1,57 cmol_c/dm³; matéria orgânica = 22 g/kg; carbono orgânico = 13 g/kg) esterilizado em autoclave (120°C, 1 atm, 60 min, 2 dias consecutivos), procedeu-se a infestação do solo com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) pela deposição de 50g de substrato colonizado em cada vaso. A mistura solo + substrato foi homogeneizada obtendo-se uma densidade de inóculo de 5,3 x 10⁷ ufc/g de solo. Aos oito dias após a infestação com o fitopatógeno, procedeu-se a infestação do solo com os isolados de *Trichoderma*, através da deposição de 8g de substrato colonizado. Em

seguida procedeu-se a homogeneização da mistura solo+substrato, a fim de proporcionar uma distribuição uniforme no solo. Após 24 horas da infestação com os isolados de *Trichoderma* as plântulas de tomateiro foram transplantadas para os vasos. Também foram avaliados os tratamentos testemunha absoluta (plantas desenvolvidas em substrato sem o patógeno) e testemunha relativa (plantas desenvolvidas em substratos infestados com o patógeno).

O experimento constou de 50 tratamentos com 4 repetições, sendo cada repetição composta de um vaso com 4 plantas em um delineamento inteiramente casualizado.

A severidade da murcha-de-fusário do tomateiro foi avaliada aos 21 dias após o transplante, com o auxílio da escala de notas proposta por Santos (1997) adaptada, onde: 0 – planta sem sintomas; 1 – planta sem sintoma de murcha e apresentando pequena descoloração vascular; 2 – planta com sintomas de murcha e descoloração vascular; 3 – planta com severa murcha associada com a presença de clorose e necrose foliar; 4 – planta morta.

Com os valores da severidade da doença, calculou-se a redução da severidade da doença por meio da expressão: $RSD = (SEV \text{ Testemunha} - SEV \text{ tratamento}) * 100 / SEV \text{ Testemunha}$.

Os dados de severidade da doença foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional SISVAR.

Efeito de diferentes dosagens de substrato colonizados com *Trichoderma* no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

Foi avaliado o efeito de diferentes dosagens de substrato colonizado com os isolados T25; LCB 80; LCB 48Te e LCB 72, selecionados entre os 48 utilizados no experimento anterior e que proporcionaram redução superior a 35% na severidade da doença. O solo contido nos vasos foi infestado pela deposição de 50g de substrato colonizado com Fol, seguido da homogeneização da mistura solo+substrato colonizado obtendo-se uma densidade de inóculo final de $6,6 \times 10^7$ ufc/g de solo. Após oito dias foram adicionados na superfície do

solo os isolados de *Trichoderma* nas dosagens de 2, 4, 6, 8 e 10 g/vaso, e em seguida procedeu-se a homogeneização da mistura solo+substrato colonizado, com o objetivo de proporcionar uma distribuição uniforme do inóculo no solo. Após 24 horas da infestação com os isolados de *Trichoderma* as plântulas de tomateiro foram transplantadas para os vasos. A severidade da doença foi avaliada aos 21 dias após o transplântio utilizando escala de notas de Santos (1997) adaptada, conforme descrito anteriormente.

Os valores de redução de severidade da doença versus dosagens de substrato (arroz) colonizado com *Trichoderma* foram ajustados para curvas de regressão usando o modelo polinomial cúbico ($y = a + bx + cx^2 + dx^3$), sendo estimada a dose efetiva (DE50) para reduzir em 50% a severidade da doença pelos isolados de *Trichoderma*. Os valores de DE50 foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$). Essas análises foram realizadas com o programa STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

Seleção de isolados de leveduras eficientes no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

Para avaliar o efeito de 45 isolados de leveduras na redução da severidade da murcha-de-fusário, plântulas de tomateiro cultivar Viradoro, foram produzidas em substrato Basaplant® contido em bandejas de isopor de 200 células em casa de vegetação. A inoculação das leveduras foi efetuada pelo método do corte de raízes (Santos 1997) adaptado. Plantas de tomateiro, aos 21 dias após a emergência, foram removidas das bandejas, submetidas à lavagem para remoção do substrato e ao corte das raízes (cerca de 2 cm) com tesoura flambada. Em seguida, as plantas foram imersas por 10 minutos até a altura da região do colo na suspensão de leveduras na concentração de $1,5 \times 10^7$ células/mL determinada em câmara de Neubauer, posteriormente as plantas foram transplantadas para vasos contendo solo arenoso argiloso esterilizado em autoclave (120°C, 1 atm, 60 min, 2 dias consecutivos) e previamente infestado com as estruturas do patógeno, como descrito anteriormente. Também foram

avaliados os tratamentos testemunha absoluta (plantas desenvolvidas em substrato sem o patógeno) e testemunha relativa (plantas desenvolvidas em substratos infestados com o patógeno). As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante 21 dias e avaliadas quanto a severidade da doença conforme descrito anteriormente.

O experimento foi composto de 47 tratamentos com 4 repetições, sendo cada repetição composta de um vaso com 4 plantas em um delineamento inteiramente casualizado.

Efeito de diferentes concentrações de inóculo de leveduras no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de inóculo dos isolados 28FR, 39F2B, 45FR e 32FR que reduziram em 100% a severidade da murcha-de-fusário, conforme observado em experimento anterior. Plântulas de tomateiro cv. Viradoro aos 21 dias foram imersas na suspensão dos antagonistas nas concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 células mL^{-1} durante 10 minutos e, logo após, transplantadas para vasos plásticos contendo solo esterilizado e previamente infestado com Fol, como descrito anteriormente.

A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 21 dias após o transplante, utilizando escala de notas proposta por Santos (1997) adaptada, conforme descrito anteriormente.

Os valores de redução de severidade da doença versus concentrações de células de leveduras foram ajustados para curvas de regressão usando o modelo polinomial cúbico ($y = a + bx + cx^2 + dx^3$), sendo estimada a concentração efetiva (CE50) para reduzir em 50% a severidade da doença pelos isolados de leveduras. Os valores de CE50 foram submetidos separadamente à ANOVA e as médias comparadas pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$). Essas análises foram realizadas com o programa STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

Antagonismo *in vitro*

Trichoderma spp.

O antagonismo *in vitro* dos isolados T25, LCB 80, LCB 48Te e LCB 72 sobre *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* foi avaliado através de culturas pareadas. Um disco de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, contendo micélio e esporos de Fol (CMM-2125) foi depositado na extremidade de uma placa de Petri e após 48 horas foi acrescentado um disco de cultura do antagonista (0,5 cm de diâmetro), ambos a 2,0 cm de distância da borda da placa, em posições opostas. Os discos foram obtidos de culturas puras dos antagonistas e fitopatógeno com 7 dias de crescimento. As placas foram mantidas em câmara climatizada a 25°C e fotoperíodo de 12h. O experimento constou de quatro tratamentos com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri.

As avaliações foram realizadas após dez dias do acréscimo do patógeno, de acordo com os critérios propostos por Bell et al. (1982) de notas e classes de antagonismo. Escala de notas: 1 – antagonista cresce por toda a placa de Petri; 2 – antagonista cresce sobre 2/3 da placa; 3 – antagonista e patógeno crescem até a metade da placa; 4 – patógeno cresce sobre 2/3 da placa e 5 – patógeno cresce por toda a placa de Petri. Além de notas, os mesmos autores sugerem classes de antagonismo, considerando que para um isolado ser tido como antagonista eficiente deveria apresentar média de notas menor ou igual a 2 e para ser um antagonista ineficiente a média seria maior ou igual a 3.

Leveduras

A inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelos isolados 28FR, 39F2B, 45FR e 32FR foi realizado através da deposição de uma estria contínua, no centro da placa de Petri, em seguida dois discos de meio de cultura, contendo estruturas do patógeno foram posicionados a 2,0 cm das extremidades da placa. A testemunha constou da deposição de água destilada e esterilizada (ADE), em substituição as leveduras. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C por 10 dias, sendo cada tratamento constituído de cinco repetições.

Determinação de caráter *killer*

Os isolados de leveduras 39F2B, 28FR, 32FR e 45FR que reduziram em 100% a severidade da murcha-de-fusário do tomateiro foram avaliadas quanto a capacidade de produção de toxinas *killer*. A presença do fenótipo *killer* foi testado em meio YEPD (10g de extrato de levedura, 20g de peptona, 20g de glucose, 20g de ágar e 1L de água destilada, pH 4.2, ajustado com tampão citrato-fosfato 100 mM) suplementado com 0,003% de azul de metileno (YEPD-azul de metileno). As leveduras sensíveis padrão (*Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 e *Candida glabrata* NCYC Y-55), foram ativadas em ágar YEPD-azul de metileno a 25°C por 24 horas e suspensas em solução salina, numa concentração de aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células mL, e em seguida espalhadas com swab estéril sob a superfície de ágar YEPD-azul de metileno. As placas foram incubadas a 25°C por 30 minutos.

As leveduras a serem testadas para atividade *killer* também foram ativadas em ágar YEPD-azul de metileno a 25°C por 24 horas e inoculadas em um ponto na superfície das placas semeadas com as leveduras sensíveis. Em seguida as placas foram incubadas a 25°C por 72 horas. A presença de halo de inibição ao redor do ponto de inoculação indicou a positividade do teste (produção de proteína *killer*).

Identificação dos isolados

As leveduras que se destacaram no biocontrole da doença, foram identificadas através das características bioquímicas, fisiológicas e morfologias de acordo com Barnett et al. (2002), e também, através da comparação das sequencias de rDNA, com os primers específicos ITS1 e ITS4 da região ITS. Desta forma, os isolados 39F2B, 28FR, 32FR e 45FR foram identificados como *Hanseniaspora opuntia*, *Pichia kluyveri*, *P. caribbica* e *P. fermentans*, respectivamente.

A confirmação da identidade do isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (CMM-2125) foi realizada através do sequenciamento do gene do fator de alongação (TEF-1), onde a

sequencia do gene *tef1* teve 100% de identidade com o isolado NRRL 26383 de *F. oxysporum*.

RESULTADOS

Seleção de isolados de *Trichoderma* eficientes no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

Dos 48 isolados de *Trichoderma* testados, quatro (T25, LCB80, LCB 48Te e LCB 72) foram considerados eficientes na redução da severidade da murcha-de-fusário do tomateiro. Após análise, verificou-se que o isolado T25 propiciou maior nível de controle da doença, reduzindo em 71,2% a severidade da murcha-de-fusário, diferindo estatisticamente dos demais isolados. Os isolados LCB 80, LCB 48Te e LCB 72 reduziram em 42,1%, 40,7% e 38,7%, respectivamente, a severidade da doença, entretanto não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1).

Efeito de diferentes dosagens de substrato colonizados com *Trichoderma* no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

Os isolados de *Trichoderma* selecionados previamente demonstraram ser efetivos no controle da murcha-de-fusário quando aplicados em diferentes dosagens de substrato colonizado. A relação entre doses de substrato e redução da severidade da doença não foi linear, pois o aumento das doses não propiciou reduções proporcionais de severidade da doença.

O isolado LCB 48Te propiciou elevados níveis de controle da doença mesmo quando aplicado nas menores dosagens, pois na dose de 4 g reduziu em 44% a severidade da doença, enquanto outros isolados aplicados nessa mesma dose reduziram a severidade entre 12,0% (LCB 72) e 18,0% (LCB 80) (Figura 1). A elevação da dose de 4 g para 8 g do isolado LCB 48Te incrementou pouco o controle da doença, reduzindo em apenas 6,1% a severidade da doença. Por outro lado, os isolados LCB 80 e T25 apresentaram grandes incrementos (36,0%) nos níveis de controle da doença quando as doses aumentaram de 4 g para 8 g. Os isolados LCB 48Te e T25 quando utilizados na dosagem de 8 g se comportaram de maneira semelhante reduzindo em 50% a severidade da doença, entretanto o isolado LCB72 na mesma

dose reduziu em apenas 44% a severidade da doença. O isolado LCB 72 na dose de 6 g e 10 g reduziu a severidade da doença em 30% e 51% respectivamente, enquanto os demais isolados (LCB 48Te, LCB 80 e T25) nas mesmas doses reduziram entre 40% e 66%. Embora o isolado LCB 80 na dose de 10 g tenha proporcionado redução de 66% na severidade da doença, não foi verificado grande incremento (12%) nos níveis de controle quando a doses aumentaram de 8 g para 10 g (Figura 1).

A relação entre essas variáveis foi ajustada com elevada precisão pelo modelo polinomial cúbico, com valores de coeficiente de determinação (R^2) superiores a 98,5% (Figura 1). Os isolados de *Trichoderma* diferiram significativamente ($P \leq 0,05$) quanto aos valores da dose efetiva para reduzir em 50% a severidade da doença (DE50). Os menores valores de DE50 foram apresentados pelos isolados LCB 48Te (6,8 g) e LCB 80 (7,2 g), indicando serem mais efetivos no controle da doença, enquanto o isolado LCB 72 apresentou o maior valor de DE50 (10,2 g), diferindo dos demais, sendo o menos efetivo (Figura 1).

Seleção de isolados de leveduras eficientes no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

No experimento visando à seleção de leveduras para o biocontrole da murcha-de-fusário do tomateiro (Tabela 2), dos 45 isolados testados, quatro (28FR, 32FR, 39F2B, 45FR) reduziu em 100% a severidade da doença, enquanto que os isolados 40C, 65F4 e 64C2 reduziram a severidade da doença acima de 95%. Todos os demais isolados também tiveram efeito antagônico e inibitório sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, os quais obtiveram reduções de severidade superior a 45%, diferindo estatisticamente da testemunha (Tabela 2).

Efeito de diferentes concentrações de inóculo de leveduras no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

Os isolados 28FR e 32FR proporcionaram elevados níveis de controle a partir da concentração de 10^6 células/mL, os quais reduziram em 50% e 57% respectivamente, a severidade da doença (Figura 2). A elevação da concentração de 10^5 células/mL para 10^6

células/mL do isolado 28FR proporcionou grandes incrementos no controle da doença, (36,1%), entretanto o mesmo isolado não apresentou grandes incrementos (5,1%) nos níveis de controle quando as concentrações aumentaram de 10^7 células/mL para 10^8 células/mL. O isolado 32FR quando aplicado nas concentrações de 10^6 células/mL e 10^7 células/mL reduziu a severidade da doença em 57,8%, não havendo incremento nos níveis de controle em função do aumento da concentração (Figura 2). Os isolados 39F2B e 45FR obtiveram redução da severidade da doença superior a 50% a partir da concentração de 10^7 células/mL, no entanto, quando se aumentou a concentração para 10^8 células/mL houve pouco incremento (9,3% e 10,6%) nos níveis de controle da doença. O aumento da concentração dos isolados 39F2B e 45FR de 10^6 células/mL para 10^7 células/mL incrementou o controle da doença, reduzindo em 24,1% e 31,6% respectivamente, a severidade da doença. O isolado 39F2B na concentração de 10^8 células/mL reduziu severidade da doença em 64,9% enquanto o isolado 28FR em uma menor concentração (10^7 células/mL) reduziu em 66,7%, sendo este mais efetivo no controle da doença (Figura 2).

A relação entre essas variáveis foi ajustada com elevada precisão pelo modelo polinomial cúbico, com valores de coeficiente de determinação (R^2) superiores a 98,5% (Figura 2). Os isolados de leveduras diferiram significativamente ($P \leq 0,05$) quanto aos valores da concentração efetiva para reduzir em 50% a severidade da doença (CE50). Os menores valores de CE50 foram apresentados pelos isolados 28FR ($2,1 \times 10^6$ células/mL) e 32FR ($2,3 \times 10^6$ células/mL), os quais não diferiram entre si, indicando serem os mais efetivos no controle da doença, enquanto o isolado 45RF apresentou valor de CE50 de $5,5 \times 10^6$ células/mL, diferindo dos demais. O maior valor de CE50 ($1,4 \times 10^7$ células/mL) foi obtido pelo isolado 39F2B, sendo, portanto o menos efetivo (Figura 2).

Os ajustes proporcionados pelo modelo cúbico permitem estimativas com elevadas precisões dos níveis de controle da murcha-de-fusário do tomateiro em função das doses de substrato com *Trichoderma* e das concentrações de células de leveduras utilizadas.

Antagonismo in vitro

***Trichoderma* sp.**

No antagonismo *in vitro* através do pareamento de culturas, verificou-se que todos os isolados de *Trichoderma* utilizados como possíveis inibidores do fitopatógeno, apresentaram nota 1, ou seja, cresceram sobre todo o meio de cultura na placa de Petri inibindo o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, sendo estes classificados como muito eficientes, considerando a escala proposta por Bell et al. (1982).

Leveduras

Em relação a inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por leveduras, apenas o isolado 39F2B diferiu estatisticamente da testemunha, apresentando inibição no crescimento do fitopatógeno.

Determinação de caráter *killer* das leveduras selecionadas

Quanto a presença de fenótipo *killer*, verificou-se que todas as leveduras (*H. opuntia*, *P. kluyveri*, *P. caribbica* e *P. fermentans*) apresentaram atividade *killer* quando testadas contra as leveduras padrão sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006 e *C. glabrata* NCYC Y-55. A presença do halo de inibição ao redor do ponto de inoculação, que caracteriza o fator *killer* foi observado após 72 horas.

DISCUSSÃO

Seleção de isolados de *Trichoderma* antagonistas a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Embora o isolado T25 tenha reduzido a severidade da murcha-de-fusário do tomateiro em 71,2% o mesmo não foi observado para os isolados LCB 80, LCB 48Te e LCB 72 os quais reduziram em 42,1%, 40,7% e 38,7% respectivamente, a severidade da doença. Este fato provavelmente está relacionado às diferenças observadas entre espécies/isolados de *Trichoderma* quanto ao potencial no biocontrole de fitopatógenos. Segundo Schmidt et al. (2004), isolados deste gênero variam quanto a capacidade de biocontrole. Portanto, há necessidade de se conhecer o perfil ambiental do inóculo, para se garantir um manejo satisfatório da doença, pois sua eficiência está associada à boa adaptação de cada participante às condições químicas, físicas e biológicas do ambiente.

Estudos realizados visando o biocontrole da murcha-de-fusário ressaltam a eficiência de *Trichoderma* spp. no manejo da doença. Mohamed e Haggag (2006) ao estudarem o efeito de mutantes de *Trichoderma harzianum* tolerantes a salinidade, demonstraram que estes reduziram de forma satisfatória a incidência da murcha-de-fusário do tomateiro, além de serem eficientes em diminuir o crescimento de *F. oxysporum* na rizosfera. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Mwang et al. (2011) o qual mostrou que o isolado P52 de *T. harzianum* reduziu significativamente a severidade da doença, quando comparada com a testemunha. Ethur et al. (2008), visando o controle da murcha-de-fusário do tomateiro demonstrou que o isolado HTSR5 de *T. harzianum* controlou a incidência da doença em 56%.

Ao estudarem o controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro, Figueiredo et al. (2010) verificaram que um isolado de *Trichoderma* foi eficiente no controle do mofo-cinzento, reduzindo em 37,04% a incidência da doença, quando aplicado antes do patógeno. Gava e Menezes (2012) verificaram que a aplicação de isolados de *Trichoderma* reduziu significativamente a incidência de murchas do meloeiro, onde ao final de 73 dias os tratamentos com os isolados *T. koningii* e *T. polysporum* apresentaram maior eficácia de

controle da murcha com 48,1 e 51,6%, respectivamente. Os dados obtidos no nosso trabalho, também mostra níveis de controle superiores a 40% com os isolados T25, LCB 48Te e LCB80.

No trabalho aqui apresentado verificou-se que a introdução de *Trichoderma* no solo visando o biocontrole da murcha-de-fusário, proporcionou uma redução satisfatória na severidade da doença, se destacando o isolado T25 o qual proporcionou controle superior a 70%. Segundo Cordier e Alabouvette (2009) a introdução de antagonistas no solo provoca alterações na microbiota. Ao investigarem o efeito de *T. atrovirdide* na microbiota do solo, os autores observaram um aumento na densidade da população fúngica e bacteriana nos solos utilizados. Longa et al (2009) afirmam que a aplicação de agentes biocontroladores no ambiente do solo pode afetar temporariamente a densidade das populações naturalmente encontradas nesses ambientes.

Estes relatos sugerem que a introdução de antagonistas surge como uma alternativa para o reestabelecimento do equilíbrio biológico do ambiente do solo, uma vez que pode estar estimulando a ação de microrganismos autóctones que exerçam função no controle de fitopatógenos. Entretanto, Bae e Knudsen (2005), demonstraram que solos com elevada população microbiana apresentaram menor crescimento da população de *T. harzianum*. Este efeito está fortemente associado à composição da comunidade microbiana, em particular à presença de bactérias do gênero *Pseudomonas*, conhecidas por sua habilidade para produção de antibióticos e sideróforos (De Boer et al. 2003).

Segundo Benítez et al. (2004), a habilidade de se desenvolver numa ampla faixa de pH é um importante componente das complexas características de *Trichoderma* spp. Dessa maneira, este antagonista se sobressai sobre microrganismos que não possuem a capacidade de adaptação a uma ampla faixa de pH, podendo dessa forma sobreviver em ambientes diversos.

Efeito de diferentes dosagens de substrato colonizado com *Trichoderma* no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

No presente trabalho a redução da severidade da murcha-de-fusário do tomateiro foi obtida a partir da dose de 4 g (44%) para o isolado LCB 48Te. Entretanto, Lucon et al. (2009) mostraram que isolados de *Trichoderma* foram eficientes no controle do damping-off a partir da dose de 1g. Estudos realizados por Ethur et al. (2008) evidenciaram que o controle da incidência da murcha do tomateiro foi de no máximo 13%, o qual foi promovido pela concentração de 0,5g do formulado de *T. harzianum*. Este dado concorda com o do presente trabalho onde reduções de apenas 12% foi obtida na dose de 4 g para o isolado LCB 72, entretanto, quando aumentou a dose para 6g este isolado apresentou redução de 30% na severidade da doença.

A elevação das doses 4 g para 8 g dos isolados LC80 e T25 proporcionou grandes incrementos no controle da doença (36,0%). Segundo Hjeljord e Tronsmo (2003), a aplicação de altas concentrações de propágulos de *Trichoderma* spp. é necessária para o controle satisfatório de fitopatógenos, embora possa ocorrer considerável inibição da germinação dos próprios conídios do antagonista (autoinibição). Para Schmidt et al. (2004) outros fatores, além da concentração do antagonista, podem interferir no desempenho dos isolados, principalmente os ambientais. Esses fatores são importantes para se determinar a quantidade do agente de controle biológico a ser aplicada para o controle da doença.

Seleção de isolados de leveduras antagonistas a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

No presente trabalho demonstraram-se reduções de 100% na severidade da murcha-de-fusário do tomateiro, o qual foi obtido pelas leveduras *H. opuntia*, *P. kluyveri*, *P. caribbica* e *P. fermentans*. Vários autores relatam a eficiência das leveduras do gênero *Pichia* como potenciais agentes de biocontrole de patógenos pós-colheita (Restuccia et al 2006, Cao et al 2013, Fiori et al 2012), entretanto não há relatos das espécies *P. kluyveri*, *P. caribbica* e *P. fermentans* atuando no controle de patógenos habitantes do solo. Quanto à levedura *H.*

opuntia até então, não havia sido relatada com potencial para ser utilizada em controle biológico. A eficiência dessas leveduras no biocontrole da murcha-de-fusário do tomateiro demonstrada neste trabalho ocorre provavelmente devido aos diversos mecanismos de ação desses antagonistas. Dentre esses mecanismos Payne e Bruce (2000) incluem competição por espaço e nutrientes, produção de metabólitos antifúngicos, compostos voláteis, produção de enzimas que degradam a parede celular, como a β -1,3-glucanase, micoparasitismo, além da indução de resistência nas plantas hospedeiras (Masih; Paul 2002).

Os níveis de controle da murcha-de-fusário do tomateiro por isolados de leveduras, relatadas neste trabalho se assemelham àqueles obtidos por Batasa e Baliad (2005) os quais obtiveram reduções de 82,5% na infecção causada *F. oxysporum* f. sp. *cubense* em bananeira através da aplicação de leveduras. Segundo Abo-Elyous e Mohamed (2009), mudas de tomateiro tratadas com *Candida sake* e *P. membranifaciens* reduziram em 40,9 e 41,0%, respectivamente a murcha-de-fusário em casa de vegetação. Estes resultados diferem dos resultados obtidos no nosso estudo, onde as leveduras *H. opuntia*, *P. kluyveri*, *P. caribbica* e *P. fermentans* reduziram em 100% a severidade da doença, enquanto que os demais isolados testados atingiram níveis de controle superior a 45%. A eficiência de controle de 100% verificada neste trabalho, provavelmente ocorreu devido à elevada capacidade das leveduras de se sobreporem ao patógeno, através de suas atividades antagônicas, bem como, pela capacidade de colonizar as raízes do tomateiro protegendo as mudas e plantas adultas da ação de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, onde esse tipo de interação pode ter sido influenciada pelas condições físicas e químicas do solo.

Trabalho pioneiro utilizando leveduras no controle de fitopatógeno radicular foi realizado por El-Tarabily (2004), demonstrando que as espécies *C. valida*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon asahii* aplicadas individualmente ou em mistura, foram capazes de colonizar raízes de beterraba promovendo seu crescimento e protegendo as mudas e plantas adultas de *Rhizoctonia solani*. Segundo El-Tarabily (2004) exsudatos radiculares ricos em

açúcares provavelmente reforçam atividade antagonista de leveduras em relação à sua competência para colonizar raízes de plantas.

El-Mehalawy et al. (2004) avaliando o efeito de leveduras no controle da murcha-do-milho causada por *Cephalosporium maydis* relataram que cinco espécies: *C. glabrata*, *C. maltosa*, *C. slooffiae*, *R. rubra* e *Trichosporon cutaneum* foram eficientes no controle da doença, atingindo níveis superiores a 90% quando utilizadas individualmente e de 97% quando testadas em mistura. O mesmo autor também mostrou que *S. unisporus* e *C. steatolytica* reduziram em 65 e 70% respectivamente, a incidência da murcha do feijoeiro causada por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* através da produção de metabólitos antifúngicos difusíveis. Este resultado se assemelha ao obtido por nós no que se refere ao controle de murchas vasculares por isolados de leveduras, sendo esta doença caracterizada pela escassez de medidas de controle eficientes.

O presente trabalho mostrou a eficiência de leveduras no controle de um fitopatógeno habitante do solo (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*), entretanto a maioria dos relatos sobre o uso de leveduras no biocontrole de doenças de plantas são voltados para o controle de patógenos na pós-colheita (El-Ghaouth 2002, He et al. 2003, Machado e Bettiol 2010). Contudo, Medina et al. (2004) afirmam que além de atividades antagônicas sobre fitopatógenos, a inoculação de leveduras no solo pode ser útil para estimular processos benéficos, tais como a oxidação de enxofre e de solubilização de fósforo no solo. Segundo El-tarabily e Sivasithamparam (2005), leveduras são comuns em solos de diferentes texturas, composição química, umidade, pH e em várias regiões geográficas, sob diversas condições climáticas. Dessa forma, a versatilidade de leveduras em habitar o ambiente do solo sobre condições diversas, abre perspectivas para o uso desse agente no controle biológico de patógenos radiculares como verificado no nosso estudo no controle da murcha-de-fusário do tomateiro.

Efeito de diferentes concentrações de inóculo de leveduras no controle da murcha-de-fusário do tomateiro

Os resultados aqui obtidos demonstraram que o controle da doença foi mais eficiente quando se adotou as maiores concentrações (10^6 , 10^7 e 10^8 células mL^{-1}) do antagonista e que o aumento das concentrações incrementou o controle da doença. He et al. (2003), verificaram que o antagonismo de *C. laurentii* a *Penicillium expansum* em maçãs também estava relacionado com a concentração de células na suspensão da levedura. Estes verificaram que quando se utilizou a concentração de 7×10^6 células mL^{-1} do antagonista, a redução do tamanho das lesões foi de 40%, e quando a concentração da suspensão aumentou para $3,5 \times 10^7$ e $3,5 \times 10^8$ células mL^{-1} , a inibição do tamanho das lesões chegou a 98% para ambas as concentrações. Machado e Bettiol (2010) ao avaliarem o antagonismo da levedura *Sporidiobolus pararoseus* sobre *B. cinerea* nas concentrações 10^5 , 10^6 e 10^7 células mL^{-1} demonstraram que todas as concentrações reduziram a esporulação do patógeno em folhas de lírio, e que a concentração de 10^7 células mL^{-1} foi a mais eficiente. Este resultado é semelhante ao obtido neste trabalho, onde as leveduras *H. opuntia*, *P. kluyveri*, *P. caribbica* e *P. fermentans* na concentração de 10^7 células mL^{-1} propiciaram reduções na severidade da doença superior a 50%.

Antagonismo in vitro

Trichoderma

Os resultados revelados no presente trabalho mostram o controle da doença tanto *in vitro* como em casa de vegetação, onde esses quatro isolados reduziram de maneira eficiente a murcha-de-fusário em tomateiro. Entretanto, Harman et al. (2004) cita que excelentes resultados com antagonistas obtidos *in vitro* podem não ser confirmados em condições de campo, já que esses organismos estão sujeitos às reações diferenciais do hospedeiro e do ambiente.

Estudos realizados por Perveen e Bokhari (2012) visando o controle biológico do

agente causal da murcha-de-fusário em cultivo pareado, demonstraram que *T. virens* e *T. harzianum* foram eficientes na inibição do fitopatógeno. Resultados positivos em confronto direto também foram encontrados com relação a *Fusarium graminearum* (Dal bello et al. 2002).

Leveduras

A inibição do crescimento micelial *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* demonstrada neste trabalho, concordam com estudos realizados por Bastasa e Baliai (2005), os quais demonstraram que leveduras reduziram significativamente o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *cubenses*, após 3 e 7 dias de incubação. El-Mehalawy et al. (2004) mostraram que *S. unisporus* e *C. steatolytica* inibiram o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. O modo de ação destas leveduras, testadas *in vitro*, mostrou a produção de metabólitos antifúngicos difusíveis e de enzimas que degradam a parede celular, incluindo a quitinase e β -1,3-glucanase.

Determinação de caráter killer das leveduras selecionadas

A eficiência no controle da murcha-de-fusário do tomateiro verificada neste estudo, talvez esteja relacionada à presença de fenótipo *killer* pelas leveduras testadas. Platania et al. (2012) demonstraram que as leveduras *killer* *S. cerevisiae* e *Wickerhamomyces anomalus* exerceram atividade antifúngica contra *P. digitatum*, através da produção de β -glucanase. Segundo Coelho et al. (2003) o caráter *killer*, como é conhecido, é uma forma de competição biológica de leveduras, semelhante a produção de bacteriocinas em bactérias. As glicoproteínas, ou toxinas *killer*, atuam na membrana de células sensíveis, reduzindo o pH intracelular e causando conseqüente extravasamento de íons potássio e ATP, podendo ter efeito fungicida ou fungistático.

Leveduras com caráter *killer* apresentam-se com bom potencial para biocontrole, uma vez que as toxinas produzidas podem atuar sobre fitopatógenos tendo um efeito fungicida ou fungistático. Entretanto, essas leveduras podem ter efeito inibitório sobre outros

microrganismos, inclusive outras leveduras que estejam também atuando nas atividades de biocontrole. Dessa forma, novos trabalhos devem ser realizados visando analisar a capacidade de produção de substâncias extracelulares e os tipos de antibiose existente entre leveduras e fitopatógenos, a fim de direcionar o controle de fitopatógenos através da microbiota natural.

A partir do presente trabalho pode-se concluir que o tratamento de plantas do tomateiro com as leveduras *H. opuntia* (39F2B), *P. kluyveri* (28FR), *P. caribbica* (23FR) e *P. fermentans* (45FR), e a introdução dos isolados de *Trichoderma* (T25, LCB48Te, LCB80 e LCB72) no solo forneceram níveis satisfatórios de proteção contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* abrindo, dessa forma, uma perspectiva para a utilização desses agentes de controle biológico no manejo da murcha-de-fusário, visando reduzir o uso de produtos químicos na agricultura e oferecendo maior proteção ao ambiente.

RESUMO

A murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, raça 3 é uma das principais doenças que ocorre na cultura do tomateiro e causa redução na produtividade e qualidade do produto. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de espécies de *Trichoderma* e leveduras como agentes biocontroladores da doença. Dos 48 isolados de *Trichoderma* testados quatro (T25, LCB72, LCB80 e LCB 48 Te) foram os mais eficientes na redução da severidade da doença, sendo o isolado T25 o que proporcionou maior nível de controle da doença (71,2%). Quanto aos valores da dose efetiva (DE50), os menores valores foram apresentados pelos isolados LCB 48Te (6,8 g) e LCB 80 (7,2 g). Das 45 leveduras testadas, quatro (*Hanseniaspora opuntia*, *Pichia kluyveri*, *P. caribbica* e *P. fermentans*) reduziu em 100% a severidade da murcha-de-fusário. Quanto aos valores de concentração efetiva (CE50), os menores valores foram apresentados pelos isolados 28FR ($2,1 \times 10^6$ células/mL) e 32 FR ($2,3 \times 10^6$ células/mL). As quatro leveduras testadas apresentaram atividade *killer*. Nos testes *in vitro* todos os isolados de *Trichoderma* T25, LCB72, LCB80 e LCB 48 Te inibiram completamente o fitopatógeno, e o isolado de levedura 39F2B foi o mais eficiente na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno.

Palavras-chave: Antagonismo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pichia*, patógenos radiculares, *Solanum lycopersicum* L.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-ELYOUS KAM e MOHAMEDH M. 2009. Biological Control of *Fusarium* Wilt in Tomato by Plant Growth-Promoting Yeasts and Rhizobacteria. *Plant Pathology J* 25: 199-204.

BAE, YS e KNUDSEN GR. 2005. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Biological Control* 32: 236–242.

BARNETT JA, PAINE RW, YARROW D. 2000. Yeasts: characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge, Cambridge University Press. 1152p.

BATASA GN e BALIAD AA. 2005. Biological control of *Fusarium* wilt of abaca (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Snyder & Hans.) with *Trichoderma* and yeast. *Philipp J Crop Sci* 30: 29-37.

BELL DK, WELLS HD e MARKHAM CR. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.

BENÍTEZ T, RINCÓN AM, LIMÓN MC e CÓDON AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7: 249-260.

BETTIOL W e MORANDI MAB. 2009. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 341p.

BOITEUX LS, FONSECA MEN, GIORDANO LB e MELO, PCT. 2012. Melhoramento genético. In: CLEMENTE FMVT e BOITEUX LS. Produção de tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa/CNPH, p. 31-50.

COELHO AR, HOFFMANN FL e HIROOKA EY. 2003. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. Semina: Ciências Agrárias 24: 337-358.

CORDIER C e ALABOUVETTE C. 2009. Effects of the introduction of a biocontrol strain of *Trichoderma atroviride* on non target soil micro-organisms. Eur J Soil Biol 45: 267-274.

DAL BELLO GM, MONACO CL, SIMON MR. 2002. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganism. J Microbiol Biotechnol 18: 627-636.

DE BOER W, VERHEGGEN P, GUNNEWIEK, PJAK, KOWALCHUK, GA e VAN VEEN JA. 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. Appl Environ Microbiol 69: 835-844

EL-GHAOUTH. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. IN: KHACHATOURIANS GG e ARORA D K. (EDS) Apple Mycology and Biotechnology, v. 2. Amsterdam: Elsevier, p. 219–223.

EL-MEHALAWY AA. 2004. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. Int J Agr Biol 6: 310–316.

EL-MEHALAWY AA, HASSANEIN NM, KHATER HM, EL-ZAHRAA A, EL-DIN K e YOUSSEF, Y. A. 2004. Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *Int J Agr Biol* 6: 599–605.

EL-TARABILY KA. 2004. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *J Appl Microbiol* 96: 69–74.

EL-TARABILY KA e SIVASITHAMPARAM K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47: 25–35.

ETHUR LZ, BLUME E, MUNIZ, MFB, CAMARGO RF, FLORES, MG, CRUZ JLG e MENEZES JP. 2008. *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro. *Ciência e Natura*, 30: 57-69.

FIGUEIREDO GS, FIGUEIREDO LC, CAVALCANTE FCN, SANTOS AC, COSTA AF e NEIVA TO. 2010. Biological and Chemical Control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and Pathogenicity to Bean Plants. *Braz Arch Biol Technol* 53: 1-9.

FILGUEIRA FAR. 2003. Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças, 2. Ed., Viçosa: UFV. 412 p.

GAVA CAT e MENEZES MEL. 2012. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. *Rev Ciên Agron* 43: 633-640.

HARMAN GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* t-22. Plant Dis 84:377-393.

HARMAN GE, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I E LORITO M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2:43-56.

HE D, ZHENG XD, YIN YM, SUN P e ZHANG, H. Y. 2003. Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. Bot Bull Acad Sin 44: 211-216.

HJELJORD LG e TRONSMO A. 2003. Effect of germination initiation on competitive capacity of *Trichoderma atroviride* P1 conidia. Annu Rev Phytopathol 93: 1593-1598.

HOWELL CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis v.87, p.4-10.

KUROZAWA C e PAVAN MAP. 2005. Doenças do tomateiro. IN: KIMATI, H. et al. (EDS.). Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas, São Paulo: Agronômica Ceres, p. 607– 626.

LONGA CMO, SAVAZZINI FSA, TOSI S, ELAD Y, PERTOT I. 2009. Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. J Appl Microbiol 5: 49-57.

- LUCON CMM, KOIKE CM, ISHIKAWA AIB, PATRÍCIA FRA e HARAKAV R. 2009. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. *Pesqui Agropec Bras* 44: 225-232.
- MACHADO MACF e BETTIOL W. 2010. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. *Pesqui Agropec Bras* 45:539-545.
- MASIH EI, SLEZACK-DESCHAUMES S, MARMARAS I, AIT BARKA E, VERNET G, CHARPENTIER C, ADHOLEYA A e PAUL B. 2001. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*. *Fems Microbiol Lett* 202: 22–23.
- MEDINA A, VASSILEV N, ALGUACIL MM, ROLDAN A e AZCON R. 2004. Increased plant growth, nutrient uptake, and soil enzymatic activities in a desertified Mediterranean soil amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growthpromoting yeast. *Soil Science* 169: 260–270.
- MENEZES JP, JUNGES E, BLUME E e PEREIRA ME. 2010. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma* sp. (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. *Revista da FZVA* 17: p.38-50.
- MOHAMED HALA e HAGGAG, W. M. 2006. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Braz J Microbio* 37: 181-191.

MWANGI MW, MONDA EO, OKOTH SA e JEFWA JM. 2011. Inoculation of tomato seedlings with *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizal fungi and their effect on growth and control of wilt in tomato seedlings. *Braz J Microbio* 42:508-513.

PAYNE C e BRUCE, A. 2001. The yeast *Debaryomyces hansenii* as a shortterm biological control agent against fungal spoilage of sawn pinus sylvestris timber. *Biological Control* 22:22–25.

PERVEEN K e BOKHARI N. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*. *Afr J Microbiol Res* 6: 3348-3353.

PLATANIA C, RESTUCCIA C, MUCCILLI S e CIRVILLERI G. 2012. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food microbial* 30:219-250.

PIMENTA RS.; SILVA FL, SILVA JFM, MORAIS PB, BRAGA DT, ROSA CA e CORRÊA JRA. 2008. Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. *Braz J Microbio* 39:85-90.

REIS A, COSTA H, BOITEUX LS e LOPES CA. 2005. First report *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatol Bras* 30: 426–428.

REIS A e BOITEUX LS. 2007. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro state, Brazil. *Hortic. Bras* 25: 451–454.

REIS A e LOPES CA. 2007. Principais fungos de solo em hortaliças: epidemiologia e manejo. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Eds.). *Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças*, Viçosa: Editora UFV, p.189-191.

SANTOS JRM. 1997. Methodology for screening tomato for Fusarium wilt. Verticillium wilt. gray leaf spot. Early blight and Septoria leaf blight. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PROCESSING TOMATO, 1.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL TOMATO DISEASES, 1., 1996, Recife. Proceedings... Alexandria: ASHS: IPA. 1997. p. 164-166.

SCHMIDT CS, AGOSTINI F, LEIFERT C, KILLHAM K e MULLINS CE. 2004. Influence of soil temperature and matric potential on sugar beet seedling colonization and suppression of *Pythium* damping-off by the antagonistic bacteria *Pseudomonas fl uorescens* and *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Phytopathol* 94:51-363.

VALDEBENITO-SANHUEZA RM. 2000. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. *Controle biológico*, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.41-55.

ANEXO

Tabela 1. Efeito da aplicação de 48 isolados de *Trichoderma* na redução da severidade da murcha-de-fusário (RSD) em tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Tratamentos	RSD (%)	Tratamentos	RSD (%)
T25	71,2 a*	TRICHOD.	9.8 c
LCB80	42.1 b	LCB 45	9.8 c
LCB48 Te	40.7 b	T14	7.9 c
LCB72	38.7 b	T 4077	7.7 c
T8	35.3 b	LCB 194	7.7 c
T5	31.0 b	T 17	6.1 c
LCB193	31.0 b	Tric B1	5.8 c
LCB192	29.2 b	T3	4.3 c
T225	26.9 b	T223	4.3 c
LCB47	26.4 b	T 12	4.0 c
LCB190	23.3 b	LCB 71	4.0 c
LCB294	22.4 b	T6	2.2 c
T-4	21.2 b	TRIC-A	0.4 c
T311	20.8 b	T 10	0.4 c
T-C	20.4 b	LCB 70	0.4 c
T322	19.3 b	LCB 49	0.4 c
LCB69	19.3 b	LCB 197	0.4 c
LCB 68	19.3 b	Tric B2	0.4 c
T-feijão	19.0 c	LCB 160	0.4 c
TRIC. B	18.1 c	LCB 292	0.3 c
T2	18.1 c	T11	0.3 c
TRIC. C	13.5 c	LCB 47 Te	0.3 c
LCB 49 Te	13.5 c	LCB 162	0.3 c
TRIC-ES	12.6 c	Testemunha	0.0 c
TRIC B3	10.8 c		
CV (%)			14,3

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

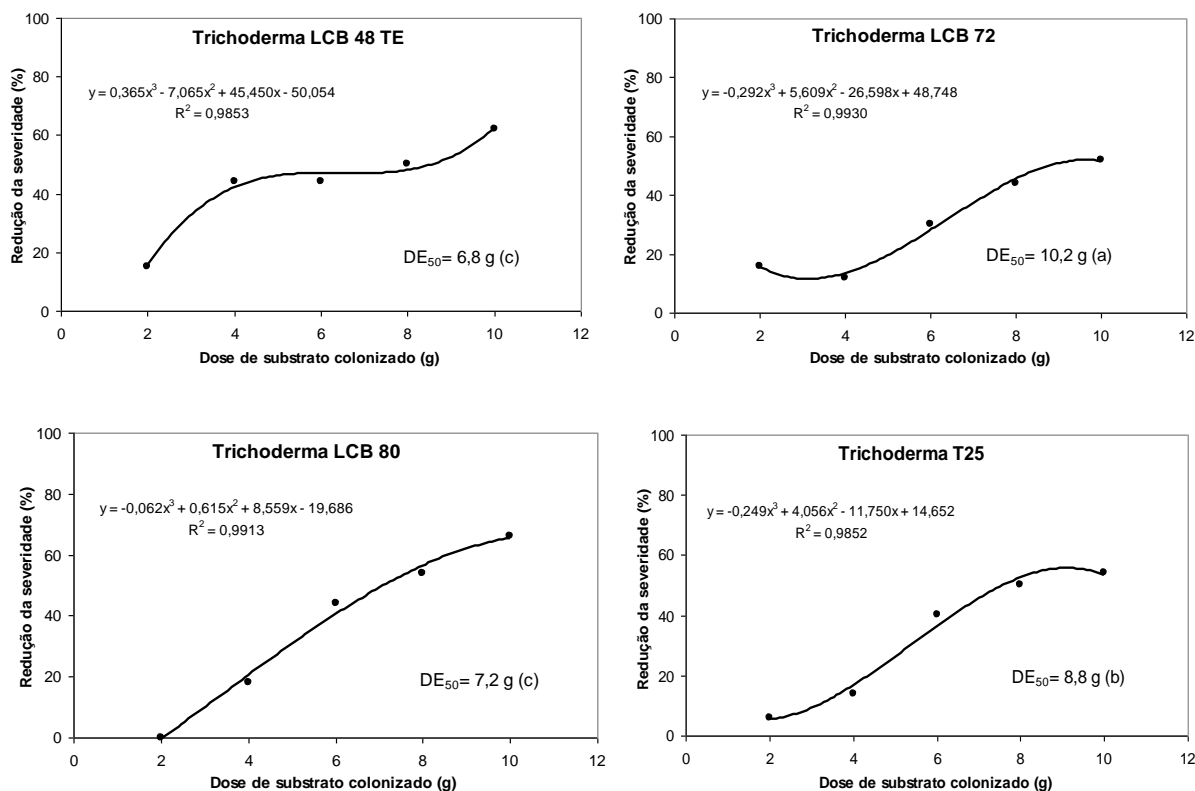


Figura 1. Efeito de diferentes dosagens de substrato (arroz) colonizado com *Trichoderma* na severidade da murcha-de-fusário do tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 3. Valores da dose efetiva para reduzir em 50% a severidade da doença (DE_{50}) seguidos pela mesma letra entre parênteses não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$).

Tabela 2. Efeito da aplicação de 45 isolados de leveduras na redução da severidade (RSD) da murcha-de-fusário em tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Tratamento	RSD (%)	Tratamento	RSD (%)
28FR	100.0 a	17FR1B	74.2 c
32FR	100.0 a	29FR2	74.2 c
39F2B	100.0 a	41FB	74.2 c
45FR	100.0 a	67C4	74,0 c
40C	96.9 b	43F2B	74,0 c
65F4	96.9 b	44CB	74,0 c
64C2	95.9 b	31FR1B	67.8 c
61FR1	89.7 c	47FR2	67.8 c
34C2	88.5 c	18FR2	67.5 c
16FR2B	87.6 c	65C5	64.4 d
36C1B	84.3 c	22FR1	64.4 d
39F	80.9 c	6C2L	64.2 d
15FR	80.7 c	66C1	62.8 d
26FRB	77.6 c	55FR1	61.3 d
50FR	77.3 c	65C2R	58.0 d
42CB	77.1 c	46FR2	56.5 d
27FR	77.2 c	30FRB	54.9 d
34C1B	75.7 c	6F2B	54.6 d
8F2B	74.2 c	35FRB	54.4 d
65C6	74.2 c	23FRB	51.3 d
66C2	74.2 c	35CB	50.0 d
42F	74.2 c	56FR2	48.4 d
36F2	74.2 c	Testemunha	0 e
CV (%)			24.33

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

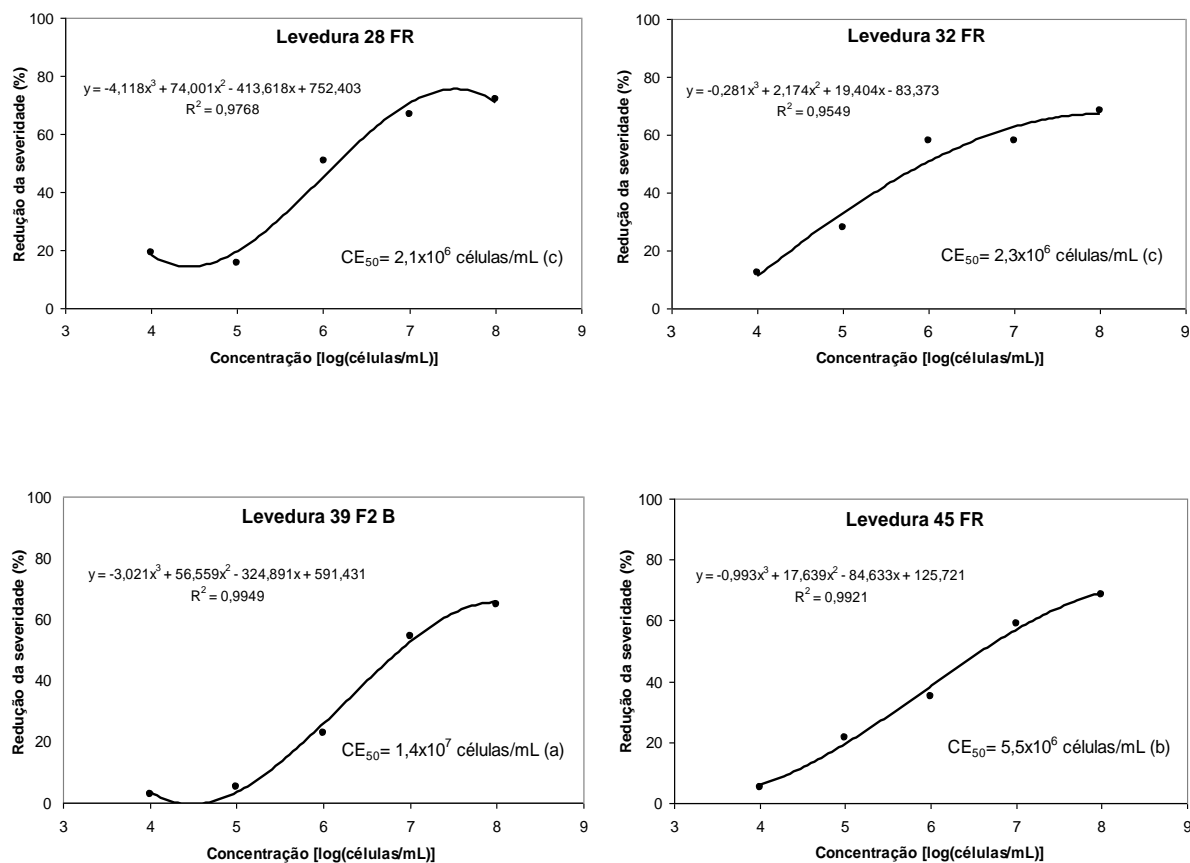


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de células de leveduras na severidade da murcha-de-fusário do tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 3. Valores da concentração efetiva para reduzir em 50% a severidade da doença (CE_{50}) seguidos pela mesma letra entre parênteses não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$).

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os isolados de *Trichoderma* LCB72, LCB48Te, LCB80 e T25 foram os mais eficientes no controle da doença;
3. Os menores valores da dose efetiva para reduzir em 50% a severidade da doença (DE50), foram apresentados pelos isolados LCB 48Te (6,8 g) e LCB 80 (7,2 g);
4. As leveduras *H. opuntia*, *P. kluyveri*, *P. caribbica*, e *P. fermentans*, controlaram em 100% a murcha-de-fusário do tomateiro;
5. Quanto aos valores da concentração efetiva (CE50), os menores valores foram apresentados pelos isolados 28FR ($2,1 \times 10^6$ células/mL) e 32FR ($2,3 \times 10^6$ células/m), indicando serem as mais efetivas no controle da doença.
6. As quatro leveduras testadas apresentaram fenótipo *killer* positivo.