



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DOUGLAS CASAROTO PEITL

**FUNGOS SAPRÓBIOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO
PARA CONTROLE DO MOFO BRANCO DA SOJA E DA
MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

Londrina
2015

DOUGLAS CASAROTO PEITL

**FUNGOS SAPRÓBIOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO
PARA CONTROLE DO MOFO BRANCO DA SOJA E DA
MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

Dissertação apresentado ao Programa De Pós
Graduação em Agronomia/Fitossanidade da
Universidade Estadual de Londrina, com
requisido à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Isabel Balbi-
Peña.

Londrina
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P379f Peitl, Douglas Casaroto.
Fungos sapróbios do semi-árido nordestino para controle do mofo branco da soja e da mancha bacteriana do tomateiro / Douglas Casaroto Peitl. – Londrina, 2015.
56f.: il.

Orientador: Maria Isabel Balbi-Peña.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Fungos x Controle biológico – Teses. 2. Doenças e pragas x Controle – Teses. 3. Tomate x Doenças e pragas x Controle – Teses. 4. *Sclerotinia sclerotiorum* – Teses. 5. *Xanthomonas* – Teses. I. Balbi-Peña, Maria Isabel. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 632.937

DOUGLAS CASAROTO PEITL

**FUNGOS SAPRÓBIOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO PARA
CONTROLE DO MOFO BRANCO DA SOJA E DA MANCHA
BACTERIANA DO TOMATEIRO**

Dissertação apresentado ao Programa De Pós
Graduação em Agronomia/Fitossanidade da
Universidade Estadual de Londrina, com
requisito à obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^{fa}. Dra. Maria Isabel Balbi-
Peña
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan
Estrada
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Débora Cristina Santiago
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ciro Hideaki Sumida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida.

Aos meus pais, José Roberto Peitl e Aparecida de Lourdes Casaroto Peitl, pela educação, paciência, esforço que tiveram durante minha vida.

A orientadora Prof^{fa}. Dr^a. Maria Isabel Balbi-Peña, pelas idéias, ensinamento, amizade e profissionalismo.

A comissão examinadora, Prof. Dr. Marcelo G. Canteri, Prof^{fa}.Dr^a. Katia Regina F. S. Estrada, Prof.Dr. Ciro H. Sumida e Prof^{fa}. Dr^a Débora C. Santiago, pela atenção e participação da banca de defesa de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pós-graduação.

A minha namorada e companheira Carla Liegi, pela paciência, compreensão e apoio nos momentos difíceis, pela amizade e companherismo. Te amo!

Aos meu amigos e irmãos de Laboratório, Luann Lopes, Luiz Henrique Campos, Vinicius Abe, Ciro Sumida, Giovane Arieira, Claudio Hoshino, Felipe Araújo, André Silva, Adriely Almeida, Elise Noko, Giovanni Ferreira, Lais Rosseto, Leonardo Gava Mataram e José Rocha, pela amizade, companherismo e auxílio durante as atividades, meus eternos agradecimentos.

PEITL, Douglas Casaroto. **Fungos sapróbios do semi-árido nordestino para controle do mofo branco da soja e da mancha bacteriana do tomateiro**. 2015. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Doenças como a mancha bacteriana do tomateiro, causado por bactérias do gênero *Xanthomonas* e o mofo branco da soja causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* são de difícil controle devido às características do ciclo de vida desses patógenos. É necessário o emprego de várias medidas de manejo para o controle eficiente dessas doenças. Uma das medidas que estão sendo adotadas pelos agricultores é o controle biológico. O objetivo de este trabalho foi selecionar fungos sapróbios do semi-árido nordestino com potencial de controle dessas duas doenças. No caso do mofo branco da soja foram testados os fungos sapróbios *Myrothecium* sp., *Volutella minima*, *Phialomyces macrosporus* e *Dictyosporium tetraseriale* e no caso de *X. vesicatoria* os fungos *Memnoniella levispora*, *Periconia hispidula*, *Zygosporium echinosporum* e *Chloridium virescens* var. *virescens*. Realizaram-se testes *in vitro* para avaliação da antibiose de metabólitos fúngicos voláteis e não voláteis. No caso de *S. sclerotiorum* avaliou-se o crescimento micelial, a formação de escleródios e a germinação de ascósporos e no caso de *X. vesicatoria*, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). No teste de antibiose usando filtrados na concentração de 50% (v/v), alguns tratamentos inibiram completamente o desenvolvimento micelial e a formação de escleródios de *S. sclerotiorum*. No teste com os compostos fúngicos voláteis, apenas o fungo *Phialomyces macrosporus* apresentou atividade inibitória. Em relação a inibição de germinação de ascósporos, o fungo *Myrothecium* sp. inibiu cerca de 90% a germinação dos ascósporos, resultado semelhante ao padrão comercial fluazinam. No teste *in vivo*, os fungos *V. minima* e *P. macrosporus* apresentaram os menores valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). No caso de controle de *X. vesicatoria* observou-se que a incorporação de filtrados no meio de cultura a 5% (v/v) controlou a bactéria em até 28,9%, mas quando incorporados a 50%, esse controle chegou a 53,8%. No teste de com os voláteis, apenas um isolado testado, *C. virescens* var. *virescens*, inibiu 24,4% as UFC. Quando os filtrados dos fungos foram aplicados nas plantas de tomateiro observou-se que todos os tratamentos com os filtrados fúngicos diminuíram a AACPD, igualando o controle do indutor comercial utilizado (Acibenzolar-S-metilico). Também observou-se que o controle proporcionado pelos filtrados fúngicos foi sistêmico, pois, realizou-se somente a aplicação na terceira folha e obteve-se controle da doença na quarta folha, indicando uma indução de resistência nas plantas de tomate. Conclui-se que alguns dos fungos sapróbios testados apresentam potencial de utilização como biocontroladores de *S. sclerotiorum* e de *X. vesicatoria* nas condições dos experimentos.

Palavras-chave: Controle biológico. *Sclerotinia sclerotiorum*. *Xanthomonas vesicatoria*

PEITL, Douglas Casaroto. **Biocontrol of white mold of soybean and tomato bacterial spot using saprobic fungi from semi-arid areas of northeastern Brazil.** 2015. 56 p. Dissertation (Master degree in Agronomy. – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Diseases such as tomato bacterial spot, caused by the bacteria *Xanthomonas* genus and white mold in soybeans caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* are difficult to control due to the cycle characteristics of life of these pathogens. It is necessary to use various management measures for the effective control of these diseases. One of the measures being adopted by farmers is biological control. The aim of this work was to select saprobic fungi in the northeastern semi-arid with control potential of these two diseases. In the case of soy saprobic the white mold fungus were tested *Myrothecium* sp., *Minimum volutella*, *Phialomyces macrosporus* and *Dictyosporium tetraserialis* and in the case of *X. vesicatoria* the fungus *Memnoniella levispora*, *Periconia hispidula*, *Zygosporium echinosporum* and *Cloridium virescens* var. *virescens*. They were performed in vitro tests for evaluation of antibiosis volatile and non-volatile fungal metabolites. In the case of *S. sclerotiorum* evaluated the mycelial growth, sclerotia formation and germination of ascospores and in the case of *X. vesicatoria*, there was the count of colony forming units (cfu). In antibiosis test using filtered at a concentration of 50% (v / v), some treatments completely inhibited mycelial growth and the formation of sclerotia of *S. sclerotiorum*. In the test with the fungal volatile compounds, only the fungus *Phialomyces macrosporus* showed inhibitory activity. Regarding the inhibition of germination of ascospores, the fungi *Myrothecium* sp. inhibited about 90% germination of ascospores, a result similar to the commercial standard fluazinam. In the in vivo test, the *Minimum v. fungi* and *P. macrosporus* had the lowest values of area under the disease progress curve (AUDPC). In the case of control *X. vesicatoria* it was observed that the incorporation of filtered 5% in the middle of the culture (v / v) to control the bacterium to 28.9%, but 50% when incorporated this control reached 53.8%. In the test with volatile, only a single test, *C. virescens* var. *virescens*, inhibited 24.4% of the UFC. When the filtrates were applied to fungi of tomato plants it was observed that all treatments decreased with AUDPC fungal filtrates, equating the commercial control inductor used (acibenzolar-S-methyl). Also it was observed that the control provided for the filtered systemic fungal was therefore made up only the application on the third sheet and disease control was achieved in the fourth sheet, indicating the induction of resistance in the tomato plants. We conclude that some of the tested saprobic fungi have potential use as biocontrol of *S. sclerotiorum* and *X. vesicatoria* the conditions of the experiments.

keywords: Biological control. *Sclerotinia sclerotiorum*. *Xanthomonas vesicatoria*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Nome e codificação dos fungos sapróbios utilizado nos teste <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Londrina, 2014	29
Tabela 2 -	Diâmetro ao terceiro dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), número e peso de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> formados em meio de cultura batata-dextrose-água com incorporação de filtrados dos fungos sapróbios em duas concentrações (5% e 50%). Londrina, 2014	31
Tabela 3 -	Diâmetro ao terceiro dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), número e peso de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no teste de composto voláteis. Londrina, 2014	32
Tabela 4 -	Germinação de ascósporos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> com diferentes fungos sapróbios no teste de voláteis. Londrina, 2014	33
Tabela 5 -	Porcentagem de área foliar afetada com mancha bacteriana em três diferentes avaliações e área abaixo da curva de progressão de doença (AACPD) em plantas de tomateiros inoculados com <i>Xanthomonas vesicatoria</i> e submetidos a diferentes tratamentos para controle de mancha bacteriana. Londrina, 2014	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	TOMATE.....	11
2.1.1	Histórico	11
2.1.2	Importância econômica	11
2.2	MANCHA BACTERIANA.....	12
2.2.1	Histórico e Etiologia	12
2.2.2	Sintomatologia	13
2.2.3	Manejo Da Doença	14
2.3	SOJA	15
2.3.1	A Cultura De Soja No Brasil.....	15
2.3.2	Importância Econômica Da Soja	16
2.4	MOFO BRANCO DA SOJA.....	17
2.5	FUNGOS SAPRÓBIOS	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1.1	Obtenção E Manutenção Dos Isolados Dos Fungos Sapróbios E De <i>S. sclerotiorum</i>	24
3.1.2	OBTENÇÃO DOS FILTRADOS DOS FUNGOS SAPRÓBIOS.....	24
3.1.3	EFEITO DOS FILTRADOS FÚNGICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL	25
3.1.4	EFEITO DOS FILTRADOS FÚNGICOS NA GERMINAÇÃO DE ASCÓSPOROS	25
3.1.5	EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NO DESENVOLVIMENTO MICELIAL	26
3.1.6	EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NA GERMINAÇÃO DOS ASCÓSPOROS	26
3.1.7	CONTROLE DE MOFO BRANCO NA SOJA.....	27
3.2.1	Obtenção e manutenção dos isolados dos fungos sapróbios e de <i>S. sclerotiorum</i>	39
3.2.2	OBTENÇÃO DOS FILTRADOS FÚNGICOS	39
3.2.3	EFEITO DOS FILTRADOS DOS FUNGOS SAPRÓBIOS SOBRE	

	<i>XANTHOMONAS VESICATORIA</i>	39
3.2.4	EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	40
3.2.5	CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO	40
3.2.6	SISTEMATICIDADE DO TRATAMENTO	41
4	RESULTADOS	28
4.1.1	FILTRADOS FÚNGICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	28
4.1.2	EFEITO DOS FILTRADOS FÚNGICOS NA GERMINAÇÃO DE ASCÓSPOROS	30
4.1.3	EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NO DESENVOLVIMENTO MICELIAL	31
4.1.4	EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NA GERMINAÇÃO DOS ASCÓSPOROS	32
4.1.5	CONTROLE DE MOFO BRANCO NA SOJA.....	33
4.2.1	EFEITO DOS FILTRADOS DOS FUNGOS SAPRÓBIOS SOBRE <i>XANTHOMONAS VESICATORIA</i>	41
4.2.2	EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS SOBRE <i>XANTHOMONAS</i> <i>VESICATORIA</i>	42
4.2.3	CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO	44
4.2.4	SISTEMATICIDADE DO TRATAMENTO	45
	CONCLUSÕES GERAIS	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Controle biológico pode ser definido de forma ampla como a supressão de doenças de plantas por organismos não patogênicos. Os organismos de controle biológico agem por competição por espaço e nutrientes, por parasitismo ou predação, por ativação do sistema de defesa natural das plantas e pela produção de substâncias antimicrobianas. Este tipo de controle apresenta as vantagens de não agredir o meio ambiente e também que uma vez introduzido o microrganismo no sistema, este se estabelece e apresenta controle durante anos.

Essa ferramenta vem sendo adotada como uma estratégia para controle de doenças cujo manejo é complexo. Como exemplo podemos citar a mancha bacteriana do tomateiro causado por várias espécies do gênero *Xanthomonas*, doença que está presente em todos os campos de produção da hortaliça. Frequentemente, o uso de produtos químicos, como produtos à base de cobre ou antibióticos, não apresenta efeito satisfatório. A baixa eficiência do controle químico das doenças bacterianas se deve principalmente ao fato de algumas bactérias estarem protegidas no solo, ou no interior dos tecidos das plantas, à predominância de variantes do patógeno resistentes selecionadas pela aplicação muito frequente dos produtos químicos e ao fato das bactérias se multiplicarem e disseminarem muito rápido sob condições favoráveis atingindo, em pouco tempo, níveis não controláveis.

Para o controle efetivo da mancha bacteriana, o tomaticultor tem que lançar mão de várias medidas, como o uso de sementes livres do patógeno (diminuindo o inóculo primário da área), a rotação de culturas, (pois a sobrevivência na falta do hospedeiro é nos restos culturais), a eliminação de plantas voluntárias e o uso de controle biológico.

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é uma doença importante na cultura da soja. Seu controle é complicado, pois esse patógeno tem como característica a produção de estruturas de resistência conhecidas como escleródios que podem sobreviver no solo por até dez anos. Por esse motivo, o agricultor tem que adotar medidas como o uso de sementes saudáveis,

rotação de culturas, plantio de culturas para formação de palhada, introdução de agentes de controle biológico na área e manejo com produtos químicos.

O objetivo do presente trabalho é selecionar fungos sapróbios do semi-árido nordestino brasileiro com potencial de controle do o mofo branco da soja e da mancha bacteriana do tomateiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TOMATE

2.1.1 Histórico

O tomateiro selvagem [*Solanum* L. seção *Lycopersicon* (Mill.)] é nativo da região ocidental da América do Sul, desde o Equador central, Peru até o norte do Chile (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2005). Existem duas hipóteses sobre o centro de domesticação do tomateiro. A primeira hipótese sustenta o Peru como centro de origem e domesticação, enquanto a segunda propõe que a domesticação ocorreu primariamente no México na região de Vera Cruz Puebla. No entanto, a evidência não é conclusiva e alguns consideram que a domesticação do tomateiro pode ter ocorrido independentemente em ambas as regiões (BAUCHET; CAUSSE, 2012).

A cultura foi introduzida na Europa no início do século XVI, pelos espanhóis e portugueses (PAZINATO; GALHARDO, 1997). Nesses primeiros tempos, o tomateiro era considerado uma planta ornamental, pois o fruto se parecia com a mandrágora, planta da família das solanáceas extremamente tóxica (ALVARENGA, 2004). Somente dois séculos depois, foi que os italianos e espanhóis descobriram suas características alimentares (FONTES; SILVA, 2002).

A introdução dessa cultura no Brasil deve-se, principalmente, a imigrantes italianos e espanhóis no final do século XIX. Porém a difusão e o consumo só começaram a ocorrer depois do final da Primeira Guerra Mundial, por volta de 1930 (ALVARENGA, 2004).

2.1.2 Importância Econômica

O tomate (*Solanum lycopersicum*), é a segunda maior hortaliça produzida no mundo todo com 161,79 milhões de toneladas produzidas em 2012 (FAO, 2014), ficando atrás apenas da batata. Isso ocorre devido a sua alta versatilidade, pois pode ser consumida *in natura* ou processada, devido a sua menor

perecibilidade, quando comparado a outras hortaliças, e ao seu alto valor nutritivo (CAMARGO FILHO et al., 1994).

De acordo com os dados de produção de 2012 (FAO, 2014), os maiores produtores mundiais de tomate são China, Índia e os Estados Unidos da América, com 50% do total produzido mundialmente. Enquanto 95% da produção chinesa e 62% da produção brasileira são destinadas ao consumo *in natura*, apenas 21% da produção norte americana são destinadas para esse fim, o restante da produção é destinado para a indústria (FONTES; SILVA, 2002).

No Brasil, o tomateiro é plantado em quase todos os estados da federação, exceto Amapá e Alagoas (CONAB, 2013). O consumo per capita no Brasil é aproximadamente 18,5 Kg/hab/ano, consumo considerado baixo quando comparado a Turquia, onde o consumo dessa fruta gira em torno de 85,7 Kg/hab/ano (FAOSTAT, 2013).

A produção nacional em 2013 foi de, aproximadamente, 4,2 mil toneladas, em uma área de 62,7 mil hectares colhidos. Os estados de Goiás e São Paulo lideram com 31% e 21% da produção brasileira, respectivamente. Minas Gerais produz 13,3%, e os estados de Paraná, Bahia, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Espírito Santo são responsáveis por 23,2% do total da produção (IBGE, 2013).

2.2. MANCHA BACTERIANA

2.2.1 Histórico e Etiologia

A mancha bacteriana foi descrita em 1920 na África do Sul, por Doidge, quem nomeou a nova doença como cancro do tomate. O nome mancha bacteriana foi instituído por Gardner em 1921, quando descreveu esta doença nos Estados Unidos. Na época, a bactéria que a causa foi denominada *Bacterium vesicatorium* Doidge (JONES et al., 1997). Em 1939, o patógeno passou a ser nomeado como *Xanthomonas vesicatoria*. Em 1978, com a redução do gênero *Xanthomonas* para cinco espécies, Young e colaboradores reclassificaram o patógeno causador da mancha bacteriana em pimentão e tomate como *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Dowson (Dye) (SAHIN, 1997).

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* é uma bactéria Gram negativa, baciliforme, aeróbica e uniflagelada (JONES, 1997). O gênero *Xanthomonas* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria* (Classe III), ordem *Xanthomonadales* (Ordem II) e família *Xanthomonadaceae* (GARRITY; HOLT, 2000; KADO, 2010).

Jones et al., (2004) propuseram a reclassificação das *Xanthomonas* que causam mancha bacteriana em quatro espécies: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria* e *X. gardneri*. Pela nomenclatura aceita atualmente somente o nome *X. vesicatoria* é dado como válido (YOUNG et al., 2005).

2.2.2 Sintomatologia

Os sintomas de mancha bacteriana ocorrem em toda a parte aérea da planta de tomate. Nas folhas, as manchas começam como áreas encharcadas, circulares que passam para manchas marrons a pretas de até 3 mm de diâmetro. As lesões são frequentemente observadas nos folíolos em forma de agregados, coalescendo posteriormente e formando áreas necrosadas que causam um amarelecimento geral dos folíolos (PERNEZNY; DAVIS; MOMOL, 2012).

Diferentemente do que ocorre em plantas de pimentão, no tomateiro, a doença não causa desfolha. Porém, com o coalescimento das lesões foliares, ocorre a secagem e a destruição da folhagem, favorecendo o aparecimento de sintomas de queima do sol nos frutos (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

Nos frutos, as lesões iniciam-se na forma de pequenas áreas encharcadas amareladas, que se tornam marrom-acinzentadas e de textura áspera (JONES, 1997). A ocorrência durante a floração causa queda de flores, resultando na redução da produtividade (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

2.2.3 Manejo Da Doença

Por se tratar de uma bacteriose, a mancha bacteriana é de difícil controle, motivo pelo qual o manejo integrado se faz necessário. O uso de sementes saudáveis é a primeira medida a ser tomada, pois é a principal fonte de inóculo primário nas áreas de cultivo (PERNEZNY; DAVIS; MOMOL, 2012).

Segundo relatos de Bashan, Okon e Henis (1982), a bactéria pode sobreviver por até 10 anos em sementes de tomate e pimentão. Tratamentos como fermentação de polpa ou semente e utilizando ácido acético não matam a bactéria alojada sob o tegumento da semente (MILLER, BROOME; 2012). Por esses motivos a tolerância do patógeno nas sementes é zero (CARMO et al., 1996).

Em áreas onde está diagnosticada a mancha bacteriana, a rotação de culturas se torna uma importante ferramenta no manejo da doença. Três ciclos de culturas que não sejam tomate ou pimentão, auxiliam na redução do inóculo no campo. Ervas daninhas da família das solanáceas também têm que ser eliminadas do campo, pois populações epifíticas de *Xanthomonas* podem estar associadas com estas plantas (PERNEZNY; DAVIS; MOMOL, 2012). A incorporação dos restos culturais também pode ser uma ferramenta para o auxílio do controle da doença (LOPES; ÁVILA, 2005).

O manejo com químicos, assim como a maioria das fitobacterioses, é realizado por meio de aplicação periódica de fungicidas cúpricos e/ou antibióticos agrícolas como a estreptomicina (MCMANUS; STOCKWELL, 2002). Vários relatos têm demonstrado a ineficiência do uso dessas moléculas para o controle da mancha bacteriana (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997), além do aparecimento de populações resistentes a esses produtos (LOPES; ÁVILA, 2005).

Outro grupo de moléculas químicas utilizado no controle da mancha bacteriana são aquelas que induzem a resistência inata da planta, fenômeno conhecido como indução de resistência adquirida (SAR, sigla em inglês) (PERNEZNY; DAVIS; MOMOL, 2012). Cavalcanti et al. (2006) relatam o controle de 47,7% da mancha bacteriana quando aplicado acibenzolar-S-metil (ASM), a molécula indutora de SAR.

2.3 SOJA

2.3.1 A Cultura De Soja No Brasil

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária da Ásia, com o centro de origem primária no nordeste da China e a região de Manchúria considerado o centro de origem secundária. Sua domesticação ocorreu por volta do século XI a.C. A

espécie *Glycine soja* é considerada a provável ancestral da qual a espécie *Glycine max* poderia ter evoluído (HYMOWITZ, 1970).

A distribuição geográfica desta espécie até o final do século XIX foi lenta, sendo sua utilização restrita aos países asiáticos. A partir da segunda década do século XX, a qualidade apresentada pela soja como alimento proteico e energético, despertaram interesses crescentes nas indústrias em vários lugares do mundo, embora com tentativas frustradas de introdução comercial do seu cultivo na Rússia, Inglaterra e Alemanha (EMBRAPA, 2013).

No Brasil, os primeiros materiais genéticos foram introduzidos por Gustavo Dutra em 1882 e foram testados no estado da Bahia (BONETTI, 1981; VERNETTI, 1983). Conforme relato de Verneti (1983), no estado de São Paulo os primeiros experimentos de soja foram conduzidos na Estação Agrônômica de Campinas em 1891 e, nos anos de 1900 e 1901, sementes da oleaginosa foram distribuídas para os agricultores do estado.

A primeira estatística de produção foi realizada em 1941, no estado do Rio Grande do Sul, informando que, em uma área de 640 hectares foi produzido em torno de 450 toneladas do grão, gerando o primeiro dado de produtividade média que foi de 700 Kg/ha. Em 1949, foi realizada a primeira exportação da soja pelo Brasil com um montante de 18.704 toneladas (BONETTI, 1981; VERNETTI, 1983).

O fato que marcou a expansão da soja no Brasil foi quando os investimentos em pesquisas se concentraram no desenvolvimento de variedades de soja adaptadas às regiões de baixas latitudes levando a produção para as regiões setentrionais do Brasil entre o Trópico de Capricórnio e a linha do Equador (EMBRAPA, 2013).

2.3.2 Importância Econômica Da Soja

A soja tem uma grande importância econômica e social para o Brasil. A cadeia agro-industrial da soja gera mais de cinco milhões de empregos e participa com pelo menos 16% dos 35% do Produto Interno Bruto (PIB) gerado pela agroindústria (EMBRAPA, 2013).

A crescente demanda por proteínas, assim como de óleos vegetais para alimentação ou para produção de biodiesel, tem dado suporte para que a soja se destaque no cenário mundial (AGRIANUAL, 2003). Ao longo de 50 anos, a soja passou de ser um cultivo inexpressivo à cultura líder do agronegócio nacional. Este motivo está atrelado ao fato de que, a partir da década de 1970, a soja passou a ser cultivada em novas áreas como resultado das pesquisas sobre adaptação da planta às regiões próximas à linha do Equador. No final da década de 70, 98% da soja era produzida na região Sul. Em 2007, 58% foi produzido nas regiões de baixa latitudes e 42% nas regiões sulinas (DALL'AGNOL et al., 2007).

O Brasil ocupa lugar de destaque no cenário do agronegócio mundial do complexo da soja, como grande produtor e exportador. Na safra 2012/2013, a produção total foi de 81,72 milhões de toneladas, um acréscimo de 24% em relação à safra de 2011/2012 (CONAB, 2013).

Entre todos os maiores países produtores dessa oleaginosa, o Brasil é o único passível de atender às futuras demandas mundiais desta matéria prima, em função das excelentes condições edafoclimáticas disponíveis para a cultura e pela disponibilidade de áreas significativas que podem ser utilizadas para seu cultivo, não sendo necessárias ações de desmatamentos (DALL'AGNOL et al., 2007).

O agronegócio brasileiro enfrenta o desafio de crescer de modo competitivo e sustentável, para atender a demanda interna, conquistar e manter espaço no mercado externo e fornecer produtos e processos de qualidade, com sustentabilidade e a preços competitivos (CARDOZO; PALMEIRA, 2006).

2.4 MOFO BRANCO DA SOJA

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary pertence ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Leotiomycetes*, ordem *Helotiales* e família *Sclerotiniaceae* (HAWKSWORTH, 1995). Este fungo tem sido relatado em países localizados em todos os continentes com temperaturas amenas e mesmo em localidades consideradas quentes e secas, com extremos de temperatura entre 0°C a 32°C (PURDY, 1979).

Doenças causadas por este patógeno ocorrem em diversas plantas hospedeiras. São descritas mais de 408 espécies hospedeiras, a maioria pertencentes às classes *Gymnospermae* e *Angiospermae*, dentre as quais, a maioria são plantas herbáceas pertencentes à subclasse *Eudicotyledoneae* (BOLAND; HALL, 1994).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência do fungo data de 1920 (Saccá, 1921), que assinalou a presença do patógeno em batata, no estado de São Paulo. Dois anos depois, o mesmo autor, notificou o fungo infectando plantas de fumo. Anos depois, no estado do Rio Grande de Sul, foi relatado o patógeno nas culturas de couve e couve brócolis (COSTA NETTO, 1943).

Na cultura da soja, este fungo causa o mofo branco, doença relatada pela primeira vez no Brasil no estado do Rio Grande do Sul em 1975 (REIS, 1975). Seus sintomas são: manchas de anasarca que evoluem para uma coloração castanho-claro onde logo se desenvolve abundante micélio branco e denso. Em poucos dias, o micélio transforma-se em uma massa negra, rígida, conhecida como escleródio, que são estruturas especializadas de sobrevivência. A fase da cultura mais suscetível à infecção é de R1 a R3 (ALMEIDA, 1997).

Os escleródios podem germinar miceliogênicamente, dando origem a hifas ou, carpogênicamente produzindo apotécios. Cada um desses tipos de germinação determinam diferentes impactos epidemiológicos (HUANG, 1992). Devido a essas características, esse fungo pode ser considerado como patógeno de solo, quando há infecção por germinação miceliogênica, ou patógeno de parte aérea quando a infecção ocorre por meio dos ascósporos, produzidos sobre os apotécios (ABAWI; GROGAM, 1979).

Este fungo possui diversas formas de dispersão. Pode dispersar-se a pequenas distancias, em torno de 25 metros, por meio da liberação de ascósporos na corrente do ar. A longas distancias, pode ser disperso por meio de implementos agrícolas, animais, e homens, seja através de escleródios, tecidos infectados (DILLON WESTON, 1946) ou de sementes infectadas internamente ou de escleródios misturados com estas (NEERGARD, 1958).

Menten (1995) observou que sementes oriundas de plantas de feijoeiro irrigado, com sintomas ou não, podem estar infectados com o fungo *S. sclerotiorum* e dessa forma ser disseminado como contaminante para novas áreas. Por isso, é de extrema importância o uso de sementes livres do patógeno. Devido ao papel fundamental da semente na disseminação desse fungo, no Brasil, a tolerância é zero para todas as classes de sementes (MACHADO, 1994; MENTEN, 1997).

Devido à falta de cultivares resistentes ao mofo branco, o uso de fungicidas e de controladores biológicos, tem sido um método eficiente para o manejo dessa doença (BARDIN; HUANG, 2001; ETHUR et al., 2005).

2.5 FUNGOS SAPRÓBIOS

Os fungos sapróbios, por meio da ação de várias enzimas, atuam como decompositores da matéria orgânica do solo, constituindo um papel importante para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas por meio da ciclagem de nutrientes (GRANDI; GUSMÃO, 1998). Quando mais hostil o ambiente de onde eles forem recuperados, maiores as chances de sobrevivência no agroecossistema (LEÃO FERREIRA; GUSMÃO; RUIZ, 2013).

Nos últimos anos, os fungos sapróbios têm recebido uma atenção especial como agentes de controle biológico e indutores de resistência (YEDIDIA et al., 2003), pois, de forma similar aos patógenos estes são capazes de secretar pectatolases, induzir a liberação de oligogalacturonídeos e ativar a resposta de defesa de plantas. Trabalhos de prospecção da biodiversidade fúngica do semiárido têm sido conduzidos e vários fungos sapróbios da serapilheira de florestas da caatinga do Nordeste foram identificados (ALMEIDA; IZABEL; GUSMÃO, 2011; BARBOSA; GUSMÃO, 2011; IZABEL et al., 2011; LEÃO-FERREIRA; GUSMÃO; RUIZ, 2013).

Alguns trabalhos vem sendo conduzidos para a seleção de fungos sapróbios para o controle de doenças de plantas. Botrel (2013), trabalhando com mancha aureolada em café verificou que o fungo *Phialomyces macrosporus* apresentou resultados promissores no controle dessa doença.

Em trabalhos conduzidos com a ferrugem do eucalipto, Pierozzi (2013), relatou que o fungo *P. macrosporus* reduziu a germinação de urediósporos e aumentou a atividade das enzimas fenilalanina amônio-liase, peroxidase e β -1,3-glucanase de plantas de eucalipto tratadas com esse fungo. O autor observou também que quando aplicado o fungo *Curvularia eragostidis*, além de auxiliar no controle da doença, promoveu o enraizamento de estacas de eucalipto.

Barros (2014), trabalhando no patossistema *S. sclerotiorum* - soja, observou que a aplicação de filtrados do fungo *Myrothecium* sp. foi capaz de reduzir a área abaixo da curva de progresso do mofo branco em 77% e o comprimento da lesão em 70% em relação à testemunha.

Artigo A

Controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e do mofo branco da soja usando fungos sapróbios do semi-árido nordestino

Resumo

O mofo branco da soja, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma doença que está causando grandes perdas na cultura da soja, principalmente em regiões de alta umidade e temperaturas amenas. Devido à dificuldade de controle com os métodos tradicionais, são necessárias novas medidas de controle para esta doença, como o controle biológico. O objetivo deste trabalho foi a seleção de fungos sapróbios do semi-árido nordestino para o controle do mofo branco da soja. Foram testados os fungos sapróbios *Myrothecium* sp., *Volutella minima*, *Phialomyces macrosporus* e *Dictyosporium tetraseriale*. Realizaram-se ensaios *in vitro* para avaliar a inibição de crescimento micelial e a da formação de escleródios por meio da incorporação de filtrados fúngicos em duas concentrações (5% e 50%), e por meio da antibiose de compostos fúngicos voláteis. Também avaliou-se a inibição da germinação de ascósporos por meio de metabólitos voláteis e não voláteis produzidos pelos fungos. Foi realizado um experimento *in vivo* com plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* usando um método de inoculação utilizando discos de meio de cultura contendo micélio do fungo. A avaliação do comprimento da lesão ocorreu durante três semanas, e após a última avaliação, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). No teste de antibiose com filtrados na concentração de 50% (v/v), *V. minima* e *P. macrosporus* inibiram completamente o desenvolvimento micelial e reduziram drasticamente a formação de escleródios. No teste de antibiose com compostos fúngicos voláteis, apenas o fungo *P. macrosporus* apresentou atividade inibitória. Em relação a inibição de germinação de ascósporos, o fungo *Myrothecium* sp. inibiu cerca de 90% a germinação dos ascósporos, resultado semelhante ao padrão fluazinam. No teste *in vivo*, os fungos *V. minima* e *P. macrosporus* apresentaram os menores valores de AACPD. Conclui-se que os fungos sapróbios estudados apresentaram potencial de controle do mofo branco da soja e que estudos futuros devem ser realizados para melhorar o entendimento do modo de ação dos metabólitos fúngicos e a eficiência de controle da doença no campo, incluindo forma, momento e número de aplicações do fungo sapróbio.

Palavras-chave: antibiose, ascósporos; controle biológico, metabólitos fúngicos

Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mold of soybean using saprobic fungi from semi-arid areas of northeastern Brazil

Abstract

Key words: antibiosis, ascospores; biological control, fungal metabolites

Introdução

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary é o agente causal do mofo branco da soja, doença que em condição de temperaturas amenas e alta umidade pode causar perdas de até 30% na cultura (NASSER et al., 1999). É considerado um fungo habitante de solo e polífago, podendo infectar mais de 400 espécies de plantas (BOLAND e HALL, 1994).

Esse fitopatógeno produz estruturas de resistência denominadas escleródios, que podem sobreviver no solo por anos. Em condições climáticas ideais esses germinam formando os apotécios, onde são formados os ascósporos, que são os responsáveis pela infecção das plantas (DHINGRA et al., 2009).

A fase mais suscetível da cultura é a partir da floração (R1) até o enchimento de grãos (R5) (DANIELSON et al., 2004). O controle dessa doença é complexo devido a esse amplo intervalo de suscetibilidade, à falta de resistência genética e à dificuldade de se conciliar a aplicação de fungicidas com a época de liberação de ascósporos (BARDIN; HUANG, 2001; MORTON; HALL, 1989).

Por esses motivos a utilização de controle alternativo, como o controle biológico, é uma estratégia de grande valia para o agricultor (ETHUR; CEMBRANEL; SILVA, 2001). Estudos empregando fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* vêm mostrando bons resultados no controle de diversos fitopatógenos (PRAPAGDEE et al., 2008; FERNANDO et al., 2007; ÁVILA et al., 2005). Porém, inúmeras espécies de microrganismos podem ser empregados como agentes de controle biológico.

Os fungos sapróbios, por meio da ação de várias enzimas, atuam como decompositores da matéria orgânica do solo, constituindo um papel importante para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas por meio da ciclagem de nutrientes (GRANDI; GUSMÃO, 1998). Nos últimos anos, os fungos sapróbios têm recebido uma atenção especial como agentes de controle biológico e indutores de resistência (YEDIDIA et al., 2003). Trabalhos de prospecção da biodiversidade fúngica do semiárido têm sido conduzidos e vários fungos sapróbios da serapilheira de florestas da caatinga do Nordeste foram identificados (ALMEIDA; IZABEL;

GUSMÃO, 2011; BARBOSA; GUSMÃO, 2011; IZABEL et al., 2011; LEÃO-FERREIRA; GUSMÃO; RUIZ, 2013).

Nesse contexto, objetivou-se a seleção de fungos sapróbios isolados do semi-árido nordestino brasileiro, para o controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* e do mofo branco em plantas de soja.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Obtenção e manutenção dos isolados dos fungos sapróbios e de *S. sclerotiorum*

Utilizaram-se quatro fungos sapróbios, *Myrothecium* sp., *Volutella minima*, *Phialomyces macrosporus* e *Dictyosporium tetraseriale*, isolados na região do semi-árido do Nordeste brasileiro, depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB). Os isolados foram mantidos em placas de Petri contendo meio BDA a 25°C, com fotoperíodo de 12/12 horas.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* foi obtido em campo de produção naturalmente infectado na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, no Paraná. Os escleródios foram coletados e submetidos a assepsia por imersão em álcool a 10% por três minutos, em seguida foi realizado uma tríplice lavagem com água destilada e esterilizada. Posteriormente, foram imergidos em solução de hipoclorito de sódio a 0,12% por três minutos, e lavados três vezes com água destilada e esterilizada. Os escleródios ficaram em câmara de fluxo laminar por 12 horas para secagem. Após esse período, os escleródios foram transferidos a placas de Petri contendo meio BDA e incubados a 20°C na ausência de luz por quatro dias. Após a germinação, o micélio do fungo foi repicado em placas de Petri, contendo meio BDA, e incubado nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.1.2 OBTENÇÃO DOS FILTRADOS DOS FUNGOS SAPRÓBIOS

Para a obtenção dos filtrados, os fungos sapróbios foram repicados em Erlenmeyer contendo meio líquido batata-dextrose (BD), e incubados a 25°C ± 2°C com fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro por 10 dias e transferidos a 5°C±2°C por 48 horas. O sobrenadante foi separado com auxílio de papel filtro e centrifugado duas vezes a 5000 rpm por 15 minutos para separação das células fúngicas. O sobrenadante foi armazenado a 5°C para utilização nos testes.

3.1.3 EFEITO DOS FILTRADOS FÚNGICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL

Os filtrados foram obtidos conforme item 3.2 e incorporados nas concentrações de 5% e 50% (v/v) em meio BDA fundente. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Discos de *S. sclerotiorum* de 5 mm de diâmetro, retirados de colônias com três dias de crescimento, foram repicados no centro da placa, e incubados a $20^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12/12 horas por 21 dias.

Para verificar a velocidade de crescimento micelial, mediu-se o diâmetro da colônia diariamente até seu crescimento máximo (9 cm). O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado de acordo com Oliveira (1991). Aos vinte e um dias após a repicagem, determinou-se o número e o peso total dos escleródios formados.

3.1.4 EFEITO DOS FILTRADOS FÚNGICOS NA GERMINAÇÃO DE ASCÓSPOROS

O ensaio avaliou o efeito dos filtrados fúngicos na germinação de ascósporos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Os tratamentos, foram os quatro filtrados fúngicos, o fungicida comercial fluazinam (tratamento padrão) e a testemunha.

Para obtenção dos ascósporos, os escleródios foram semeados em caixas de poliestireno transparentes (11 x 11 x 3,5 cm) contendo solo autoclavado e umedecido e incubados a $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12/12 horas por 45 dias. Após esse período, os apotécios foram cortados pelas estipes e macerados em cadinhos de cerâmica com 10 mL de água destilada e esterilizada (TOLÊDO-SOUZA; COSTA, 2003).

Posteriormente, alíquotas de 50 μL dos filtrados fúngicos, obtidos como descrito no item 3.2, foram adicionadas em células de placas de ELISA contendo 50 μL da suspensão de ascósporos contendo 2×10^5 ascósporos/mL. Após homogeneização, transferiu-se uma alíquota de 50 μL para placas de Petri contendo meio ágar-água. As placas foram incubadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ na presença de luz por seis

horas. Para paralisar a germinação utilizou-se o corante azul de lactofenol. Avaliaram-se 100 ascósporos por placa, sendo considerados germinados aqueles que possuíam o tubo germinativo com tamanho maior ou igual ao diâmetro do ascósporo.

3.1.5 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NO DESENVOLVIMENTO MICELIAL

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (os quatro isolados fúngicos e a testemunha) e cinco repetições. O teste foi realizado em placas de poliestireno com uma divisória. Os fungos sapróbios foram cultivados somente em um dos lados da placa em meio BDA e incubados a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12/12 horas por sete dias. Posteriormente, um disco de 5 mm de diâmetro de micélio de *S. sclerotiorum*, foi repicado na divisão oposta da placa. No caso do fungo *P. macrosporus*, a repicagem do fitopatógeno foi realizada três dias após a repicagem do sapróbio por este ser de crescimento rápido. As placas foram mantidas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o crescimento de *S. sclerotiorum* ocupar toda a divisão nas placas controle. O diâmetro de da colônia foi medido diariamente para o cálculo do IVCM conforme citado no item 3.3. O número e peso dos escleródios formados foram avaliados vinte e um dias após a repicagem.

3.1.6 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NA GERMINAÇÃO DOS ASCÓSPOROS

O delineamento experimental e o cultivo dos fungos sapróbios foi igual ao descrito em 3.5. Posteriormente, verteu-se meio ágar-água na divisão oposta da placa onde foi depositada uma alíquota de 50 μL de suspensão de ascósporos na concentração de 2×10^5 obtida conforme item 3.4. As placas foram incubadas na luz a 25°C . Após seis horas, a germinação foi paralisada utilizando azul de lactofenol. Foram contados 200 ascósporos por placa, considerando germinados aqueles em que o tamanho do tubo germinativo era maior ou igual ao diâmetro do ascósporo.

3.1.7 CONTROLE DE MOFO BRANCO NA SOJA

O delineamento experimental foi de blocos casualizados com cinco tratamentos e cinco repetições. Sementes da cultivar BMX Potência RR foram semeadas em vasos de um litro contendo uma mistura de solo e areia na proporção 1:1. Os tratamentos foram aplicados quando as plantas atingiram o estágio V4 (quarto trifólio completamente expandido). A preparação dos filtrados foi a mesma descrita no item 3.3.

Três dias após o tratamento com os fungos sapróbios, as plantas foram inoculadas com o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*. Para a inoculação, a base de ponteiros de micropipetas de 200 µL foram utilizadas para retirar discos de micélio a partir das colônias de *S. sclerotiorum* com três dias de crescimento em meio de cultura BDA (20 °C e fotoperíodo 12/12 horas) Essas ponteiros com o inóculo na base foram colocadas nas hastes de soja previamente cortadas com tesoura estéril 0,5 cm acima da última inserção foliar totalmente expandida (4º trifólio). Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 20 ± 2°C e fotoperíodo de 12/12 h. Após a inoculação, o comprimento das lesões causadas por *S. sclerotiorum* foi avaliado semanalmente. O comprimento da lesão foi medido a partir da extremidade da haste onde se encontrava a ponteira.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1 FILTRADOS FÚNGICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

Os dados de índice de velocidade de crescimento micelial, número e peso total dos escleródios produzidos encontram-se na Tabela 1.

Considerando a incorporação dos filtrados a 5%, somente o fungo *Phialomyces macrosporus* determinou um IVCM de *Sclerotinia sclerotiorum* estatisticamente diferente da testemunha, com índice de 0,7 cm/dia. O mesmo comportamento foi observado na repetição do ensaio, onde o IVCM foi igual. Em relação ao número de escleródios produzidos, quando os filtrados foram incorporados ao 5%, observa-se que todos os tratamentos foram diferentes da testemunha, reduzindo a quantidade de escleródios produzida, nas duas repetições dos ensaios. A respeito do peso dos escleródios, todos os filtrados testados exceto o de *Myrothecium* sp. apresentaram redução no peso total dos escleródios nas duas avaliações.

Quando houve incorporação do filtrado a 50% observou-se que todos os tratamentos apresentaram redução do IVCM. Os filtrados dos fungos *Myrothecium* sp. e *Dictyosporium tetraseriale* apresentaram um IVCM de 0,4 e 0,5 cm/dia, respectivamente. Os filtrados dos fungos *Volutella minima* e *Phialomyces macrosporus* inibiram totalmente o crescimento micelial. O mesmo comportamento dos filtrados foi observado nas duas repetições dos ensaios. Todos os tratamentos com filtrados fúngicos reduziram o número de escleródios formados. O filtrado do fungo *Myrothecium* sp. determinou a não formação dessas estruturas.

Tabela 1 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), número e peso de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* formados em meio de cultura batata-dextrose-ágar com incorporação de filtrados dos fungos sapróbios em duas concentrações (5% e 50%). Londrina, 2014.

Tratamentos	IVCM (cm/dia)***		Nº escleródio		Peso escleródio (g)	
	5%	50%	5%	50%	5%	50%
Testemunha*	2,4 a ¹	2,4 a	26,4 a	21,6 a	0,25 ^a	0,3b
<i>Myrothecium</i> sp.	1,8 a	0,4 b	10,6 b	0,0 b	0,22 ^a	0,0 a
<i>Volutella minima</i>	2,1 a	0,0 c	3,8 b	6,0 b	0,08b	0,08a
<i>Phialomyces macrosporus</i>	0,7 b	0,0 c	3,7 b	0,5 b	0,05b	0,01a
<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	2,4 a	0,5 b	5,0 b	3,6 b	0,08b	0,05a
C.V.(%)	7,4		52,6		62,5	
Testemunha**	2,4 a	2,4 a	28,7 a	19,8 a	0,30 ^a	0,3b
<i>Myrothecium</i> sp.	1,9 a	0,4 b	12,3 b	0,0 b	0,25 ^a	0,0 a
<i>Volutella minima</i>	2,1 a	0,0 c	2,9 b	5,4 b	0,08b	0,08a
<i>Phialomyces macrosporus</i>	0,7 b	0,0 c	3,7 b	0,5 b	0,05b	0,01a
<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	2,4 a	0,8 b	5,0 b	2,3 b	0,09b	0,05a
C.V.(%)	7,6		54,2		61,5	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste Tukey a 5%. *Médias avaliadas no primeiro ensaio. **Médias avaliadas no segundo ensaio. ***IVCM=(Diâm. final-Diâm. inicial)/(Dia final-Dia inicial).

ABDULLAH et al. (2008) testando filtrados de *Bacillus amyloliquefaciens* observaram inibição, de no máximo, 55% do crescimento micelial e de 50% na formação de escleródios de *S. sclerotiorum*. ÁTILA et al. (2005) testando dez isolados de *Trichoderma*, observaram que dois isolados tiveram o potencial de inibição de 100% do crescimento da colônia do patógeno. Trabalho conduzido por ZANCAN et al. (2012), comparando o uso de fungicidas e *Trichoderma* spp., *in vitro*, demonstraram que os fungicidas tiofanato metílico e fluazinam foram capazes de inibir em 100% a formação de escleródios, porém com doses acima de 100 ppm. Quando empregado o agente de controle biológico, não observaram inibição na formação de escleródios.

BARROS (2014) estudou o efeito de cinco doses de filtrados do fungo *Myrothecium* sp. e observou que a dose de 10% (v/v) inibiu o crescimento micelial em 30%.

ZHENG et al. (2011), buscando novos agentes de controle biológico para o fitopatogêno *Verticillium dahliae* constatou que, dentre 105 isolados fúngicos,

os isolados pertencentes ao gênero *Myrothecium* apresentaram uma atividade antagônica, *in vitro* e *in vivo*, considerada mediana.

4.1.2 EFEITO DOS FILTRADOS FÚNGICOS NA GERMINAÇÃO DE ASCÓSPOROS

Na Tabela 2 estão apresentados os dados de germinação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* após o tratamento com os filtrados dos fungos sapróbios e do fungicida fluazinam. O tratamento com o filtrado do fungo *Phialomyces macrosporus* não diferiu da testemunha, apresentando germinação de 89% dos ascósporos. Os tratamentos com *Dictyosporium tetraseriale* e *Volutella minima* apresentaram inibições de 24,4% e 29,7% respectivamente, porém, foram inferiores aos tratamentos com fluazinam e *Myrothecium* sp. que apresentaram controle de 90,5% e 97,2% respectivamente. Os resultados obtidos na repetição dos ensaios seguiram as mesmas tendências do primeiro ensaio.

Sumida (2012) estudando o efeito de diferentes fungicidas na germinação de ascósporos, observou que o fluazinam inibiu 100% a germinação. Fungicidas como tiofanato metílico, iprodione e procimidona apresentaram inibição de 30%, 35% e 7.5% respectivamente.

Na literatura, os trabalhos com inibição de germinação de ascósporos são raros. Porém, produtos que possam realizar essa inibição são importantes para o controle da doença no campo, uma vez que a infecção ocorre fundamentalmente por meio dessas estruturas.

Tabela 2 - Efeito dos filtrados dos fungos sapróbios e do fungicida fluazinam sobre a germinação dos ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum*. Londrina, 2014.

Tratamentos	Germinação (%)		Inibição da germinação (%)
Testemunha*	92,8 ¹	a	---
<i>Phialomyces macrosporus</i>	89,0	a	4,10
<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	70,2	b	24,4
<i>Volutella minima</i>	65,2	b	29,7
Flua zinam	8,80	c	90,5
<i>Myrothecium</i> sp.	2,60	c	97,2
C.V (%)			6,4
Testemunha**	94,2	a	---
<i>Phialomyces macrosporus</i>	89,3	a	3,80
<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	72,3	b	22,1
<i>Volutella minima</i>	64,2	b	30,8
Flua zinam	8,70	c	90,6
<i>Myrothecium</i> sp.	3,10	c	96,7
C.V (%)			6,8

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste Tukey a 5% de probabilidade. *Médias avaliadas no primeiro ensaio. **Médias avaliadas no segundo ensaio.

4.1.3 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NO DESENVOLVIMENTO MICELIAL

Somente os voláteis do fungo *Phialomyces macrosporus* exerceram inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (diâmetro ao terceiro dia e IVCM). Em relação ao número de escleródios, o tratamento com os fungos *Volutella minima* e *P. macrosporus* determinaram menor formação dessas estruturas diferindo da testemunha e dos demais tratamentos. O peso dos escleródios não foi alterado por nenhum dos tratamentos (Tabela 3).

O efeito inibitório de substâncias voláteis produzidas por *P. macrosporus* é relatado na literatura sobre a fitobactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e sobre produção micelial e de esporos do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (BOTREL, 2013; PINTO, 2013).

Compostos orgânicos voláteis são substâncias de baixa polaridade e peso molecular, com no máximo 20 átomos de carbonos em sua cadeia molecular. Podem transpor membranas com facilidade e serem liberados na atmosfera ou no solo (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). Devido a essas características e a

distribuição eficiente pela porosidade do solo, os compostos orgânicos voláteis podem converter-se numa estratégia de controle de fungos habitantes de solo (DUDAREVA et al., 2006).

Tabela 3 - Efeito dos voláteis dos fungos sapróbios sobre o diâmetro da colônia ao terceiro dia, o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), a quantidade de escleródios produzidos e o peso total dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Londrina, 2014.

Tratamentos	Diâmetro colônia ao 3º dia (cm.)	IVCM*** (cm/dia)	Nº de escleródios	Peso de escleródios (g)
Testemunha*	8,0 ¹ a	2,6 a	15,4 a	0,18 ^{n.s}
<i>Volutella minima</i>	8,0 a	2,6 a	8,2 b	0,13
<i>Myrothecium sp.</i>	7,8 a	2,6 a	12,4 a	0,12
<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	7,5 a	2,5 a	10,6 b	0,13
<i>Phialomyces macrosporus</i>	3,2 b	1,2 b	8,8 b	0,07
C.V (%)	12,6	12,7	50,5	57,9
Testemunha**	8,0 a	2,6 a	15,4 a	0,18 ^{n.s}
<i>Volutella minima</i>	8,0 a	2,6 a	8,0 b	0,13
<i>Myrothecium sp.</i>	7,8 a	2,6 a	12,3 a	0,12
<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	7,8 a	2,6 a	11,2 b	0,13
<i>Phialomyces macrosporus</i>	3,2 b	1,2 b	9,1 b	0,07
C.V (%)	12,6	12,2	51,5	56,9

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste Tukey a 5% de probabilidade. *Médias avaliadas no primeiro ensaio. **Médias avaliadas no segundo ensaio. n.s= não significativo no teste Tukey a 5% de probabilidade. ***IVCM=(Diâm. final-Diâm. inicial)/(Dia final-Dia inicial).

4.1.4 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NA GERMINAÇÃO DOS ASCÓSPOROS

O efeito dos voláteis produzidos por fungos sapróbios sobre a germinação de ascósporos de *S. sclerotiorum* nas duas repetições do ensaio, se encontram na Tabela 4. Somente o fungo *P. macrosporus* apresentou atividade inibitória.

Tabela 4 - Efeito dos voláteis produzidos por fungos sapróbios sobre a germinação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum*. Londrina, 2014.

Tratamentos	Germinação (%)		Inibição da germinação (%)
Testemunha*	96,0 ¹	a	---
<i>Myrothecium</i> spp	84,6	a	11,9
<i>Volutella minima</i>	85,6	a	10,8
<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	92,6	a	3,5
<i>Phialomyces macrosporus</i>	67,6	b	29,6
C.V (%)			8,1
Testemunha**	96,8	a	---
<i>Myrothecium</i> spp	84,9	a	11,9
<i>Volutella minima</i>	86,5	a	10,8
<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	92,6	a	3,5
<i>Phialomyces macrosporus</i>	67,8	b	29,6
C.V (%)			8,6

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste Tukey a 5% de probabilidade. *Médias avaliadas no primeiro ensaio. **Médias avaliadas no segundo ensaio. n.s= não significativo no teste Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.5 CONTROLE DE MOFO BRANCO NA SOJA

Após sete dias da inoculação, as plantas tratadas com ASM e com o fungo *D. tetraseriale* apresentaram um comprimento de lesão igual ao das plantas sem tratar e inoculadas com *S. sclerotiorum* (testemunha). Os tratamentos com filtrados de *Myrothecium* sp. e *P. macrosporus* apresentaram menor comprimento de lesão, porém, superior ao do tratamento com *V. minima*, onde a lesão foi de 0,5 cm (Tabela 5).

No décimo quarto dia após a inoculação, todos os tratamentos testados apresentaram o comprimento da lesão menor que a testemunha. Os tratamentos com o indutor ASM e o fungo *D. tetraseriale*, apresentaram comprimentos de 6,9 cm e 7,1 cm, respectivamente, ambos inferiores ao da testemunha, mas superiores aos dos outros tratamentos. O tratamento com *Myrothecium* sp. apresentou uma lesão de 6,1 cm, inferior aos tratamentos citados anteriormente, porém superior aos tratamentos com *P. macrosporus* e *V. minima* onde as lesões foram de 2,1 cm e 1,9 cm, respectivamente.

Aos 21 DAI, os tratamentos com os fungos *D. tetraseriale* e *Myrothecium* sp. apresentaram lesões de 9,8 cm e 9,7 cm, respectivamente, valores

que não diferiram dos da testemunha (10,0 cm) e do tratamento com o indutor ASM (9,5 cm). Os tratamentos com *P. macrosporus* e *V. minima* com lesões de 3,2 cm e 3,1 cm, respectivamente, foram os que apresentaram maior redução da severidade do mofo branco. Em relação a AACPD, o tratamento com *D. tetraseriale* foi o único que não reduziu o progresso da doença. O tratamento com o indutor ASM diferiu da testemunha, porém foi estatisticamente igual a *D. tetraseriale*. O tratamento com *V. minima* foi o que mais reduziu o avanço da doença, seguido pelos tratamentos com *P. macrosporus* e *Myrothecium* sp.

Tabela 5 - Comprimento da lesão de mofo branco aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação (DAI) e área abaixo da curva do progresso de doença (AACPD) em plantas de soja tratadas com fungos sapróbios, Acibenzolar-S-Metílico (ASM) e inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*. Londrina, 2014.

Tratamentos	Comprimento da lesão (cm)			AACPD	% redução AACPD
	7 DAI	14 DAI	21 DAI		
Testemunha	5,3 ¹ a	7,4 a	10,0 a	66,1 a	---
ASM	5,3 a	6,9 b	9,5 b	63,8 b	3,4
<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	5,3 a	7,1 b	9,8 ab	64,9 ab	1,8
<i>Myrothecium</i> sp.	0,8 b	6,1 c	9,7 ab	29,2 c	55,8
<i>Phialomyces macrosporus</i>	0,8 b	2,1 d	3,2 c	13,4 d	79,7
<i>Volutella minima</i>	0,5 c	1,9 d	3,1 c	11,1 e	83,2
C.V (%)	3,3	2,6	1,8	1,6	

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste Tukey a 5% de probabilidade.

O fungo *P. macrosporus* é relatado na literatura como um possível agente indutor de resistência em plantas de café contra *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (BOTREL, 2013) e *Colletotrichum gloeosporioides* (PINTO, 2013) e em plantas de eucaliptos contra *Puccinia psidii* (PIEROZZI, 2013).

No presente trabalho, os fungos *P. macrosporus* e *V. minima* determinaram um controle do mofo branco através da diminuição da severidade da doença. Por outro lado, os resultados obtidos com o ASM corroboram os obtidos por Barros (2013), quem observou que este indutor, não teve efeito significativo no controle de *S. sclerotiorum* em plantas de soja.

Conclusão

A partir dos resultados dos ensaios *in vitro* de metabólitos não voláteis, podemos concluir que os fungos sapróbios *V. minima* e *P. macrosporus* são potenciais agentes controladores do fitopatôgeno *S. sclerotiorum*.

O fungo *P. macrosporus* produz substâncias voláteis com atividade inibitória tanto do crescimento micelial quando da germinação dos ascósporos de *S. sclerotiorum*

No experimento *in vivo*, os fungos *V. minima* e *P. macrosporus*, aplicados três dias antes da inoculação do fungo, apresentaram controle do mofo branco da soja.

Artigo B

Controle de *Xanthomonas vesicatoria* e da mancha bacteriana do tomateiro usando fungos sapróbios do semi-árido nordestino

Resumo

A mancha bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas vesicatoria*, é uma doença frequente nos campos de cultivo de tomate causando importantes perdas econômicas. Devido à dificuldade de controle com os métodos tradicionais, novas medidas de controle para esta doença, como o controle biológico vem ganhando destaque. O objetivo deste trabalho foi a seleção de fungos sapróbios do semi-árido nordestino para o controle de *X. vesicatoria* e da mancha bacteriana do tomateiro. Foram testados os fungos sapróbios *Memnoniella levispora*, *Periconia hispidula*, *Zygosporium echinosporum* e *Cloridium virescens* var. *virescens*. Para determinar o potencial de controle sobre a bactéria fitopatogênica, filtrados e voláteis fúngicos foram testados *in vitro*. Para determinar o controle da mancha bacteriana, foi realizado um experimento *in vivo* com plantas de tomate tratadas com os filtrados fúngicos e inoculadas com *X. vesicatoria*. Os resultados indicaram que a incorporação de filtrados fúngicos no meio de cultura a 5% e 50% (v/v) controlou o crescimento da bactéria em 28,9% e 53,8%, respectivamente. Quando testados os voláteis produzidos pelos fungos sapróbios, apenas *C. virescens* var. *virescens*, inibiu 24,4% das unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas. Quando os filtrados fúngicos foram aplicados nas plantas de tomateiro, todos os tratamentos testados diminuíram a área abaixo da curva de progresso da mancha bacteriana, mostrando um nível de controle igual ao indutor de resistência comercial utilizado como padrão (Acibenzolar-S-metílico). A sistemicidade deste controle foi confirmada pois a aplicação dos tratamentos somente na terceira folha, determinou menor severidade da doença na quarta folha. Conclui-se que os fungos sapróbios estudados apresentaram potencial de biocontrole do *X. vesicatoria* e que estudos futuros devem ser realizados para melhorar o entendimento do modo de ação dos metabólitos fúngicos e da eficiência de controle da mancha bacteriana no campo, incluindo forma, momento e número de aplicações do fungo sapróbio.

Palavras-chave: Acibenzolar-S-metílico; antibiose, controle biológico; metabólitos fúngicos.

Biocontrol of *Xanthomonas vesicatoria* and tomato bacterial spot using saprobic fungi from semi-arid areas of northeastern Brazil

Abstract

Key words: Acibenzolar-S-methyl; antibiosis; biological control, fungal metabolites

Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) é a hortaliça mais cultivada no Brasil. A cultura, porém, é afetada por muitas doenças, dentre elas, a mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria*. Esta doença é muito destrutiva podendo afetar toda a parte aérea do tomateiro (Lopes; Santos, 1994), provocando grandes perdas econômicas.

O controle químico para essa bacteriose, como a aplicação de antibióticos e fungicidas à base de cobre, vem sendo utilizado nas lavouras comerciais de tomate. Entretanto, devido ao rápido aumento da quantidade de inóculo e a fácil disseminação do patógeno, em muitos casos não tem sido eficiente para o controle da doença (ARAÚJO et al., 2003) além de provocar desequilíbrios no agroecossistema (BETTIOL; GHINI, 2003).

Neste contexto o controle biológico pode ser uma alternativa viável para o agricultor, pois, uma vez estabelecido o agente de biocontrole, esse tende a durar por vários anos no local, ajudando a diminuir o inóculo da doença (BETTIOL; GHINI, 2003).

Os fungos sapróbios, por meio da ação de várias enzimas, atuam como decompositores da matéria orgânica do solo, constituindo um papel importante para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas por meio da ciclagem de nutrientes (GRANDI; GUSMÃO, 1998). Nos últimos anos, os fungos sapróbios têm recebido uma atenção especial como agentes de controle biológico e indutores de resistência (YEDIDIA et al., 2003). Trabalhos de prospecção da biodiversidade fúngica do semiárido têm sido conduzidos e vários fungos sapróbios da serapilheira de florestas da caatinga do Nordeste foram identificados (ALMEIDA; IZABEL; GUSMÃO, 2011; BARBOSA; GUSMÃO, 2011; IZABEL et al., 2011; LEÃO-FERREIRA; GUSMÃO; RUIZ, 2013).

Nesse contexto objetivou-se a seleção de fungos sapróbios do semi-árido nordestino, para controle de *Xanthomonas vesicatoria* e da mancha bacteriana em plantas de tomateiro.

Materiais e Métodos

3.2.1 Obtenção e manutenção dos isolados dos fungos sapróbios e de *S. sclerotiorum*

Utilizaram-se quatro fungos sapróbios, *Memnoniella levispora*, *Periconia hispidula*, *Zygosporium echinosporum* e *Cloridium virescens* var. *virescens*, isolados na região do semi-árido do Nordeste brasileiro, depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB). Os isolados foram mantidos em placas de Petri contendo meio BDA a 25°C, com fotoperíodo de 12/12 horas.

O isolado da bactéria *Xanthomonas vesicatoria* foi cedido pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). A fitobactéria foi mantida em meio nutriente ágar, a 30°C, na ausência de luz.

3.2.2 OBTENÇÃO DOS FILTRADOS FÚNGICOS

Para a obtenção dos filtrados, os fungos sapróbios foram repicados em Erlenmeyer contendo meio líquido batata-dextrose (BD), e incubados a 25°C ± 2°C com fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro por 10 dias e transferidos a 5°C ± 2°C por 48 horas. O sobrenadante foi separado com auxílio de papel filtro e centrifugado duas vezes a 5000 rpm por 15 minutos para separação das células fúngicas. O sobrenadante foi armazenado a 5°C para utilização nos testes.

3.2.3 EFEITO DOS FILTRADOS DOS FUNGOS SAPRÓBIOS SOBRE *XANTHOMONAS VESICATORIA*

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco repetições. Os filtrados dos quatro fungos, obtidos conforme item 3.2, foram incorporados em meio nutriente ágar (NA) ainda fundente nas concentrações de 5% e 50% (v/v). A suspensão bacteriana foi obtida a partir de colônias com crescimento de 18 horas em meio NA a 30°C. Uma alíquota de 50µL da suspensão bacteriana,

na concentração de 10^8 UFC/mL, foi espalhada com alça de Drigalsky nas placas. As placas foram incubadas a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por três dias quando foi avaliado o número de colônias formadas. A testemunha consistiu na incorporação de meio líquido BD.

3.2.4 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Utilizaram-se placas de poliestireno com uma divisória, onde em um dos lados da placa verteu-se o meio BDA e repicaram-se discos de 5 mm dos fungos sapróbios. Estas placas foram incubadas a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12/12 horas por sete dias. Após este período, verteu-se meio NA no lado oposto da placa, sobre o qual foi transferida uma alíquota de 50 μL de suspensão bacteriana obtida conforme descrito no item 3.3. As placas foram incubadas nas condições descritas anteriormente. Após três dias procedeu-se à contagem das colônias bacterianas formadas.

3.2.5 CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com seis tratamentos e cinco repetições. Utilizaram-se plantas de tomate do grupo Santa Cruz variedade Kada. As mudas foram semeadas em bandejas de 180 células contendo substrato comercial. O transplântio ocorreu 21 dias após a semeadura em vasos de um litro contendo uma mistura de solo e areia na proporção 1:2.

Os fungos sapróbios foram cultivados em meio líquido BD e incubados a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12/12 horas por 10 dias. Após esse período, acrescentou-se 100 mL de água destilada e esterilizada e homogeneizou-se em liquidificador. Os tratamentos foram aplicados em ambos os lados das folhas do tomateiro com auxílio de algodão. Como controle positivo utilizou-se o indutor comercial acibenzolar-S-metílico (ASM), e como controle negativo utilizaram-se plantas tratadas com água destilada e esterilizada além de um controle com meio BD.

A inoculação da bactéria foi realizada três dias após a aplicação dos tratamentos. Foram utilizadas colônias com 18 horas de crescimento em meio NA. A

suspensão bacteriana foi preparada com solução salina a 0,85% na concentração de 10^8 UFC/mL e aplicada nas plantas com auxílio de pulverizador. As plantas foram mantidas em câmara úmida 48 horas antes e 48 horas após a inoculação. A porcentagem de área foliar afetada foi avaliada semanalmente, na mesma folha, de acordo com a escala proposta por Mello, Takatsu e Lopes (1997). Com os dados das três avaliações realizou-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

3.2.6 SISTEMATICIDADE DO TRATAMENTO

O delineamento experimental foi de blocos casualizados com seis tratamentos e cinco repetições. Foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.5, exceto pela aplicação do tratamento que foi realizado somente na terceira folha. A avaliação da severidade da doença foi realizada na 3ª e 4ª folha. Com os dados das avaliações de severidade, calculou-se a AACPD.

Resultados e discussão

4.2.1 EFEITO DOS FILTRADOS DOS FUNGOS SAPRÓBIOS SOBRE *XANTHOMONAS VESICATORIA*

O efeito da incorporação de duas concentrações de filtrados fúngicos (5% e 50% v/v) no crescimento de *X. vesicatoria* pode ser observado na Tabela 6.

Na concentração de 5% observa-se que o filtrado do fungo *Zygosporium echinosporum* e *Cloridium virescens* var. *virescens* apresentaram controle de 21,9% e 28,9%, respectivamente. *Periconia hispidula* não se diferenciou da testemunha. O filtrado de *Memnoniella levispora* apresentou controle de 7,0% diferenciando da testemunha e do *P. hispidula* porém inferior aos tratamentos com filtrados de *Z. echinosporum* e *C. virescens* var. *virescens*

Quando houve incorporação de 50% de filtrados no meio de cultura, observa-se que todos os tratamentos diferenciaram-se da testemunha. Os

tratamentos com *M. levispora* (23,4%) e *P. hispidula* (18,4%), não foram diferentes entre si. Os tratamentos com *Z. echinosporum* (48,8%) e *C. virescens var. virescens* (51,25), estatisticamente foram os que apresentaram maior controle. Observa-se também que houve diferença entre as doses testadas, a 50% houve um maior controle que a 5%.

Estudos mostrando o efeito de metabólitos fúngicos controlando bactérias são escassos na literatura. Porém, buscas por novos princípios ativos para controle de fitobactérias é de fundamental importância, pois, a quantidade de produtos bactericidas registrados no Brasil é baixo quando comparado aos fungicidas.

Tabela 6 - Efeito de duas concentrações de filtrados de fungos sapróbios nas unidades formadora de colônias (UFC) de *Xanthomonas vesicatoria*. Londrina, 2014.

Tratamentos	Filtrados a 5%		Filtrados a 50%	
	UFC	% inibição	UFC	% inibição
Testemunha*	201 ¹	Aa	----	----
<i>Memnoniella levispora</i>	187	Ab	7,0	154 Bb 23,4
<i>Periconia hispidula</i>	198	Aa	1,5	164 Bb 18,4
<i>Zygosporium echinosporum</i>	157	Bc	21,9	103 Bc 48,8
<i>Chloridium virescens var. virescens</i>	143	Bc	28,9	98 Bc 51,2
C.V. (%)		3,7		4,1
Testemunha**	212	Aa	----	----
<i>Memnoniella levispora</i>	198	Aa	6,6	162 Bb 23,6
<i>Periconia hispidula</i>	200	Aa	5,7	178 Bb 16,0
<i>Zygosporium echinosporum</i>	178	Ab	16,0	102 Bc 51,9
<i>Chloridium virescens var. virescens</i>	153	Ac	27,8	98 Bc 53,8
C.V. (%)		5,6		5,3

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si no teste Tukey a 5% de probabilidade. *Médias avaliadas no primeiro ensaio. **Médias avaliadas no segundo ensaio.

4.2.2 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS SOBRE XANTHOMONAS VESICATORIA

O efeito dos voláteis produzidos por fungos sapróbios sobre o crescimento de *X. vesicatoria* pode ser observado na tabela 7.

O único tratamento que reduziu o número de unidades formadoras de colônias foi *C. virescens var. virescens*, com controle aproximado de 25 %. Os tratamentos com filtrados de *P. hispidula* e *Z. echinosporum* aumentaram o número

de UFC quando comparados à testemunha. O tratamento com *M. levispora* não se diferenciou da testemunha.

Compostos orgânicos voláteis são moléculas de baixo peso molecular. Por se tratar de composto gasosos, sua difusão na membrana plasmática é facilitada podendo ser uma boa estratégia para o controle de fitopatógenos (DUDAREVA et al., 2006).

Dos fungos testados, somente *C. virescens* var. *virescens* apresentou efeito inibitório na bactéria fitopatogênica, porém estudos futuros são necessários para identificação desse composto e para sua utilização em larga escala.

Tabela 7 - Efeito de compostos voláteis de fungos sapróbios nas unidades formadoras de colônias (UFC) de *Xanthomonas vesicatoria*. Londrina, 2014.

Tratamentos	UFC		% inibição
Testemunha	245 ¹	b	----
<i>Memnoniella levispora</i>	266	b	-8,6
<i>Periconia hispidula</i>	385,6	a	-57,4
<i>Zygosporium echinosporum</i>	299,6	a	-22,3
<i>Chloridium virescens</i> var. <i>virescens</i>	185,2	c	24,4
C.V. (%)			3,7
Testemunha	283	b	----
<i>Memnoniella levispora</i>	299	b	-22,0
<i>Periconia hispidula</i>	401,3	a	-63,8
<i>Zygosporium echinosporum</i>	399,6	a	-63,1
<i>Chloridium virescens</i> var. <i>virescens</i>	181,6	c	25,9
C.V. (%)			4,2

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste Tukey a 5% de probabilidade. *Médias avaliadas no primeiro ensaio. **Médias avaliadas no segundo ensaio.

4.2.3 CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO

Nos dois ensaios, os tratamentos com filtrados dos fungos sapróbios apresentaram controle de aproximadamente 70 % da mancha bacteriana (Tabela 8). No segundo ensaio, observa-se que os tratamentos foram diferentes da testemunha e diferentes entre eles. O tratamento com *P. hispidula* que apresentou o maior controle da doença com 3,0% da área foliar afetada.

No décimo quarto dia após a inoculação, no primeiro ensaio, todos os tratamentos diferenciaram-se da testemunha, mas o tratamento com *Z. echinosporum* apresentou menor área foliar afetada. No segundo ensaio, todos os tratamentos diferenciaram-se da testemunha, porém, não houve diferença entre estes.

Tabela 8 - Severidade e área abaixo da curva de progresso da mancha bacteriana de tomate (AACPD) aos sete, quatorze e vinte um dias após inoculação (DAI) com *Xanthomonas vesicatoria* em plantas tratadas com filtrados de fungos sapróbios. Londrina, 2014.

Tratamentos	Área foliar afetada (%)			AACPD	% redução AACPD
	7 DAI	14 DAI	21 DAI		
Testemunha*	15,0 ¹ a	23,0 a	52,0 a	22,1 a	
Acibenzolar-S-metílico	5,0 b	12,0 b	14,0 b	8,3 b	62,4
<i>Periconia hispidula</i>	5,0 b	7,0 b	20,0 b	7,6 b	65,6
<i>Zygosporium echinosporum</i>	5,0 b	6,0 c	21,0 b	7,4 b	66,5
<i>Chloridium virescens</i> var. <i>virescens</i>	5,0 b	8,0 b	15,0 b	7,2 b	67,4
<i>Memnoniella levispora</i>	5,0 b	8,0 b	13,0 c	6,7 b	69,9
C.V. (%)	40,3	19,8	13,6	11,8	
Testemunha**	15,0 a	23,0 a	54 a	23,4 a	
Acibenzolar-S-metílico	5,0 bc	12,0 b	14,0 d	8,2 b	64,9
<i>Periconia hispidula</i>	3,0 c	7,0 b	20,0 bc	7,5 b	67,9
<i>Zygosporium echinosporum</i>	7,0 b	7,0 b	21,0 b	7,4 b	68,3
<i>Chloridium virescens</i> var. <i>virescens</i>	5,0 bc	8,0 b	15,0 cd	7,1 b	69,6
<i>Memnoniella levispora</i>	5,0 bc	8,0 b	13,0 d	6,7 b	71,3
C.V. (%)	41,3	22,0	15,8	10,9	

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste Tukey a 5% de probabilidade. *Médias avaliadas no primeiro ensaio.**Médias avaliadas no segundo ensaio

No vigésimo primeiro dia após a inoculação, todos os tratamentos diferenciaram-se da testemunha. No primeiro ensaio, o tratamento com *M. levispora* apresentou menor área foliar afetada. No segundo ensaio, todos os tratamentos

utilizados controlaram a doença, observando-se três grupos de controle. No primeiro grupo, estão o indutor comercial ASM e o fungo *M. levispora* com 14,0% e 13,0% da área foliar afetada, respectivamente. No segundo grupo de controle encontra-se *P. hispidula* e o tratamento com *C. virescens* var. *virescens* que não se diferenciou do tratamento com *P. hispidula*, nem dos tratamentos estatisticamente superiores. No terceiro grupo, o tratamento com *Z. echinosporum* apresentou menor controle da doença com 21,0% da área foliar afetada.

Em relação a AACPD, nos dois ensaios, todos os tratamentos diferenciaram-se da testemunha, porém, não houve diferença entre estes.

Botrel (2013), conduzindo trabalhos com fungos sapróbios no controle de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* observou que o fungo *M. levispora* apresentou os mesmos valores de AACPD que o ASM. Pierozzi (2013), observou que o fungo *M. levispora* teve ação curativa e preventiva em mudas de eucaliptos contra *Puccinia psidii*.

4.2.4 SISTEMATICIDADE DO TRATAMENTO

Os dados de porcentagem de área foliar afetada pela mancha bacteriana, avaliados durante três semanas na terceira folha (tratada e inoculada) e quarta folha (somente inoculada) das plantas estão apresentados na tabela 9.

No sétimo dia após a inoculação, na terceira folha, todos os tratamentos apresentaram menor severidade que a testemunha. Na quarta folha, observaram-se três agrupamentos ($P < 0,05$). No primeiro grupo está a testemunha, com 15,0% da área foliar afetada pela doença. No segundo, está o tratamento com *C. virescens* var. *virescens*, e no terceiro grupo o tratamento com *Z. echinosporum*, *M. levispora*, *P. hispidula* e o tratamento padrão ASM, com 5,0%, 4,8%, 5,0% e 5,0% da área foliar afetada, respectivamente.

No décimo quarto dia na terceira folha, todos os tratamentos apresentaram menor severidade que a testemunha. O tratamento *Z. echinosporum* foi o que apresentou menor área foliar afetada. Na quarta folha, com exceção do

tratamento *C. virescens* var. *virescens*, os demais tratamentos apresentaram menor severidade que a testemunha.

Tabela 9 - Severidade e área abaixo da curva de progresso da mancha bacteriana de tomate (AACPD) na terceira e quarta folha aos sete, quatorze e vinte um dias após inoculação (DAI) com *Xanthomonas vesicatoria* em plantas tratadas com filtrados de fungos sapróbios somente na terceira folha. Londrina, 2014

Tratamentos	3º Folha			
	Área foliar afetada (%)			AACPD
	7 DAI	14 DAI	21 DAÍ	
Testemunha*	15,0 ¹ a	23,0 a	52,0 a	22,1 a
Acibenzolar-S-metílico	5,0 b	12,0 b	14,0 b	8,3 b
<i>Periconia hispidula</i>	5,0 b	7,0 b	20,0 b	7,6 b
<i>Zygosporium echinosporum</i>	5,0 b	6,0 c	21,0 b	7,4 b
<i>Chloridium virescens</i> var. <i>virescens</i>	5,0 b	8,0 b	15,0 b	7,2 b
<i>Memnoniella levispora</i>	5,0 b	8,0 b	13,0 c	6,7 b
C.V. (%)	40,3	19,8	13,6	11,8
Tratamentos	4ª Folha			
	7 DAI	14 DAI	21 DAÍ	AACPD
	7 DAI	14 DAI	21 DAÍ	AACPD
Testemunha**	15,0 a	25,0 a	58,0 a	21,3 a
Acibenzolar-S-metílico	5,0 c	12,0 b	14,0 d	8,1 b
<i>Periconia hispidula</i>	5,0 c	7,0 b	20,0 cd	7,3 b
<i>Zygosporium echinosporum</i>	5,0 c	6,0 b	21,0 c	7,1 b
<i>Chloridium virescens</i> var. <i>virescens</i>	10,0 b	20,0 a	50,0 b	18,3 a
<i>Memnoniella levispora</i>	4,8 c	6,0 b	12,0 d	6,9 b
C.V. (%)	24,5	23,1	8,9	11,7

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste Tukey a 5% de probabilidade. *Médias avaliadas no primeiro ensaio.**Médias avaliadas no segundo ensaio.

No vigésimo primeiro dia, na terceira folha, todos os tratamentos apresentaram controle, com destaque ao tratamento com *M. levispora*, estatisticamente melhor que os demais tratamentos. Na quarta folha observou-se quatro grupos estatísticos. No primeiro, a testemunha com 58% da área foliar afetada pela doença. No segundo grupo, o tratamento com *C. virescens* var. *virescens* com 50% da área foliar afetada. No terceiro grupo, estão os tratamentos com *Z. echinosporum* e *P. hispidula* com 21% e 20% da área foliar afetada respectivamente. No quarto grupo, estão os tratamentos com o fungo *M. levispora* e o padrão ASM, com 12% e 14% da área foliar afetada, respectivamente.

Em relação a AACPD, na terceira folha, todos os tratamentos diferenciaram-se da testemunha, não havendo diferença entre estes. Na quarta

folha, o tratamento com *C. virescens* var. *virescens* apresentou igual severidade que a testemunha e os demais tratamentos com filtrados apresentaram menor severidade que a testemunha. Este resultado indicaria uma sistemicidade do controle induzido pelos filtrados de *Z. echinosporum*, *M. levispora* e *P. hispidula* e uma ação local na terceira folha no caso do tratamento com *C. virescens* var. *virescens*.

Trabalhos com o fungo sapróbio *M. levispora* vem mostrando seu potencial como indutor de resistência em plantas, pois, o mesmo ativa enzimas de defesa em plantas de café (BOTREL, 2013) e eucalipto (PIEROZZI, 2013).

O presente trabalho não avaliou a atividade de enzimas ligadas à defesa das plantas, nem outras respostas de defesa induzidas, mas a verificação da sistemicidade dos tratamentos com alguns dos fungos sapróbios utilizados, indicaria uma indução de resistência nas plantas de tomate.

Conclusões

Zygosporium echinosporum e *Chloridium virescens* var. *virescens* produzem substâncias capazes de inibir o desenvolvimento *in vitro* da fitobactéria *Xanthomonas vesicatoria*.

Os resultados dos experimentos *in vivo* mostraram que todos os fungos sapróbios testados (*Periconia hispidula*, *Zygosporium echinosporum*, *Chloridium virescens* var. *virescens* e *Memnoniella levispora*) têm potencial de controle da mancha bacteriana do tomateiro. A sistemicidade do controle exercido por *P. hispidula*, *Z. echinosporum* e *M. levispora* indica uma indução de resistência na plantas.

Conclusões gerais

Os fungos sapróbios podem ser utilizados no controle do mofo branco da soja e da mancha bacteriana do tomateiro, tanto através de substâncias antimicrobianas produzidas por eles quanto pela indução de mecanismos de resistência nas plantas. Para determinar a utilidade destes fungos como agentes de biocontrole, requerem-se mais estudos sobre a identificação e modo de ação dos metabólitos produzidos, assim como sobre a eficiência de controle das doenças no campo, incluindo forma, momento e número de aplicações do fungo sapróbio.

REFERÊNCIAS

- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by sclerotinia species. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, p. 899-904, 1979
- AGRIANUAL 2003. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Informativos, 2003. 544p.
- ALMEIDA, A.A.C de.; IZABEL, T dos S.S.; GUSMÃO, L.F.P. Fungos conidiais do bioma Caatinga I. Novos registros para o continente americano, Neotrópico, América do Sul e Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro v.62, n. 2, p. 043-053, abr/jun., 2011.
- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A. Doenças da Soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M.(Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. Piracicaba: Ceres, 1997. p. 596-617.
- ALVARENGA, M.A.R. **Tomate**: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras: UFLA. 2004. 400p.
- ARAÚJO, J.S.P.; ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D. Manejo integrado de fitobacterioses de impotância econômica no Brasil. Parte 1. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.11, p. 107-131, 2003.
- ÁVILA, Z.R.; CARVALHO, S.S.; BRAÚNA, L.M.; GOMES, D.M.P.A.; SILVA, M.C.F.; MELLO, S.C.M. 2005. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Embrapa Recursos Genéticos, Brasília. 30p. (Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa 177).
- BARBOSA, F.R.; GUSMÃO, L.F.P. Conidial fungi from semi-arid Caatinga Biome of Brazil. Rare freshwater hyphomycetes and other new records. **Mycosphere**, v.2, n.4, p.475–485, 2011.

- BARROS, D.C.M. **Fungos sapróbios no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja**. Dissertação de Mestrado em Agronomia-Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2014.
- BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n.9, p. 1143-44, 1982.
- BAUCHET, G.; CAUSSE, M. Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In: ÇALIŞKAN, M. (Ed.) **Genetic diversity in plants**. Rijeka: InTech, p. 133-162, 2012.
- BERDIN, S.D.; HUANG, H.C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.88-98, 2001.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant host of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 16, p. 93-108. 1994.
- BONETTI, L.P. Distribuição da soja no mundo. In: Miyasaka, S.; Medina, J.C. (eds.). **A soja no Brasil**, p.1-6, 1981.
- BOTREL, D.A. **Fungos sapróbios como agentes de biocontrole da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) no cafeeiro**. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.
- CAMARGO FILHO, W.P.; DONADELLI, A.; SUEYOSHI, M.L.S.; CAMRGO, A.M.M.P. **Evolução da produção de tomate no Brasil**. São Paulo: Agricultura em São Paulo, 41(1):41-69, 1994.

- CARDOZO, M.M.; PALMEIRA, M.E. Desafio de logística nas exportações brasileiras do complexo agronegocial da soja. Observatorio da la Economía Latinoamericana, Adaluzia, n.71, 2006.
- CARMO, M.G.F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L.A.; CARVALHO, A.O. Determinação do nível de tolerância de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v.21, p. 336-341, 1996.
- CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; JÚNIOR, P.M.R.; COSTA, J.C.B.; SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, p. 372-380. 2006.
- COSTA NETTO, J.P. Fungos do Rio Grande do Sul, observados nos anos de 1941-1943. **Boletim da Secretaria do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, v.99, p.11. 1943.
- COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **A cultura do tomate**. Disponível em <www.conab.br> Acessado em 02 de julho de 2014.
- DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A.C.; LAZZAROTO, J.J.; HIRAKURI, M.H.; OLIVEIRA, A.B. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Londrina, PR: Embrapa/ CNPSo, Circular Técnico, 43, 2007. 11p.
- DANIELSON, G.A.; NELSON, B.D.; HELMS, T.C. Effect of Sclerotinia stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant disease**, v.88, n.3. p.297- 300, mar. 2004.
- DHINGRA, O.D.; MENDONÇA, H.L.; MACEDO, D.M. Doenças e seu controle. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**, Londrina: Mecnas, 2009. p. 133-156.
- DILLON-WESTON, W.A.R.; LEVELESS, R.A.; TAYLOR, E.R. Clover rot. **Journal Agriculture Science**, v. 36, p. 18-28, 1946

- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advanced and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 25 n.5, p. 417-440, sep. 2006.
- EMBRAPA SOJA. A Soja. Disponível em <www.cnpso.embrapa.br> Acesso em 01 de jul. de 2013.
- ETHUR, L.Z; CEMBRANEL, C.Z.; DA SILVA, A.C.F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 31, n.5, p. 885-887, 2001.
- FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em <www.faostat.fao.org>Acessado em 03 de julho de 2013.
- FAO. Agricultural Organization of the United Nations (FAO) statistics <<http://faostat.fao.org/>>; Acesso em: 12 jan. 2015.
- FERNANDO, W.G.D., NAKKEERAN, S., ZHANG, Y., SAVCHUK, S. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. **Crop Protection**, v.26, p.100–107. 2007.
- FONTES, P.C.R.; SILVA, D.J.H. **Produção de tomate de mesa**. Viçosa: Aprenda fácil, 2002. 197p.
- GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. An overview of the road map to the manual. **Systematic Bacteriology**. 2 ed. New York: Springer, 2000. 20p.
- GRANDI, R.A.P.; GUSMÃO, L.F.P. 1998. A técnica da lavagem sucessiva de substratos de plantas como subsídio para estudos da associação fungo/substrato e diversidade de Hyphomycetes nos Ecossistemas. IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros. **ACIESP 104**: 80-90.
- HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. Ainsworth & Bisby's. **Dictionary of the fungi**. New York: CAB International, 1995. 616 p.
- HUANG, H.C. Ecological Basis of biological control of soilborne plant pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 14, p.86-91, 1992

HYMOWITZ, T. On the domestication of soybean. **Economic Botany**, Lawrence, v.24, p.408-421, 1970.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em <www.ibge.org.br>Acessado em 02 de julho de 2013.

IZABEL, T dos S.S.; SANTOS, D.S.; ALMEIDA, D.A.C de.; GUSMÃO, L.F.P. Fungos conidiais do bioma Caatinga II. Novos registros para o continente americano, Neotrópico, América do Sul e Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.62, n. 2, p. 229-240, abr/jun., 2011

JONES, J.B. Bacterial spot. In: JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. (Ed.) **Compendium of tomato diseases**. Saint Paul: APS Press, 1997. 27p.

JONES, J.B.; STALL, R.E.; BOUZAR, H. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 41-58, 1998.

JONES, J.B.; LACY, G.H.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; SCHAAD, N.W. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.27, p. 755-762, 2004.

KADO, C. I. **Plant Bacteriology**. St. Paul: APS Press, 2010. 336 p.

LEÃO-FERREIRA, S.M.; GUSMÃO, L.F.P.; RUIZ, R.F.C. Conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. Three new species and new records. **Nova Hedwingia**, v. 96, p.479-494, jan. 2013.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomate**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças. 2005. 151p.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças das hortaliças- diagnose e controle**. Brasília: EMBRAPA- CNPH, 1997. 70p.

- MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associadas às sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p. 229-263, 1994
- McGUIRE, R.G.; JONES, J.B. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato. In: SAETLER, A.W., SCHAAD, N.W., ROTH, D.A. (Ed) **Detection of bacterial in seed**. Saint Paul: APS Press, 1995. 122p.
- MELLO, S.C.M.; TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p. 447-449, 1997.
- MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D.; KOCH, E.F.A. Metodologia para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 18. 1995. São Paulo. Resumos...São Paulo: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1995. p. 118-133.
- MENTEN, J.O.M. Situação dos padrões da sanidade de sementes. **Summa Phytopathologica**, v.23, n.1, p.86-89, 1997.
- MILLER, S.A.; BROOME, J.C. Organic tomato health management. In: DAVIS, R.M.; PERNEZNY, K.; BROOME, J.C. (Eds.) **Tomato health management**. St. Paul: APS Press, p.145-158, 2012.
- MORTON, J.G.; HALL, R. Factors determining the efficacy of chemical control of whit mold in white bean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, p.297-302, 1989.
- NASSER, L.C.B; NAPOLEÃO, R.; CARVAJAL, R.A. Mofo Branco- cuidado com a sua semente. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, n.04, mio. 1999.
- NEERGAARD, P. Mycelial seed infection of certain crucifers by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Plant Disease Rep.**, St. Paul, v.42, p.1105-1106, 1958.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão**

- (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- PERALTA, I.E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, Laramie, v. 30, p. 424-434, 2005.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n.5762, p. 808-811, feb. 2006.
- PIEROZZI, C.G. **Fungos sapróbios do semiárido nordestino: aspectos fisiológicos, ação no controle da ferrugem e indução de enraizamento em mudas de eucalipto**. Dissertação de Mestrado-Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, Botucatu. 2013.
- PINTO, E.A.M.F. **Controle da mancha manteigosa com fungos sapróbios em cafeeiro**. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.
- PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Sciences**, v.4, p.330-337. 2008
- PAZINATO, B.C., GALHARDO, R.C. **Processamento artesanal do tomate**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1997. 30 p.
- PERNEZNY, K., DAVIS, R.M., MOMOL, TIMUR. In: DAVIS, R.M., PERNEZNY, K., BROOME, J.C. **Tomato health management**. St. Paul: APS PRESS. 2012.
- PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum* history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**. St. Paul, v.69, p. 875-880. 1979.
- REIS, M.E. A podridão da haste da soja. **Lavoura arrozeira**, v. 287, p. 32-36, 1975.

- SACCÁ, R.A. Algumas moléstias novas e outras pouco conhecidas da batatinha (*Solanum tuberosum*). Boletim da Secretaria da Agricultura Industrial e Comércio do Estado de São Paulo, São Paulo, n.21, p.741-812. 1920
- SUMIDA, C.H. **Controle químico e biológico do mofo branco na cultura da soja**. 2012. 90p. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.
- TOLÊDO-SOUZA, E. D. de; COSTA, J. L. da S. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.33, p.57-63, 2003.
- VERNETTI, F. de J. Soja: planta, clima, pragas, moléstia e invasoras. Campinas, Fundação Cargill, v.1, 1983. 463p.
- YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Comcomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.12, p.7343-7353, dec. 2003.
- ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; SOUSA, B.M.F.; MATOS, C.S.M. Crescimento micelial, produção e germinação de esclérodios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n.5, p.782-789, sept. 2012.
- ZHENG, Y.; XUE, Q.Y.; XU, Q.; LU, S.; GU, C.; GUO, J.H. A screening strategy of fungal biocontrol agents towards Verticillium wilt of cotton. **Biological Control**, v. 56, n. 2, p. 209-216, 2011.